



Instituto Nacional do Câncer

Programa de Pós-Graduação em Oncologia

NINA CARROSSINI BASTOS

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS CORPÚSCULOS
LIPÍDICOS NA CARCINOGENESE ESÔFAGICA**

Rio de Janeiro
Dezembro 2016



Instituto Nacional do Câncer

Programa de Pós-Graduação em Oncologia

NINA CARROSSINI BASTOS

AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS CORPÚSCULOS LIPÍDICOS NA CARCINOGENESE ESÔFAGICA

Defesa de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* do Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva como parte dos requisitos para obtenção do título de doutorado em Oncologia.

Orientador: Luis Felipe Ribeiro Pinto
Programa de Mecanismos de Carcinogênese-CPQ

Co-Orientador: João Paulo de Biaso Viola
Programa de Biologia Celular- CPQ

Rio de Janeiro
Dezembro 2016

AGRADECIMENTOS

À minha família querida que me apoiou durante toda a minha formação e sempre acreditou no meu potencial. Em especial meu pai, meu fã número um, e um grande financiador da pesquisa brasileira! Sem vocês nada teria graça. Amo vocês.

Ao José Ricardo meu grande amigo e companheiro. Cujos ombros me ajudaram a passar por momentos difíceis durante essa jornada! Obrigada!

Ao meu orientador Luis Felipe Ribeiro pela oportunidade de realizar minha tese de doutorado em seu laboratório, pelo tempo que me foi dedicado e também pela sua grande paciência. Agradeço também o projeto que colocou em minhas mãos, pelo qual sou completamente apaixonada. Obrigada

Ao meu co-orientador João Viola pelas excelentes sugestões ao longo do trabalho. Também, por todas as coisas que me ensinou e ser um grande amigo desde o início da minha carreira científica. Obrigada!

À Nathalia, minha co-co-orientadora de coração, muito obrigada por todo tempo dedicado ao meu projeto, por toda paciência, por ter ajudado a passar tantos problemas durante o preparo dessa tese. Sem você esse trabalho não seria o mesmo! Obrigada!

À Patrícia Bozza e seus alunos, em especial ao Edson, por tudo que tive a oportunidade de aprender, por todas as sugestões ao trabalho e todos os reagentes cedidos! Obrigada

Ao Leonardo Teixeira que além de ter sido um grande professor na bancada no início da minha formação e amigo, esteve sempre presente com boas ideias e palavras estimuladoras que com certeza fizeram toda diferença.

À Vanessa grande amiga e parceira da bancada. Aprendi muito mais que protocolos com você, muito obrigada.

Aos meus companheiros de laboratório: Pedro, Leão, Isabela, Alda, Tatiana, Sheila, Marina, Davy, Juliana, Esther, Diego, Lilian por em algum momento durante a minha tese terem se disponibilizado a me ajudar. E terem me aturado por tanto tempo nesse laboratório! Obrigada!

Às patologistas associadas ao trabalho, Dra Ivanir, Dra Luciana e Dra Tânia, muito obrigada por todo trabalho dedicado a essa tese e também a todas as sugestões.

Ao Dr Gilberto Mansur, endoscopista associado ao trabalho e amigo de turma de doutorado, obrigada pelos momentos divertidos em aula e pela ajuda com o trabalho.

Ao André que sempre esteve disponível para me ajudar nessa jornada que é trabalhar com CLs! As excelentes discussões sobre o tema e pela excelente companhia!

A Monique e Fernanda, essenciais no dia-a-dia do laboratório, sempre disponíveis para ajudar no que fosse preciso! Além de manterem o laboratório sempre em regime militar para o bom funcionamento de tudo! Obrigada

À grande amiga Maria Tereza sempre ajudando no que fosse possível. Grande incentivadora! Obrigada a me fazer ir além do que eu imaginava ser capaz!

Às grandes amigas da vida que o trabalho no INCA me apresentou, Alexsandra, Amanda, Virgínia e Lilian! Que mesmo não participando diretamente sempre me ajudaram nesses anos todos no INCA!

Aos meus novos colegas e amigos do BNT, Diego Gomes, Leandro, Suelly e Leonardo, pela ajuda e compreensão nesse último ano! Vocês fazem meus dias serem mais alegres!

Aos meus chefes Dra Marisa e Dr Gustavo, pela ajuda nesse último ano! Muito obrigada pela compreensão.

A todos os funcionários da CPQ/INCA por terem garantido a qualidade do ambiente em que tive oportunidade de trabalhar.

Aos pesquisadores do INCA que formaram a pós-graduação na qual realizei a minha tese, com excelentes aulas e seminários.

Aos alunos da pós-graduação, principalmente os do quinto e sexto andar da CPQ, pelos momentos divertidos nas bancadas, pelos trabalhos em grupo, que com certeza contribuíram para fazer com que esses anos fossem bem mais agradáveis!



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer

Avaliação do papel dos Corpúsculos Lipídicos na Carcinogênese Esofágica

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Nina Carrossini Bastos

O câncer de esôfago (CE) é a sexta causa mais freqüente de morte por câncer. Existem dois tipos principais de CE: Carcinoma Epidermóide (CEE) e Adenocarcinoma (ADE). Para o desenvolvimento do CEE os principais fatores de risco são o consumo de tabaco e álcool, e para o ADE podemos citar o refluxo esôfago-gástrico, obesidade e o esôfago de Barrett (EB), uma condição onde o epitélio estratificado do esôfago é substituído por um epitélio colunar metaplásico intestinal. Corpúsculos lipídicos (CL) são inclusões citoplasmáticas envolvidas na produção de eicosanóides e são mais abundantes em células associadas a reações inflamatórias e neoplasias. Sabendo que o processo inflamatório desempenha um papel importante no CE, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel dos CLs no CE. Primeiramente foi avaliada a presença de CL em amostras humanas de esôfago. Não houve marcação para ADRP nas amostras de esôfago normal, entretanto, houve um aumento gradativo na marcação dessa proteína na evolução do ADE e a marcação em CEE foi positiva em apenas poucos casos. Avaliamos também linhagens celulares de CE e observamos um aumento no número de CL na linhagem de ADE (OE33), quando comparada à linhagem de esôfago normal (Het1A) e a linhagem de CEE (OE21), corroborando os resultados anteriores. Para entender como os CLs eram formados já nos estágios iniciais de desenvolvimento do ADE, a linhagem Het1a, foi submetida a insultos que mimetizam os principais fatores de risco associados ao ADE e foi observado um aumento no número de CL quando incubada com pH ácido, ácidos biliares, nicotina e ácido oleico. Além disso, esses estímulos foram capazes de induzir aumento na expressão de genes associados à resposta inflamatória e também de gene envolvido no desenvolvimento do EB. Avaliamos também esses estímulos nas células tumorais e observamos que apenas a linhagem OE33 apresentou aumento no número de CL e aumento na expressão de *IL-8* e *COX-2*. Com objetivo de entender melhor a diferença do número de CLs entre ADE e CEE foi realizada marcação para *COX-2* nessas amostras e observamos que não houve diferença na marcação entre esses dois tipos tumorais, no entanto houve uma correlação positiva entre a marcação para CL e *COX-2* nas amostras de ADE. Seguimos para caracterização da expressão de genes associados à resposta inflamatória. Foi observado um aumento da expressão de *COX-2* e *TLR4* na linhagem OE33, que foi acompanhado pelo aumento na produção de PGE_2 e *IL-8*, quando comparada à OE21. A ativação de *TLR4* induziu aumento de CL, transativação de $NF\kappa B$, produção de *IL-8* e PGE_2 apenas na linhagem OE33. E a aspirina foi capaz de inibir esses efeitos. No entanto, não houve diferença na marcação para $NF\kappa B$ nas amostras humanas de ADE e CEE. Nosso próximo passo foi avaliar se os insultos que mimetizam os fatores de risco associados ao ADE eram capazes de ativar o receptor *TLR4*, porém isso não foi confirmado. Uma vez que os CLs concentram mediadores inflamatórios e estão presentes em níveis aumentados já em estágios iniciais do desenvolvimento do ADE, podemos concluir que os CLs apresentam um papel relevante na carcinogênese desse tumor, o que não ocorre para o CEE.

Palavras-chave: Câncer de Esôfago, Corpúsculos lipídicos, Inflamação



Ministério da Saúde

Instituto Nacional de Câncer

Evaluation of the role of Lipid Droplets in Esophageal Carcinogens

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Nina Carrossini Bastos

Esophageal cancer (EC) is the sixth most frequent cause of cancer death. There are two main types of EC: Epidermoid Carcinoma (EEC) and Adenocarcinoma (ADE). For the development of CEE, the main risk factors are tobacco and alcohol consumption, and for ADE we can mention esophagogastric reflux, obesity and Barrett's esophagus (BE), a condition where the stratified epithelium of the esophagus is replaced by an intestinal metaplastic columnar epithelium. Lipid droplets (LD) are cytoplasmic inclusions involved in the production of eicosanoids and are more abundant in cells associated with inflammatory reactions and neoplasms. As the inflammatory process plays an important role in EC, the objective of this work was to evaluate the role of LDs in EC. First, the presence of LD was evaluated in human esophageal samples. There was no ADRP staining in the normal esophagus samples, however, there was a gradual increase in staining score of this protein in the evolution of the ADE and in EEC cases ADRP staining was positive in only a few cases. We also evaluated EC cell lines and observed an increase in the number of LD in the ADE cell line (OE33) when compared to the normal esophagus cell line (Het1A) and the EEC cell line (OE21), corroborating the previous results. To understand how LDs were formed in the early stages of ADE development, the Het1a cell line was subjected to insults that mimic the major risk factors associated with ADE and an increase in the number of LD was observed when incubated with acidic pH, bile acids, Nicotine and oleic acid. In addition, these stimuli were able to induce an increase in the expression of genes associated with the inflammatory response and gene involved in the development of BE. We also evaluated this stimulus in tumor cells and found that only the OE33 cell line showed increased LD number and increased expression of *IL-8* and *COX-2*. In order to understand better the difference in the number of LDs between ADE and EEC, marking for COX-2 in these samples was performed and we observed that there was no difference in staining between these two tumors types, however there was a positive correlation between the labeling for LD and COX-2 in ADE samples. We continue to characterize the expression of genes associated with the inflammatory response. An increase in *COX-2* and *TLR4* expression was observed in the OE33 cell line, which was accompanied by increased production of PGE₂ and IL-8 when compared to OE21. Activation of TLR4 induced increase in LD number, NFκB transactivation, IL-8 and PGE₂ production only in the OE33 lineage. In addition, aspirin was able to inhibit these effects. However, there was no difference in the labeling for NFκB in the human samples of ADE and EEC. Our next step was to assess whether the insults that mimic risk factors associated with ADE were able to activate the TLR4 receptor, but this was not confirmed. Since LDs concentrate inflammatory mediators and are present at increased levels already in the early stages of ADE development, we can conclude that LDs play a relevant role in the carcinogenesis of this tumor, which does not occur for the EEC.

Key words: Esophageal Cancer, Lipid Droplets, Inflammation

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	- Ácido Araquidônico
ADE	- Adenocarcinoma de Esôfago
ADH	- Enzima álcool desidrogenase
ADRP	- Proteína Relacionada à Diferenciação de Adipócitos
AC	- Ácido Cólico
AINEs	- Anti-inflamatórios não esteroidais
AKT	- Quinase Serina-Treonina
ALDH	- Enzima acetaldeído desidrogenase
AO	- Ácido Oleico
AP-1	- Proteína Ativadora-1
APC	- <i>Anaphase-promoting complex</i>
ASA	- Ácido acetil-salicílico
ATGL	- Lipase de Triglicerídeos do Tecido Adiposo
BCG	- <i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
FGF	- Fator de Crescimento de Fibroblasto
BrDU	- Bromodeoxyuridine
CHO	- Ovário de Hamster Chinês
CDCA	- Ácido Chenodeoxicólico
CDX2	- <i>Caudal Type homeobox 2</i>
CEE	- Carcinoma Epidermóide de Esôfago
CL	- Corpúsculo lipídico
CLA	- Ácido Linoléico Conjugado
COS	- CV-1 em Origem, carregando SV40
COX	- Ciclooxygenase
CYP	- Citocromo
cPLA2- α	- Fosfolipase A ₂ Alfa Citosólica
DAMP	- Padrões Moleculares associados a Danos celulares
DAPI	- 4',6-diamidino-2-fenilindol
DCA	- Ácido desoxicólico
DEPC	- Dietilpirocarbonato
DGAT-1	- Acil-CoA Diacilglicerol Aciltransferase
DGTA2	- diacilglicerol-aciltransferase-2
DMEM	- Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	- Ácido desoxiribonucleico
DP	- Desvio Padrão
DSS	- Dextran Sulfato de Sódio
EB	- Esôfago de Barrett
EDTA	- Ácido Triacético Diamino Etileno
EGFP	- Proteína Verde Fluorescente Aumentada
ELISA	- <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	- Cinase Regulada por Sinalização Extracelular
EUA	- Estados Unidos da América
FASN	- Ácido graxo sintetase
FSP27	- Proteína Específica de Gordura 27
FXR	- Receptor de Farsenóide X
GAPDH	- Glicealdeído 3-Fosfato Desidrogenase
HCl	- Ácido Clorídrico

HIF-1	- Fator Induzido por Hipóxia-1
HPA	- Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPRT	- Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase
HPV	- Papilomas Vírus Humano
HRP	- Peroxidase de <i>Azorella rusticana</i>
IARC	- <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IHQ	- Imunohistoquímica
IL	- Interleucina
IMC	- Índice de Massa Corporal
JNK	- Cinase c-Jun N-terminal
LAM	- <i>Lipoarabinomannan</i>
LDL	- Lipoproteína de Baixa Densidade
LPS	- Lipopolissacarídeo
LTB ₄	- Leucotrieno B ₄
LTC ₄	- Leucotrieno C ₄
MAP	- Proteínas Ativadas por Mitógenos
MAPK	- Cinase de Proteínas Ativadas por Mitógenos
MGMT	- Metil-guanina Metil-transferase
mTOR	- Alvo da Rapamicina em Mamíferos
NADH	- Dinucleotídeo de Adenina Nicotinamida
nAChR	- Receptor Acetilcolínico de Nicotina
NDEA	- N-nitrosodietilamino
NFκB	- Nuclear Factor kappa B
NNK	- 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanone
NNN	- N'-nitrosonornicotina
NP-40	- <i>Nonidet P-40</i>
ORO	- Oil Red O
oxLDL	- Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada
PAGE	- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PAMP	- Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PAT	- Perilipina, ADRP, TIP-47
PBS	- Tampão Fosfato Salino
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PGE ₂	- Prostaglandina E ₂
PI	- Iodeto de propídeo
PI3K	- Fosfatidilinositol-3-Cinase
PKA	- Proteína Cinase A
PKC	- Proteína Cinase C
PLIN	- Perilipina
PPAR	- Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomos
PXR	- Receptor Pregnane X
RANTES	- Regulada por Ativação Expressa e Secretada por Células T Normais
RE	- Retículo Endoplasmático
RNA	- Ácido Ribonucleico
ROS	- Espécies Reativas de Oxigênio
SDS	- Duodecil Sulfato de Sódio
SEER	- <i>Surveillance Epidemiology and End Results</i>
SFB	- Soro Fetal Bovino

SREBP-1c	- Proteína ligadora de elemento regulatório de esterol 1c
STAT3	- <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TAG	- Triacilglicerol
TBS	- Tampão Tris Salino
TBS-T	- Tampão Tris Salino - Tween 20
TLR	- <i>Toll-Like receptor</i>
TEMED	- Tetra Metil Etileno Diamina
TNF α	- Fator de Necrose Tumoral α
TIP47	- Proteína de Interação de Cauda de 47 kDa
WECC	- <i>Worldwide Esophageal Cancer Collaboration</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Distribuição Geográfica das taxas de incidência para o câncer de esôfago em homens.....	18
Figura 1.2 Etiologias conhecidas comuns e específicas de Adenocarcinoma de Esôfago e Carcinoma epidermóide de esôfago.....	26
Figura 1.3 Esquema gráfico da via de sinalização envolvendo a ativação do receptor Toll-Like 4 (TLR).....	32
Figura 1.4 Representação esquemática da estrutura de um Corpúsculo Lipídico.	37
Figura 3.1 Marcação com Alcian Blue e Hematoxilina em amostra humana de esôfago de Barrett.....	47
Figura 4.1 Avaliação da expressão de ADRP em amostras humanas de tecidos esofágicos e em amostra de adenocarcinoma de cólon.....	60
Figura 4.2 Fotos representativas da marcação para ADRP em amostras de ADE	60
Figura 4.3 Avaliação do percentual de células positivas para ADRP em amostras humanas de tecido esofágico.....	61
Figura 4.4 Avaliação da expressão de Ki67 em amostras de Adenocarcinoma de Esôfago e Carcinoma Epidermóide de Esôfago.....	63
Figura 4.5 Avaliação do percentual de células positivas para Ki67 em amostras humanas de Esôfago de Barrett, Adenocarcinoma de Esôfago e Carcinoma Epidermóide de Esôfago.....	64
Figura 4.6 Avaliação do número de CL e proliferação nas linhagens celulares de esôfago.....	65
Figura 4.7 Avaliação da expressão proteica de ADRP nas linhagens celulares de esôfago.....	66
Figura 4.8 Avaliação da localização da proteína ADRP nas linhagens celulares de esôfago.....	67
Figura 4.9 Avaliação do número de CL na linhagem de esôfago normal quando exposta aos fatores de risco associados ao Adenocarcinoma de Esôfago.....	69
Figura 4.10 Avaliação da proliferação e perfil de ciclo celular da linhagem celular de tecido esofágico normal Het1a após estímulo com diferentes concentrações de ácido oleico.....	71
Figura 4.11 Avaliação do perfil de ciclo celular da linhagem celular de tecido esofágico normal Het1a após estímulo com ácido oléico.....	72
Figura 4.12 Avaliação da proliferação celular nas células de tecido esofágico normal Het1a após pulsos de meio ácido, meio contendo DCA 200µM e meio ácido e DCA.....	73
Figura 4.13 Avaliação da proliferação e perfil de ciclo celular da linhagem celular de tecido esofágico normal Het1a após estímulo com diferentes concentrações de Nicotina.....	73

Figura 4.14 Avaliação do perfil de ciclo celular da linhagem celular de tecido esofágico normal Het1a após estímulo com Nicotina.....	74
Figura 4.15 Análise da expressão de genes associados ao desenvolvimento do Adenocarcinoma de Esôfago na linhagem celular de esôfago normal (Het1a) estimulada com diferentes doses de ácido oleico.....	75
Figura 4.16 Análise da expressão de genes associados ao desenvolvimento do Adenocarcinoma de Esôfago na linhagem celular de esôfago normal (Het1a) estimulada com a combinação de meio com pH ácido com DCA.....	76
Figura 4.17 Análise da expressão de genes associados ao desenvolvimento do Adenocarcinoma de Esôfago na linhagem celular de esôfago normal (Het1a) estimulada com diferentes doses de Nicotina.....	77
Figura 4.18 Avaliação do número de CL nas linhagens celulares de Adenocarcinoma de Esôfago (OE33) e Carcinoma Epidermóide de Esôfago (OE21) após incubação com ácido oleico, meio com pH ácido, DCA e Nicotina.....	79
Figura 4.19 Avaliação da expressão de genes envolvidos no desenvolvimento do Adenocarcinoma de Esôfago nas linhagens de Adenocarcinoma de Esôfago (OE33) e Carcinoma Epidermóide de Esôfago (OE21) após incubação com diferentes doses de ácido oleico.....	81
Figura 4.20 Avaliação da expressão de genes envolvidos no desenvolvimento do Adenocarcinoma de Esôfago nas linhagens de Adenocarcinoma de Esôfago (OE33) e Carcinoma Epidermóide de Esôfago (OE21) após incubação com meio com pH ácido e DCA.....	82
Figura 4.21 Avaliação da expressão de genes envolvidos no desenvolvimento do Adenocarcinoma de Esôfago nas linhagens de Adenocarcinoma de Esôfago (OE33) e Carcinoma Epidermóide de Esôfago (OE21) após incubação com nicotina.....	83
Figura 4.22 Fotos representativas da marcação de COX-2 por Imuno-histoquímica em amostras humanas de esôfago.....	85
Figura 4.23 Avaliação da marcação para COX-2 em amostras de esôfago normal, Esôfago de Barrett, Adenocarcinoma de Esôfago e Carcinoma Epidermóide de Esôfago.....	85
Figura 4.24 Análise da correlação entre as marcações para COX-2 e para ADRP nas amostras de Adenocarcinoma de Esôfago e Carcinoma Epidermóide de Esôfago.....	86
Figura 4.25 Avaliação da expressão de COX-2 e produção de PGE ₂ nas linhagens celulares de esôfago.....	87
Figura 4.26 Avaliação dos receptores TLR nas linhagens celulares OE21 e OE33.....	87
Figura 4.27 Avaliação do número de CL após ativação de TLR4 com LPS e inibição de COX-2 com ASA nas linhagens celulares OE21 e OE33.....	89

Figura 4.28 Avaliação da proliferação, produção de PGE ₂ , expressão e produção de IL-8, após ativação de TLR4 com LPS nas linhagens de câncer de esôfago.....	89
Figura 4.29 Avaliação da translocação nuclear de p65 após ativação com LPS nas linhagens celulares OE21 e OE33.....	91
Figura 4.30 Fotos representativas da marcação de p65 por Imuno-histoquímica em amostras humanas de esôfago.....	92
Figura 4.31 Representação gráfica do percentual de células marcadas vezes a intensidade de marcação para p65 nas amostras Adenocarcinoma de Esôfago e Carcinoma Epidermoide de Esôfago.....	93
Figura 4.32 Fotos representativas da marcação de TLR4 por Imuno-histoquímica em amostras humanas de esôfago.....	94
Figura 4.33 Representação gráfica da marcação para TLR4 nas amostras Adenocarcinoma de Esôfago e Carcinoma Epidermoide de Esôfago.....	94
Figura 4.34 Avaliação da inibição da ativação de TLR4 com LPS na formação de CL pelo inibidor de TLR4, CLI095 na linhagem celular OE33.....	95
Figura 4.35 Avaliação do inibidor de TLR4, CLI095 na formação de CL, após ativação da linhagem celular OE33 com ácido oléico e nicotina.....	96
Figura 4.36 Avaliação do número de CL após estímulo com diferentes concentrações de DCA por 24h na linhagem OE33.....	97
Figura 4.37 Avaliação da expressão de TLR4 após ativação da linhagem Het1a com ácido oléico, nicotina e DCA em meio ácido.....	98
Figura 4.38 Avaliação do inibidor de TLR4, CLI095 na expressão de TLR4, após ativação das linhagens OE21 e OE33 com ácido oléico, nicotina e DCA em meio ácido.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Tabela com as características específicas das linhagens celulares utilizadas.....	47
Tabela 3.2. Tabela com as substâncias e suas concentrações utilizadas para o tratamento das linhagens celulares de esôfago.....	50
Tabela 3.3. Sequência dos primers utilizados no trabalho.....	54
Tabela 4.1 Características sócio-demográficas e clínico-patológicas dos indivíduos sem câncer e dos pacientes com adenocarcinoma e carcinoma epidermoide de esôfago atrelados no trabalho.....	59
Tabela 4.2 Associação entre os dados clínico-patológicos e a marcação para ADRP nas amostras de Adenocarcinoma de Esôfago, Carcinoma Epidermoide de Esôfago e Esôfago de Barrett.....	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Câncer de Esôfago.....	16
1.1.1. Epidemiologia	16
1.1.2. Etiologia	18
1.1.2.1 Carcinoma Epidermóide de Esôfago.....	18
1.1.2.2 Adenocarcinoma de Esôfago.....	22
1.1.3. Principais Alterações Moleculares em Câncer de Esôfago.....	26
1.1.4. Inflamação e Câncer de Esôfago.....	30
1.1.4.1 Inflamação e Câncer.....	30
1.1.4.2 Inflamação em Câncer de esôfago.....	32
1.2 Corpúsculos Lipídicos.....	35
1.2.1 Corpúsculos Lipídicos e Inflamação.....	39
1.2.2 Corpúsculos Lipídicos e câncer	41
2. OBJETIVOS.....	44
2.1. Objetivo Principal.....	44
2.2. Objetivos Específicos.....	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1. Amostras Humanas	45
3.2. Análises Imunohistoquímicas.....	46
3.3. Cultura de Célula.....	47
3.4. Coloração de Corpúsculos Lipídicos por Oil Red O.....	48
3.5. Contagem de Corpúsculos Lipídicos.....	49
3.5.1. Microscópio de Fluorescência.....	49
3.5.2. Tratamento das Imagens.....	49
3.5.3 Software utilizado para contagem de CL.....	49

3.6. Tratamentos das linhagens celulares.....	50
3.7. Proliferação celular	51
3.8. Ensaio de Cristal Violeta.....	51
3.9. Dosagem de Prostaglandina E2 e Interleucina 8.....	52
3.10. Imunofluorescência.....	52
3.11. Análise da expressão gênica.....	53
3.11.1 Extração de RNA.....	53
3.11.2.Reação da transcrição reversa.....	53
3.11.3 Reação de PCR em tempo real.....	53
3.11.4 Análise dos resultados de PCR em tempo real.....	54
3.12. Análise da expressão proteica por <i>Western blot</i>.....	54
3.12.1 Extração e Dosagem de proteínas.....	54
3.12.2 <i>Western Blot</i>	55
3.13 Marcação dupla com Iodeto de Propídeo e BrDU.....	55
3.14 Análises Estatísticas	56
4. RESULTADOS	57
4.1. Avaliação da presença de CL em amostras humanas de tecido esofágico.....	57
4.2. Avaliação da presença de CL em linhagens celulares de esôfago.....	64
4.3. Avaliação do papel dos fatores de risco associados ao ADE na formação de CL e suas consequências funcionais em linhagem celular de esôfago normal.....	67
4.3.1 Influência dos fatores de risco associados ao ADE na formação de CL em linhagem celular de esôfago normal.....	68
4.3.2 Influência dos fatores de risco associados ao ADE na modulação de parâmetros celulares associados ao processo carcinogênico em linhagem celular de esôfago normal.....	70
4.3.3 Influência dos fatores de risco associados ao ADE na expressão de genes envolvidos nas etapas iniciais da carcinogênese esofágica em linhagem celular normal de esôfago.....	74

4.4 Avaliação do papel dos fatores de risco associados ao ADE na formação de CL e suas consequências funcionais em linhagens celulares de ADE e CEE.....	77
4.4.1 Avaliação do papel dos fatores de risco associados ao ADE na formação de CL em linhagens celulares de ADE e CEE.....	78
4.4.2 Influência dos fatores de risco associados ao ADE na expressão de genes envolvidos nas etapas iniciais da carcinogênese esofágica em linhagens celulares de ADE e CEE.....	79
4.5 Avaliação de vias envolvidas no processo inflamatório e correlação com a presença de CL no câncer de esôfago.....	83
4.6 Avaliação do envolvimento dos fatores de risco associados ao ADE na ativação e modulação da expressão do receptor TLR4.....	95
5. DISCUSSÃO.....	100
6. CONCLUSÃO.....	120
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

B327a Bastos, Nina Carrossini.

Avaliação do papel dos corpúsculos lipídicos na carcinogênese
esofágica / Nina Carrossini Bastos. – Rio de Janeiro, 2016.
151 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer
José Alencar Gomes da Silva, 2016.

Orientador: Luis Felipe Ribeiro Pinto.
Co-orientador: João Paulo de Biaso Viola.

1. Neoplasias Esofágicas. 2. Corpúsculos Lipídicos.
3. Inflamação. 4. Carcinogênese. I. Pinto, Luis Felipe Ribeiro
(Orient.). II. Viola, João Paulo de Biaso (Co-orient.). III. Instituto
Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99432

1. Introdução

1.1 Câncer de Esôfago

1.1.1 Epidemiologia

O câncer de esôfago responde pela oitava posição em incidência e sexta em letalidade dentre todos os tipos de tumor. É um dos tumores mais letais do trato gastrointestinal fazendo com que suas taxas de mortalidade guardem semelhança às taxas de incidência. Oitenta por cento das mortes por este tumor ocorrem em países em desenvolvimento, sendo que a América do Sul é uma das áreas de elevada incidência (Hongo *et al.*, 2009; Ferlay *et al.*, 2010; Globocan, 2012). No Brasil, o câncer de esôfago é o quarto em óbitos entre os homens e o sétimo em óbitos entre as mulheres. Para o ano de 2016, estima-se 7.950 casos novos de câncer de esôfago em homens e 2.860 casos em mulheres no Brasil (INCA, 2015). O câncer de esôfago é praticamente assintomático. Somente quando há envolvimento circunferencial ou considerável penetração do lúmen, momento onde a doença se encontra em estágios avançados, é que esta se torna sintomática, sendo a disfagia o principal sintoma (Lagergren & Lagergren, 2010). Nesta circunstância, o tratamento costuma resultar em uma sobrevida média de cinco anos em apenas 10% dos pacientes, falecendo a maioria devido à disseminação da doença (Craddock, 1993), o que demonstra a extrema importância em estudar e compreender detalhadamente a evolução desta doença visando um diagnóstico precoce e melhor manejo clínico.

Existem dois tipos histológicos principais de câncer de esôfago: carcinoma epidermóide (CEE) e adenocarcinoma (ADE). Estes dois tipos diferem completamente quanto aos fatores etiológicos associados, às populações afetadas, à localização geográfica, às alterações moleculares e à evolução da neoplasia (Lagergren & Lagergren, 2010).

Segundo a *Worldwide Esophageal Cancer Collaboration* (WECC), o câncer de esôfago no mundo é uma doença de homens idosos, mais encontrada na região distal do esôfago e a prevalência do tipo histológico difere geograficamente: enquanto que o CEE é mais comum no oriente, o ADE está mais presente no ocidente (Figura 1.1) (Hongo *et al.*, 2009; Arnold *et al.*, 2014) e a idade típica de surgimento varia entre 65-70 anos.

O CEE representa o principal tipo histológico de câncer de esôfago em países em desenvolvimento e uma proporção menor em países do primeiro mundo (Craddock, 1993). Uma característica peculiar do CEE é a acentuada variação geográfica de sua incidência, com áreas

de alta incidência margeando áreas em que a incidência desta doença reduz em até dez vezes. As áreas de maior incidência estão localizadas na China, no Norte do Irã, partes da África Oriental, na França e no Brasil (Vizcaino *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2014) (Figura 1.1). No Brasil, a maior incidência de CEE está localizada nas regiões Sul e Sudeste (INCA, 2015).

O ADE apresenta diferenças em quase todos os parâmetros em relação ao CEE. Entretanto, uma das diferenças mais marcantes é a observada quanto às variações nas taxas de incidência reportadas nas últimas décadas em relação a estes dois tumores. Enquanto a incidência do CEE tem apresentado uma queda ou estabilidade, principalmente em regiões onde os fatores etiológicos foram conclusivamente identificados (Vizcaino *et al.*, 2002; Giri *et al.*, 2015), a incidência de ADE apresentou nas últimas três décadas um crescimento vertiginoso (DeMeester, 2009; Arnold *et al.*, 2014). Segundo as estatísticas do *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER) entre 1975 e 2004 houve um aumento de 460% na incidência de ADE em homens brancos nos Estados Unidos (Rice *et al.*, 2009), apresentando a taxa de crescimento mais rápida dentre todos os tipos de câncer e fazendo com que este tipo de câncer de esôfago ultrapasse a frequência de CEE em homens brancos com idade inferior a 55 anos nos Estados Unidos (Brown *et al.*, 2008). Situação semelhante é observada em outros países desenvolvidos, como no Reino Unido, onde a incidência de ADE em homens brancos é a maior do mundo, chegando ao dobro daquelas observadas nos EUA e na Austrália: aproximadamente 4.0-7.0 por 100.000 habitantes (Bollschweiler *et al.*, 2001; Botterweck *et al.*, 2000). Entretanto, o CEE continua sendo o tipo histopatológico mais prevalente, respondendo por aproximadamente 80% dos casos de câncer de esôfago no mundo (Vizcaino *et al.*, 2002). Outra importante diferença observada entre o ADE e o CEE é a razão de incidência entre homens e mulheres, enquanto que para o ADE essa proporção é de 7:1, no CEE é apenas de 3:1. Não se sabe ainda o porquê dessa maior incidência em homens ser mais expressiva em ADE (Rutegard *et al.*, 2010). Em CEE essa razão pode ser explicada em parte pela diferença na exposição aos fatores de risco entre os sexos (Cook *et al.*, 2009). Dentre as semelhanças entre o ADE e o CEE, uma das poucas existentes, é o prognóstico ruim dos pacientes que apresentam estes tumores: a taxa de sobrevivência em cinco anos é de somente 13-15% (Spechler *et al.*, 2010), o que faz com que a prevenção tanto do CEE quanto do ADE seja de absoluta importância.

Adenocarcinoma

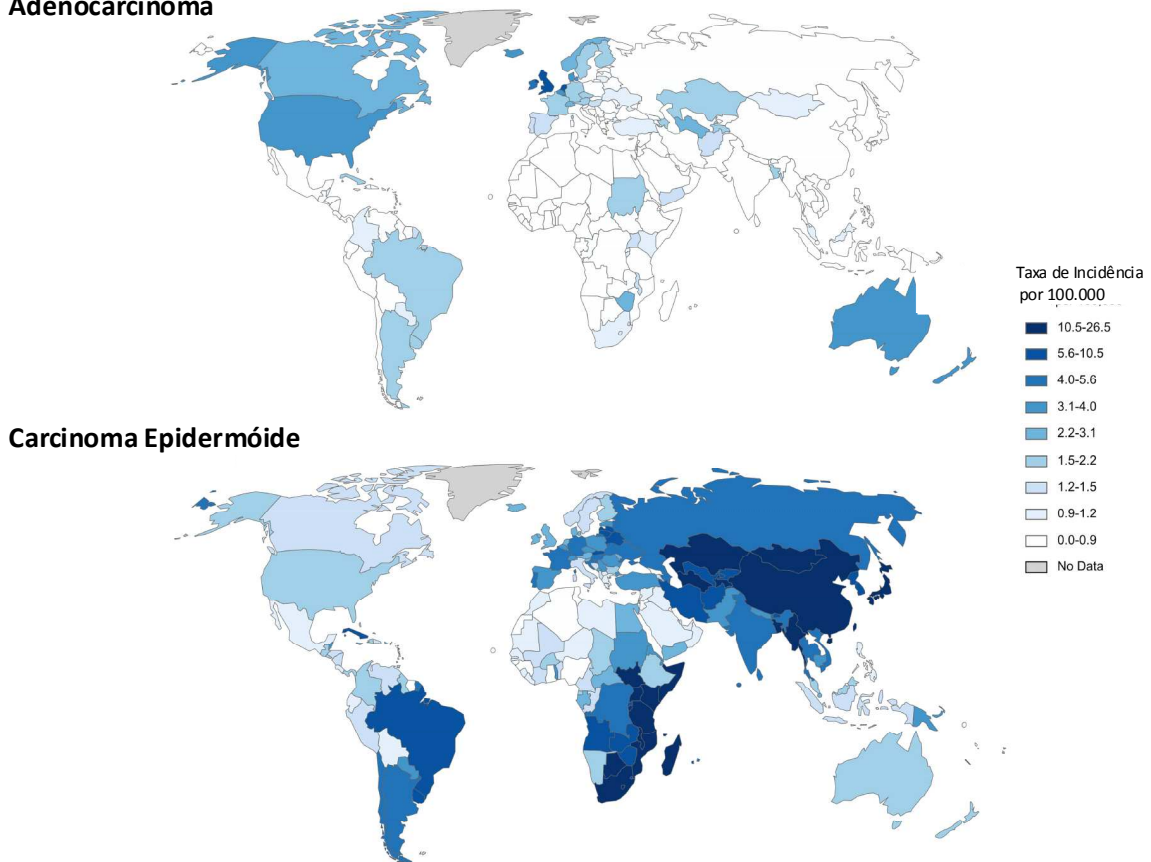


Figura 1.1. Distribuição Geográfica das taxas de incidência para o câncer de esôfago em homens. As taxas de incidência para o ADE estão representadas no mapa superior e para o CEE no mapa inferior. Para o ADE a incidência é mais elevada em países ocidentais e baixa em países asiáticos, enquanto que, para o CEE, a incidência é elevada em países asiáticos e baixa em países ocidentais. A incidência de ADE é elevada nos Estados Unidos, Austrália e Reino Unido. Figura adaptada de Arnold *et al.*, 2014.

1.1.2 Etiologia

1.1.2.1 Carcinoma Epidermóide de Esôfago

Diferentes fatores etiológicos já foram associados às elevadas taxas de incidência de CEE observadas nas regiões demonstradas na Figura 1.1. No Norte da China, o principal fator etiológico associado ao desenvolvimento do CEE é o consumo de alimentos contaminados com nitrosaminas (Tran *et al.*, 2005), enquanto que no Nordeste do Irã é o elevado consumo de ópio (Nasrollahzadeh *et al.*, 2008) e na França é o consumo exacerbado de álcool (Vizcaino *et al.*, 2002). Nos países ocidentais, o uso de cigarro e o consumo de álcool são importantes fatores de risco primários e são responsáveis por 75-90% dos casos dessa neoplasia (Vizcaino *et al.*, 2002)

(Figura 1.2). Análises que reuniram dados de estudos caso-controle mostraram haver interação sinérgica entre os hábitos de fumar e de ingerir álcool (Castellsangue *et al.*, 1999; Kamangar *et al.*, 2009). As duas exposições, quando presentes em quantidades moderadas, aumentaram o risco para o desenvolvimento de CEE em 12 e 19 vezes em homens e mulheres, respectivamente (Demeester, 2009).

O papel carcinogênico do álcool vem de seu produto metabólico, o acetaldeído. O etanol é convertido em acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase (ADH), que é, por sua vez, convertido em acetato pela enzima acetaldeído desidrogenase (ALDH). Então, o consumo de grandes quantidades de álcool e polimorfismos que aumentem a atividade de ADH ou diminuam a atividade de ALDH resultam em maior exposição ao acetaldeído. O acetaldeído é capaz de causar mutações pontuais, proliferação celular, inibir o reparo e a metilação do DNA (Choi *et al.*, 1999; Evans & Fenech, 2011; Leon-Buitimea *et al.*, 2012).

O papel carcinogênico do consumo de tabaco pode ser facilmente explicado, uma vez que é uma fonte importante de diversos carcinógenos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), nitrosaminas e também de acetaldeído (Choi *et al.*, 1999; Hecht *et al.*, 2003). Os HPA são capazes de induzir mutações no gene supressor de tumor *TP53* (Piusieux *et al.*, 1991). Esses carcinógenos são encontrados também na dieta, em carnes defumadas e grelhadas (Roshandel *et al.*, 2012), sendo o consumo desse tipo de alimento também associado ao desenvolvimento do CEE (Hongo *et al.*, 2009).

Além dos HPAs, encontramos no tabaco grandes quantidades de nitrosaminas. Como a maior parte dos carcinógenos ambientais, as nitrosaminas precisam ser metabolizadas para induzir tumores (Pinto *et al.*, 2003). As principais enzimas envolvidas na sua metabolização são as Citocromo P450 (CYP), que geram um produto eletrofílico e instável que é capaz de interagir com o DNA e, assim, induzir mutações (Pinto *et al.*, 2003; Jakszyn *et al.*, 2006). Nosso grupo demonstrou, em uma população brasileira, que o esôfago humano expressa o CYP2A6 e o CYP2E1, que são capazes de metabolizar e ativar diversas nitrosaminas. Ambas as enzimas foram encontradas expressas no terço médio e distal do esôfago, regiões onde há maior prevalência do CEE (Godoy *et al.*, 2002).

Contudo, o principal conteúdo do cigarro é a nicotina (Russo *et al.*, 2012). Inicialmente, acreditava-se que a nicotina era responsável apenas por gerar a dependência ao cigarro, contudo, recentes trabalhos demonstraram que a nicotina mesmo não sendo capaz de induzir

diretamente o desenvolvimento do câncer é capaz de levar a promoção e progressão tumoral (Russo *et al.*, 2012; Ambrosio e Becchetti, 2013; Zhao, 2016). A nicotina se liga ao receptor acetilcolínico de nicotina (nAChR) em células musculares e neuronais e é capaz de ativar diversas vias, como ativação da quinase serina-treonina (AKT) e da proteína quinase A (PKA) (Zhao, 2016). No entanto, já foi demonstrada a expressão desses receptores em várias células não neuronais e musculares, como queratinócitos, células epiteliais brônquicas, orais e do trato gastrointestinal, linfócitos e macrófagos (Wessler *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2009; Ecleton *et al.*, 2013). Em um trabalho realizado pelo nosso grupo, foi demonstrado que o esôfago normal humano expressa diversos tipos de nAChRs (Chianello *et al.*, 2016). Os receptores nicotínicos também são encontrados em diversas células tumorais, incluindo câncer de pulmão, câncer pancreático e câncer de esôfago (Ecleton *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014; Zhao, 2016). A ligação da nicotina ao seu receptor é capaz de induzir proliferação celular, migração celular e angiogênese em diversos tipos de tumores (Heeschen *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2008; Dagupta *et al.*, 2009). No esôfago, já foi visto que a nicotina é capaz de induzir migração e invasão em linhagens celulares de CEE, e que essa indução ocorre, em parte, através da ativação da via de COX-2 (Liu *et al.*, 2008; Zong *et al.*, 2009). Em outro trabalho, também foi demonstrado que a nicotina é capaz de levar à metilação de genes supressores de tumor em linhagem celular de epitélio esofágico normal (Soma *et al.*, 2006). As nitrosaminas derivadas da nicotina, como a 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanone (NNK) e a N'-nitrosonornicotina (NNN), também são capazes de ativar os nAChR (Ambrosio e Becchetti, 2013). Em um estudo realizado com a linhagem celular de esôfago normal imortalizada Het1a, foi observado que tanto a NNK quanto a NNN são capazes de ativar os nAChR e levar ao aumento da proliferação, além de produzir um efeito anti-apoptótico (Arredondo *et al.*, 2006).

Outro fator de risco importante para o CEE é o consumo de bebidas quentes, como o consumo de chá mate (chimarrão) nas regiões do sul da América do Sul, incluindo o Brasil, e o consumo de chá na China e no Irã (Castellsague *et al.*, 2000; Islami *et al.*, 2009; Lubin *et al.*, 2013). Dois recentes trabalhos de meta análise demonstraram risco aumentado para CEE entre os consumidores de bebidas quentes, tanto na América do sul quanto na Ásia (Andrici *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015) Há duas possíveis explicações para a participação do consumo de chimarrão na carcinogênese do CEE: a lesão térmica causada pelas altas temperaturas nas quais a bebida é ingerida e a exposição consequente a HPA presente na erva mate (Islami *et al.*,

2009). Em um trabalho recente do nosso grupo foi demonstrado que a injúria térmica é capaz de levar à displasia do epitélio esofágico normal em modelo animal (Rapozo *et al.*, 2016). Além disso, vários trabalhos encontraram grandes quantidades de HPA na erva mate processada e também marcadores de HPA na urina de consumidores de erva mate (Schlemitz *et al.*, 1997; Fagundes *et al.*, 2006). No entanto, mais trabalhos devem ser realizados para confirmar o possível papel carcinogênico do consumo de chimarrão.

Um fator de risco controverso em CEE é o Papiloma Vírus Humano (HPV) (Syrjanen, 2002; Koh *et al.*, 2008). Sabe-se que o HPV é um vírus com potencial oncogênico, que já foi associado a diversas neoplasias, sendo o carcinoma de células escamosas do colo uterino o mais importante (Bansal *et al.*, 2016). A detecção do HPV em outros tumores de células escamosas, como o tumor de orofaringe, levou a pesquisa da presença desse vírus no CEE por diversos grupos. Esses estudos demonstraram que a taxa de infecção por HPV em CEE no mundo varia entre 11,7 e 38,9 % (Liu *et al.*, 2013; Yong *et al.*, 2013; Hardefeld *et al.*, 2014). Essa grande variação na taxa de infecção se deve principalmente a diferenças regionais, sendo que em regiões do mundo onde há maior incidência de CEE, também foi observada maior taxa de infecção por HPV (Syrjanen *et al.*, 2002; Ludmir *et al.*, 2014). No entanto, poucos trabalhos conseguiram associar a infecção com a atividade oncogênica causada pelo HPV em CEE (Herbster *et al.*, 2012; Ludmir *et al.*, 2014). Em trabalho do nosso grupo, realizado em população brasileira, foi demonstrado que esse fator não é importante para formação do CEE (Herbster *et al.*, 2012). Recentemente o IARC declarou que as evidências existentes sobre a relação entre o HPV e o CEE são inadequadas.

Além desses fatores etiológicos, uma nutrição deficiente em vitaminas e minerais, resultante diretamente de uma baixa condição sócio-econômica ou indiretamente associada ao alcoolismo, tem sido enfatizada como uma condição que parece estar presente em todas as diferentes áreas geográficas com alta prevalência de CEE (Craddock, 1993). Já o consumo de frutas e vegetais parece exercer um fator protetor (Hongo *et al.*, 2009).

1.1.2.2 Adenocarcinoma de Esôfago

O ADE possui uma etiologia complexa no que diz respeito ao seu desenvolvimento (Figura 1.2). Entre os principais fatores de risco podemos destacar: refluxo gastroesofágico, esôfago de Barrett (EB), obesidade e tabaco (Badreddine & Wang, 2010).

O EB é uma condição clínico-patológica que foi primeiramente descrita em 1956 por Norman Barrett como um epitélio gástrico cobrindo a parte distal do esôfago (Gilbert *et al.*, 2011; Barrett, 1956). Atualmente, a definição mais amplamente aceita é a de substituição do epitélio estratificado pavimentoso não-queratinizado do esôfago distal por um epitélio colunar com evidências histológicas da presença de metaplasia intestinal em amostras de biópsia (Wang *et al.*, 2008). Este epitélio colunar metaplásico é caracterizado pela presença de células intestinais, como a célula de Goblet. A prevalência de EB na população geral é estimada em 1,6% a 6,8% (Saadi & Fitzgerald, 2006; Gilbert *et al.*, 2011). Esta alteração é mais comum em pacientes que apresentam refluxo gastroesofágico crônico (7% da população), sendo 10-20% dos casos de EB detectados em pacientes apresentando essa condição. O EB pode ser classificado de acordo com o grau de displasia em: sem displasia, displasia de baixo grau ou displasia de alto grau. A presença de displasia de baixo grau é um indicador de risco aumentado para desenvolver displasia de alto grau e ADE (Conio *et al.*, 2003), sendo que, pacientes com EB apresentam um risco 100 vezes maior de desenvolver ADE (Sharma *et al.*, 2006; Yousef *et al.*, 2008). Dessa forma, diferentemente do que é observado para o CEE, o ADE apresenta uma evolução bem definida de metaplasia-displasia-carcinoma, oferecendo, assim, uma oportunidade para a investigação da gênese deste tumor.

O refluxo gastroesofágico é uma doença e já foi provado ser o principal fator de risco para o desenvolvimento do EB. Acredita-se que o dano agudo da mucosa esofágica causado pelo refluxo ácido leva a um processo de cicatrização que favorece a formação de um epitélio colunar metaplásico, já que esse é mais resistente ao ácido do que o epitélio pavimentoso, no entanto, é mais predisposto à carcinogênese. Ou seja, o EB aparece como uma forma de proteção do epitélio esofágico ao refluxo ácido crônico (Shaheen *et al.*, 2009; Sharma, 2009; Spechler *et al.*, 2010). Além disso, já foi descrito que indivíduos com sintomas de refluxo recorrentes apresentam um aumento de 7-8 vezes no risco de desenvolver ADE (Lagergren *et al.*, 1999).

Em relação ao conteúdo do refluxo ácido de pacientes com doença do refluxo gastroesofágico, já foi descrito que diferentes ácidos biliares estão presentes no mesmo, entre eles: ácido cólico, ácido glicocólico e, principalmente, os ácidos biliares secundários como o ácido desoxicólico e ácido taurodesoxicólico (Nehra *et al.*, 1999). Os ácidos biliares são sintetizados a partir do colesterol no fígado e são liberados no intestino onde facilitam a absorção de lipídios e de vitaminas lipossolúveis da dieta. A maior parte desses ácidos biliares é reabsorvida no intestino, voltando para o fígado e são, então, resecretados pela bile. No entanto, uma parte atinge o colón onde são convertidos pelas enzimas da flora bacteriana de ácidos biliares primários, aqueles sintetizados no fígado, como ácido cólico (AC) e ácido chenodeoxicólico (CDCA), em ácidos biliares secundários, mais hidrofóbicos e tóxicos, como o ácido desoxicólico (DCA) e ácido litocólico, respectivamente. Os ácidos biliares em alta concentração são tóxicos e por isso sua síntese, metabolismo e transporte são bem regulados. O dano causado pela exposição prolongada a altas concentrações de ácidos biliares induz uma proliferação tecidual reparativa (Souza *et al.*, 2008). No esôfago, o dano causado pelos ácidos biliares e o ácido clorídrico (HCl), presentes no refluxo, levam à irritação do epitélio induzindo uma reação inflamatória e proliferativa. Parte desses efeitos está relacionada a alterações nas principais vias celulares, incluindo: COX-2, CDX2, PI3K, JNK, MAPK, Akt, algumas citocinas como TNF α , IL1 β e IL6, além de alguns fatores de crescimento e seus receptores como EGFR (Jiang *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Huo *et al.*, 2011). Além disso, os ácidos biliares são capazes de causar danos ao epitélio esofágico e levar ao desenvolvimento do EB através da indução de alterações mitocondriais, de estresse oxidativo e dano ao DNA (Bernstein *et al.*, 1999; Payne *et al.*, 2005; Bernstein *et al.*, 2005). O dano causado pelos ácidos biliares ainda é potencializado pela presença do ácido no conteúdo do refluxo (Jankowski *et al.*, 2000).

Além do refluxo gastroesofágico e do EB, a obesidade é um fator de risco já bem estabelecido para o ADE. Diversos estudos caso-controle e coortes já descreveram essa associação (Lagergren, 2011; Kant & Hull, 2011). Uma recente revisão sistemática da literatura resume essa associação positiva entre o índice de massa corporal (IMC) e o ADE, demonstrando que pacientes com sobrepeso (IMC de 25-29,9) apresentam risco aumentado em 1,5 vezes para o desenvolvimento deste câncer podendo chegar a 2,4 vezes em pacientes obesos (IMC > 30Kg/m²) (Kubo *et al.*, 2006). No entanto, trabalhos mais recentes associaram a obesidade abdominal, e não o IMC, ao aumento do risco para desenvolver EB (Corley *et al.*,

2007; Eldestein *et al.*, 2007). Esse tipo de obesidade é mais comum em homens e foi, então, levantada à hipótese de que a obesidade central poderia explicar a significativamente mais elevada prevalência de ADE em homens do que em mulheres. De uma forma geral, a obesidade é associada ao risco aumentado para o desenvolvimento de diversos tipos de cânceres, como o de tireóide, colón, rim, mama, pâncreas e endométrio (Kant & Hull, 2011). No entanto, a associação entre obesidade e ADE parece ser mais forte do que nos outros tumores acima citados (Lagergren *et al.*, 1999; Calle *et al.*, 2003; Renehan *et al.*, 2008). Essa relação se torna ainda mais preocupante devido ao alarmante crescimento da obesidade no ocidente. Um estudo realizado entre 1999 e 2010 pelo *National Health and Nutrition Examination Survey* confirmou que mais de 32% dos adultos eram considerados obesos nos EUA (Ogden *et al.*, 2012). No Brasil os dados também são preocupantes, pois de acordo com o IBGE, metade da população adulta está com sobrepeso. Além disso, também foi reportado que 12,5% dos homens e 16,9% das mulheres eram obesos em 2008-2009, comparados a 2,8% dos homens e 8% das mulheres em 1974 (IBGE).

Os mecanismos que ligam a obesidade ao desenvolvimento do ADE não estão muito bem estabelecidos. Existem na literatura duas principais linhas que tentam explicar os mecanismos dessa associação: uma física e outra metabólica. Na primeira, o aumento da pressão abdominal causada pelo excesso de peso levaria a um aumento do refluxo nesses indivíduos, e conseqüente elevação no risco de desenvolvimento de EB. No entanto, diversos trabalhos demonstraram que a associação entre o IMC e o ADE era independente de qualquer sintoma de refluxo (Chow *et al.*, 1998; Lindblad *et al.*, 2005; Whiteman *et al.*, 2008). A segunda explicação seria a metabólica. O tecido adiposo abdominal é um tecido biologicamente ativo e é capaz de secretar diversos fatores, dentre esses, a interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF α), leptina, grelina, adiponectina entre outros (Arita *et al.*, 1999; Yildiz *et al.*, 2004). A leptina é um hormônio preferencialmente secretado por adipócitos e atua na regulação do apetite e na homeostase energética (Denver *et al.*, 2011; Li, 2011). Seus níveis estão aumentados no soro de indivíduos obesos (Yildiz *et al.*, 2004). *In vitro*, já foi demonstrado que a Leptina é mitogênica em diversos tipos celulares (Hardwick *et al.*, 2001; Ogunwobi *et al.*, 2006). A adiponectina é um peptídeo secretado primariamente de adipócitos viscerais e seus níveis séricos são inversamente associados à obesidade. A adiponectina inibe a inflamação e promove a apoptose, tendo sido sua deficiência já

relacionada ao desenvolvimento de diversos tumores (Kelesidis *et al.*, 2006; Perrier & Jardé, 2012). No esôfago, já foi detectado um aumento dos níveis séricos de leptina em pacientes com ADE e diminuição dos níveis de adiponectina (Rubenstein *et al.*, 2008). Além disso, foi observado um aumento na expressão do receptor de leptina em ADE (Howard *et al.*, 2010). *In vitro*, a adiponectina foi capaz de induzir apoptose numa linhagem celular de ADE (Konturek *et al.*, 2008), enquanto que a leptina induziu o crescimento celular quando administrada junto com ácido em linhagem de ADE, além de acarretar aumento na proliferação celular via ativação de COX-2 (Ogunwobi *et al.*, 2006; Beales & Ogunwobi, 2007).

Enquanto que para o CEE o fumo representa, junto ao consumo de álcool, o principal fator de risco, em ADE a associação com fumo é moderada. Os fumantes apresentam um aumento de duas vezes no risco de desenvolver o ADE (Anderson *et al.*, 2007; Whiteman *et al.*, 2008). Em estudos caso-controle e coorte foi observado uma associação dose resposta entre o consumo de tabaco e o desenvolvimento de ADE, demonstrando uma possível relação causal (Wu *et al.*, 2001; Freedman *et al.*, 2007). No entanto, nenhum estudo foi realizado para descrever os mecanismos pelos quais o tabaco induz ADE.

Também existem fatores protetores para o desenvolvimento do ADE. A infecção por *Helicobacter pylori* apresenta associação inversa com a presença de EB e ADE (Rokkas *et al.*, 2007). Os mecanismos que levam a essa proteção ainda não estão totalmente esclarecidos, mas acredita-se que, como a infecção por *H.pylori* leva a uma diminuição na produção do suco gástrico, o dano causado por um eventual refluxo gastresofágico seria menor (Xu *et al.*, 2015). Outro fator protetor, que também é comum ao CEE, é o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), como a aspirina. Em uma revisão sistemática recente de trabalhos observacionais avaliando o uso de aspirina ou outros AINEs e a incidência de câncer de esôfago (CEE e ADE), foi demonstrada uma redução de 33% no risco relativo para desenvolver câncer de esôfago em pacientes que faziam uso dessas drogas (Das *et al.*, 2009).

Fatores Etiológicos

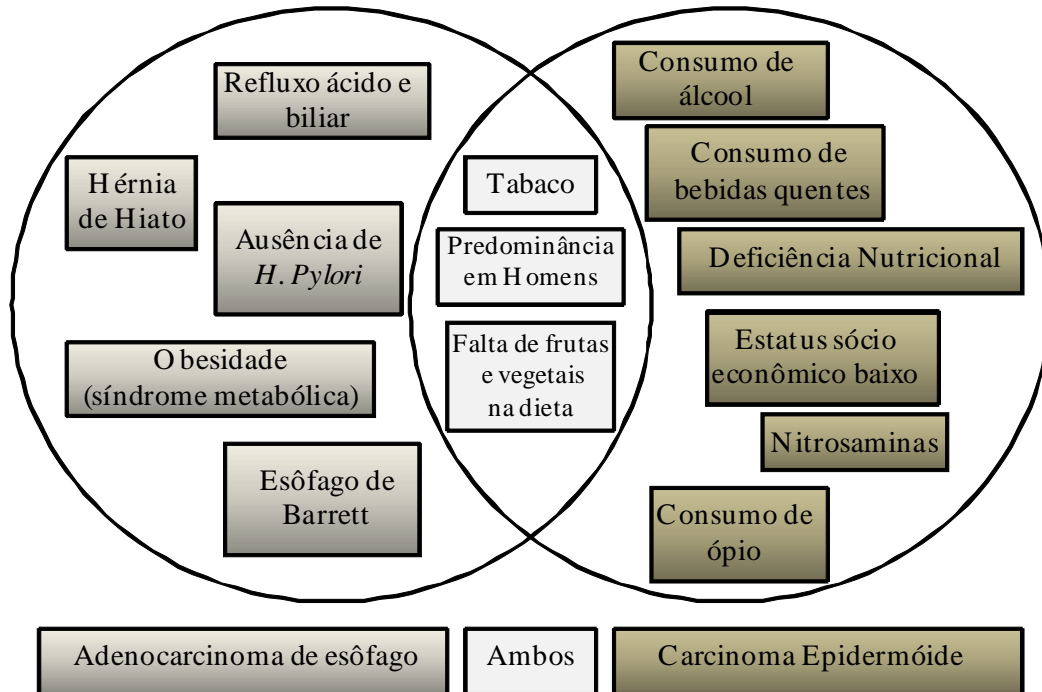


Figura 1.2. Etiologias conhecidas comuns e específicas de Adenocarcinoma de Esôfago (ADE) e Carcinoma Epidermóide de Esôfago (CEE). O ADE apresenta como fatores etiológicos exclusivos o refluxo ácido e biliar, hérnia de hiato, ausência de infecção com *Helicobacter pylori*, obesidade e Esôfago de Barrett. O CEE tem como fatores etiológicos exclusivos o consumo de álcool, tilose, acalase, estatus sócio econômico baixo e deficiência nutricional de zinco, magnésio, riboflavina. Em comum a ambas as neoplasias, figuram como fatores de risco associados o consumo de tabaco, predominância em homens e falta de frutas e vegetais na dieta. Adaptado Cohen *et al.*, 2011

1.1.3 Principais Alterações Moleculares em Câncer de Esôfago

Diversas alterações moleculares que garantem a aquisição dos ‘hallmarks’ do câncer já foram descritas em câncer de esôfago (Saadi & Fiyzgerald, 2006).

O gene *TP53* é o gene mais frequentemente mutado em cânceres humanos (Shimada *et al.*, 1997; Hanahan & Weinberg, 2011) e codifica uma proteína cuja principal função é se ligar especificamente ao DNA e agir como fator de transcrição. Em células normais esta proteína é sintetizada continuamente, mas não se acumula em níveis significativos. No entanto, quando as células são expostas a agentes que causam danos ao DNA, a proteína se torna estável e passa a transativar diversos genes que codificam efetores do ciclo celular,

realizando uma parada em G1, e genes efetores da apoptose (Hainaut & Hollstein., 2000). Mutações em *TP53* são as alterações mais comumente encontradas em câncer de esôfago, estando presente em aproximadamente 70% dos casos (Bellini *et al.*, 2012).

As mutações em *TP53*, presentes em diversos tipos tumorais, deixam as impressões digitais dos carcinógenos a que as células foram expostas. Em cada região geográfica e subtipo histopatológico é encontrado um perfil mutacional que reflete os fatores etiológicos associados ao desenvolvimento do câncer de esôfago. Em amostras de CEE provenientes da Europa, é observada uma grande proporção de transições A:T (31%) no gene *TP53*, que são reflexos da exposição a metabólitos do álcool, enquanto que, na China, há uma alta prevalência de mutações G:C, relacionadas à exposição as nitrosaminas e ao consumo de chá quente (Liang *et al.*, 1995; Sepehr *et al.*, 2001). No Brasil, o perfil mutacional de *TP53* varia de acordo com a região analisada. Na região Sudeste, o tipo de mutação mais frequentemente encontrada no *TP53* é a transição A:T, enquanto que, na região Sul, é a mutação G:C (Putz *et al.*, 2002; Rossini *et al.*, 2010). Dessa forma, o tipo de mutação em *TP53* da região Sudeste do Brasil se assemelha ao encontrado na Europa, onde os principais fatores de risco associados são o fumo e o consumo de álcool, enquanto que, as mutações encontradas em *TP53* na Região Sul do Brasil se assemelham às encontradas na China e em ambas as regiões o consumo de bebidas quentes é o fator de risco que parece desempenhar o papel mais importante para o desenvolvimento de CEE (Putz *et al.*, 2002; Rossini *et al.*, 2010).

As mutações mais frequentes no gene *TP53* em ADE são as transições em dinucleotídeos CpG (69%). Estas mutações possivelmente surgem espontaneamente, sugerindo um mecanismo mutacional endógeno, cuja causa mais provável é a inflamação (Montesano *et al.*, 1996; 1998; Madami *et al.*, 2010). Existe um aumento gradual no número de mutações no gene *TP53* durante a transformação do EB para o ADE (Moore *et al.*, 1994; Ireland *et al.*, 1997), sugerindo que as alterações nesse gene possam ocorrer como um evento precoce na evolução de EB a ADE (Montesano *et al.*, 1996).

Além disso, diversos genes envolvidos na regulação da proliferação celular encontram-se alterados em ADE e CEE. Dentre eles, podemos citar a ciclina D1, cuja expressão protéica nuclear é encontrada aumentada em até 71% dos casos de CEE, 64% dos casos de ADE e já é encontrada alterada em EB; níveis baixos da expressão protéica de p27 são observados em 83% dos casos de ADE e redução na expressão do gene *p16* é encontrada em 62% casos de

CEE e em 54% dos casos de ADE (Arber *et al.*, 1999; Bani-Kani, 2000; Simão *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009; Taghavi *et al.*, 2010). A redução na expressão da maioria desses genes ocorre através de alterações epigenéticas.

A alteração epigenética mais comumente descrita e estudada na carcinogênese é a metilação aberrante do DNA. Em ADE, alterações no padrão de metilação de promotores de diversos genes já foram descritas, como a hipermetilação de genes envolvidos na regulação do ciclo celular (*Rb*, *p16* e *APC*), no reparo de DNA (como *MGMT*) e na adesão celular (*E-caderina*) (Corn *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2009; Kuester *et al.*, 2009; Poehmann *et al.*, 2012; Kaz & Grady, 2012). Em CEE, um trabalho recente do nosso grupo demonstrou, através da análise do perfil de metilação da região promotora de mais de 800 genes, alterações no perfil de metilação tanto das amostras de CEE analisadas quanto das mucosas adjacentes a esses tumores, mostrando que essas alterações já ocorrem precocemente no desenvolvimento do tumor (Lima *et al.*, 2011).

Apesar da semelhança em relação às alterações em genes que regulam o ciclo celular entre ADE e CEE, existem alterações moleculares específicas para cada subtipo histopatológico. A principal diferença ocorre na expressão de receptores de fatores de crescimento da família dos receptores epidermais de fatores de crescimento (EGFR). Esses receptores atuam, principalmente, na proliferação e sobrevivência celular, através da ativação das vias de PI3K, STAT3 e Ras-Raf-MAPK. Os principais membros dessa família de receptores que se encontram alterados em câncer são EGFR1 (também conhecido com HER1) e EGFR2 (também conhecido com HER2) (Sergina & Moasser, 2007). Em tumores de esôfago, já foi descrita a amplificação gênica de EGFR2 em 15-20% dos casos de ADE e em apenas 0-5% dos casos de CEE (Reichelt *et al.*, 2007; Schoppmann *et al.*, 2010; Maresch *et al.*, 2011; Gonzaga *et al.*, 2012). Em relação ao EGFR1, já foi observado um aumento da expressão proteica de EGFR1 em 46% dos casos de ADE e em apenas 4% dos casos de CEE (Gonzaga *et al.*, 2012; Navarini *et al.*, 2012; Pretto *et al.*, 2013). Além do aumento da expressão, mutações em EGFR1 também são encontradas em tumores. Em trabalho recente do nosso grupo, não foi observada nenhuma mutação do gene *EGFR1* (Gonzaga *et al.*, 2012) e em trabalho realizado com população asiática foi observado apenas 2,6% de casos com mutações já descritas no gene de EGFR1, ambos em amostras de CEE (Abedi-Ardekani *et al.*,

2012). Juntos esses dados sugerem que as vias ativadas pelos receptores EGFR1 e EGFR2 são mais importantes para o desenvolvimento do ADE do que do CEE.

Outra alteração específica e de extrema importância para formação do EB e evolução para o ADE ocorre no gene *CDX2*. Esse gene dirige e mantém a diferenciação intestinal durante o desenvolvimento desse órgão e normalmente não é expresso no esôfago, no entanto, possui expressão ectópica aumentada em metaplasias intestinais como o EB (Souza *et al.*, 2008; Delinger & Thompson, 2012). Já foi reportado um aumento de 400 vezes na expressão protéica de *CDX2* no EB em relação ao esôfago normal adjacente, que tinha níveis de expressão quase indetectáveis. Esse aumento já era observado desde amostras de EB sem displasia até amostras de ADE (Phillips *et al.*, 2003; Groisman *et al.*, 2004; Vallbohmer *et al.*, 2006). O gene *CDX2* codifica um fator de transcrição homônimo que ativa a expressão de diversos genes ligados ao fenótipo intestinal como: Mucina-2, Vilina, entre outros, que também foram descritos como superexpressos no EB (Braunstein *et al.*, 2002; Steininger *et al.*, 2005; Delinger & Thompson, 2012). Estudos recentes demonstraram que a indução da expressão de *CDX2* em células epiteliais esofágicas humanas e murinas ocorre após a exposição dessas células aos ácidos biliares (Marchetti *et al.*, 2003; Kazumori *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2007; Avissar *et al.*, 2009). Além disso, foi visto que a ativação da expressão de *CDX2* pelos ácidos biliares em linhagem de epitélio escamoso esofágico ocorre através da transativação de EGFR1 (Avissar *et al.*, 2009). Em modelos murinos de refluxo crônico foi observado aumento da expressão de *CDX2* em epitélio esofágico escamoso (Tatsuta *et al.*, 2005; Pera *et al.*, 2007). A construção de um camundongo transgênico cuja expressão de *CDX2* no epitélio escamoso era dirigida pelo promotor da queratina 14 demonstrou que *CDX2* tem papel importante no desenvolvimento do EB. Primeiro foi observado que a expressão de *CDX2* estava associada a uma redução na proliferação das células epiteliais basais e alteração na sua morfologia e, segundo, foram detectadas células intermediárias entre o fenótipo escamoso e o colunar. Por fim, foi visto que a expressão de *CDX2* estava associada ao aumento do espaço entre as células basais e diminuição da adesão entre as células (Kong *et al.*, 2011).

Podemos observar então que o CEE e ADE apresentam alterações moleculares comuns e alterações específicas, muito provavelmente associadas às diferenças em relação as exposições aos fatores de risco associados.

1.1.4 Inflamação e câncer de esôfago

1.1.4.1 Inflamação e câncer

A conexão entre inflamação e o câncer não é recente. Desde meados do século XIX, foi demonstrado que a irritação crônica poderia levar ao desenvolvimento do câncer e que células inflamatórias estavam presentes em amostras humanas de tumores (Balkwill & Mantovani, 2001; Abel-Latif *et al.*, 2009; Poehmann *et al.*, 2012). Após esse trabalho, diversos estudos epidemiológicos já demonstraram que doenças caracterizadas por terem reações inflamatórias predis põem os órgãos em questão ao desenvolvimento do câncer (Coussens & Werb, 2002; Zhao *et al.*, 2016). Além disso, 25% de todos os cânceres humanos têm seu desenvolvimento e/ou progressão associados à inflamação (Hussain & Harris, 2007).

A inflamação é causada por diversos fatores como, por exemplo, diferentes danos químicos e exposição a irritantes. Esses danos desencadeiam uma série de eventos, como infiltração de células imunes e liberação de citosinas, que culminam na resposta inflamatória e dano tecidual (Coussens & Werb, 2002; Hussain & Harris, 2007; Zhao *et al.*, 2016). As células imunes inflamatórias geram espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem levar a mutações que potencialmente acarretam a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor no tecido afetado, contribuindo para o desenvolvimento do câncer (Abel-Latif *et al.*, 2009). Além disso, já foi demonstrado que inflamação também pode induzir alterações epigenéticas que participam do processo de carcinogênese (Hahn *et al.*, 2008). A persistência da inflamação leva ao aumento da liberação de mediadores pró-inflamatórios como citosinas, prostaglandinas, quimiocinas e ROS. Esses mediadores são capazes de promover o crescimento celular, invasão celular, induzir mutagênese e aumentar a angiogênese (Abel-Latif *et al.*, 2009).

Alguns componentes da inflamação tem seu papel já bem estabelecido na carcinogênese, dentre eles podemos citar o fator de transcrição Fator Nuclear Kappa B (NFκB). NFκB é encontrado no citoplasma em sua forma inativa, como um heterodímero composto pelas subunidades p50 e p65, ligado a sua molécula inibidora (IκB). Uma série de estímulos são capazes de induzir a degradação de IκB, liberando NFκB para translocar para o

núcleo e induzir a expressão de diversos genes (Baeuerle & Henkel, 1994). Estes genes ativados por NFκB incluem aqueles envolvidos na promoção da proliferação celular, evasão da apoptose, promoção da angiogênese, invasão e metástase (Karin *et al.*, 2002) (Figura 1.3). O NFκB pode ser ativado por uma variedade de agentes, incluindo estímulos oxidativos e inflamatórios, mas também pode ser induzido por sinais do microambiente (Karin *et al.*, 2002).

Dentre os receptores que são capazes de induzir a ativação de NFκB e que recentemente tem apresentado papel importante na carcinogênese, são os receptores Toll-like (TLR). Os TLRs são uma família de receptores transmembrana, atualmente com 13 membros, que reconhecem vários padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e à danos celulares (DAMPs) (Dajon *et al.*, 2016). São principalmente expressos em células imunes e apresentam um papel importante na inflamação, pois são conhecidos ativadores do fator de transcrição NFκB (O'Neill & Bowie, 2007) (Figura 1.3). Podemos encontrar TLR também em células endoteliais, epiteliais e mais recentemente em tumores (Dajon *et al.*, 2016).

A ativação de TLR é capaz também de induzir a expressão gênica de *COX-2*, que apresenta sítios de ligação para NFκB em sua região promotora (Abdel-Latif *et al.*, 2009). *COX-2* é a enzima chave na biosíntese de prostaglandinas, mediadores centrais da inflamação (Smith *et al.*, 2000). Diversos trabalhos epidemiológicos e funcionais já estabeleceram o papel de *COX-2* na carcinogênese (Wu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015). Os mecanismos pelos quais *COX-2* atua no desenvolvimento de tumores são: aumento da proliferação, resistência a apoptose, indução da angiogênese e a modulação da capacidade invasiva das células tumorais (Tsuji *et al.*, 1998; Nzeako *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2010). Já foi descrito também, que o aumento da expressão de *COX-2* induz o acúmulo de Prostaglandina E2 (PGE2) em tecidos neoplásicos (Wang & Dubois, 2006). Podemos observar o resumo dessa via na Figura 1.3.

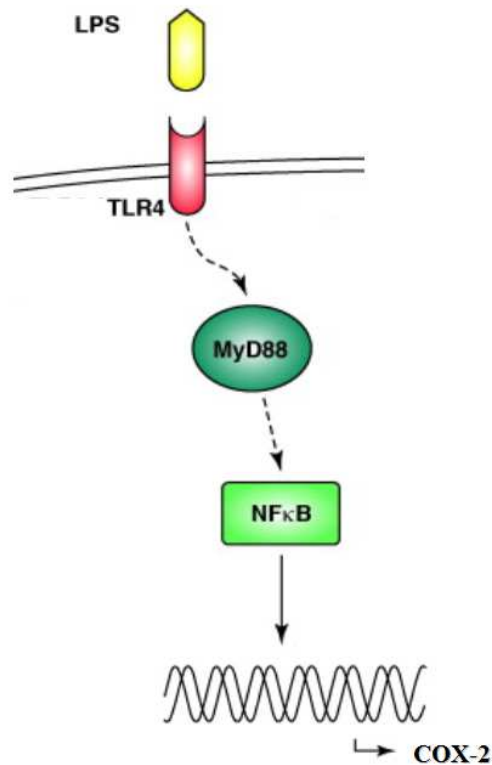


Figura 1.3. Esquema gráfico da via de sinalização envolvendo a ativação do receptor Toll-Like 4 (TLR). O Receptor TLR4 é ativado por seu ligante específico, o lipopolissacarídeo (LPS). Esta ativação irá desencadear uma cascata de sinalização envolvendo a ativação de MyD88. Este por sua vez irá induzir a ativação da via de NFκB, que irá translocar para o núcleo levando a ativação de genes envolvidos da resposta inflamatória, como aqui exemplificado, o gene de *COX-2*. Adaptado de Condamine & Gabrilovich, 2011

1.1.4.2 Inflamação em câncer de esôfago

Diversos trabalhos têm sido realizados com intuito de melhor entender o papel da inflamação na carcinogênese esofágica (Anderson *et al.*, 2006; Abel-Latif *et al.*, 2009; Rousseau *et al.*, 2013; Abdel-Latif *et al.*, 2016;).

No desenvolvimento de ADE foi visto que: pacientes com refluxo gastroesofágico crônico e EB, a exposição aos ácidos biliares e a acidez podem causar dano tecidual e inflamação crônica. No epitélio esofágico normal a inflamação pode ser resolvida de duas maneiras, ou pela regeneração de novas células escamosas ou pela reposição das células danificadas por células colunares, como acontece no EB (Abel-Latif *et al.*, 2009). O dano crônico associado aos ácidos biliares e a acidez podem induzir a produção de ROS no tecido esofágico, causando dano ao DNA e levando a ativação de vias de sinalização que culminam

com a expressão de COX-2 (Song *et al.*, 2007). Além disso, como dito anteriormente, a inflamação causa a infiltração do tecido por células inflamatórias e liberação de citosinas. No esôfago, já foi descrito a presença de linfócitos T e B, células dendríticas e macrófagos em amostras de EB (Bobryshev *et al.*, 2009) e níveis elevados das citosinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-1 β em biópsias de esofagite e EB, além de um aumento mais drástico em amostras de ADE (O’Riordan *et al.*, 2005). Em CEE, foi demonstrada a presença aumentada de eosinófilos e macrófagos, em relação ao tecido normal. Esse aumento observado estava associado ao potencial metastático do tumor. Casos com metástase linfonodal apresentavam maior número de células inflamatórias infiltradas do que aqueles casos sem (Ohashi *et al.*, 2000). Em outro trabalho, foi observado que o aumento de neutrófilos intra-tumorais em amostras de CEE, estava associado a uma menor sobrevida livre de doença (Wang *et al.*, 2014).

Em linhagens de ADE foi visto que os ácidos biliares e a acidez eram capazes de induzir a ativação de NF κ B (Abdel-Lati *et al.*, 2004; Jenkins *et al.*, 2004; Duggan *et al.*, 2006; Abdel-Lati *et al.*, 2015; Abdel-Lati *et al.*, 2016). Em amostras humanas, foi descrito que NF κ B não é encontrado ativado no epitélio normal e na esofagite, no entanto, sua ativação está aumentada no EB e ADE (Abdel-Lati *et al.*, 2004; O’Riordan *et al.*, 2005; Abdel-Lati *et al.*, 2015). Além disso, a expressão de NF κ B em amostras de ADE foi correlacionada com o estágio da doença e a baixa ativação de NF κ B esta associada a uma melhor resposta a quimioterapia (Abdel-Lati *et al.*, 2004; O’Riordan *et al.*, 2005). Recentemente, foi demonstrado que existem dois sítios putativos de ligação de NF κ B na região promotora de *CDX2* e que os ácidos biliares são capazes de levar a ativação de NF κ B que por sua vez leva à transativação de *CDX2* em células esofágicas (Jenkins *et al.*, 2004; Kazumori *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008). Outros genes alvos de NF κ B, como as citocinas pró-inflamatórias interleucina 8 (IL-8) e interleucina 1 β , foram descritas aumentadas em amostras de BE e ADE (Jenkins *et al.*, 2004; O’Riordan *et al.*, 2005). Esses trabalhos sugerem um mecanismo pelo qual a inflamação poderia estar induzindo a metaplasia intestinal no esôfago. E ainda ressalta a importância do estudo em ADE dessa via, um potencial alvo terapêutico.

A expressão de *CDX2* é um evento precoce e importante para o desenvolvimento de EB (Souza *et al.*, 2008), logo o estudo de como sua ativação ocorre em EB é de extrema importância. Já foi demonstrado, como descrito acima, que os ácidos biliares e a acidez, através da ativação NF κ B, eram capazes de induzir a expressão de *CDX2* em células

esofágicas (Jenkins *et al.*, 2004; Kazumori *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008). Outro trabalho relacionou a indução da expressão de CDX2 também a estímulos inflamatórios em células epiteliais dos canais biliares. Nesse trabalho foi demonstrado que uma variedade de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como o lipopolissacarídeo (LPS), eram capazes de induzir a expressão de CDX2 via ativação dos TLRs e NFκB em células epiteliais dos canais biliares, e que isso poderia estar relacionado com o desenvolvimento da metaplasia intestinal nos canais biliares (Ikeda *et al.*, 2007). Logo, o trabalho demonstrou uma ligação direta entre inflamação e a expressão de CDX2 através da ativação de NFκB via TLR. No entanto, em esôfago existem poucos trabalhos avaliando a expressão de TLR, tanto no tecido saudável quanto em tumores do esôfago. No estudo realizado por Mulder e colaboradores em 2011, foi observada a expressão de *TLR2* e *TLR3* em linhagens de ADE e somente *TLR3* estava presente em linhagem esofágica epitelial normal. Em outro trabalho a expressão de *TLR3*, *TLR4*, *TLR7* e *TLR9* foram descritas estarem aumentadas em amostras humanas de CEE em comparação com tecido normal adjacente (Sheyhidin *et al.*, 2011).

O papel de COX-2 na carcinogênese esofágica é bastante estudado. Já foi demonstrado um aumento significativo na expressão da proteína COX-2 durante a progressão do EB para EB com displasia de baixo grau ou alto grau e para ADE, enquanto que em tecido normal nenhuma expressão foi detectada (Shirvani *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 2001; Ling *et al.*, 2007). E ainda, a expressão de níveis elevados de COX-2 em ADE foi associada a uma diminuição na taxa de sobrevivência dos pacientes (Bhandari *et al.*, 2006). Inclusive em um trabalho de meta-análise COX-2 foi considerado o marcador com maior efeito negativo na sobrevivência de pacientes com ADE (McCormick *et al.*, 2015). Experimentos realizados em linhagens celulares de epitélio esofágico normal demonstrou que a exposição destas aos ácidos biliares resulta em aumento da expressão de COX-2 (Shirvani *et al.*, 2000; Looby *et al.*, 2009). Já foi reportado que os ácidos biliares são capazes de induzir a expressão de COX-2 através da ativação da via de PI3K mediada pela geração de ROS em linhagens celulares de EB e ADE (Song *et al.*, 2007). A confirmação do importante papel desempenhado pela COX-2 na carcinogênese esofágica é proveniente, principalmente, dos resultados sobre o uso de NSAID e a redução do risco para o desenvolvimento de ADE (Anderson *et al.*, 2006). Ainda, experimentos em linhagens celulares e modelos murinos também confirmaram o papel de AINEs e inibidores específicos de COX-2 como fatores importantes na quimioprevenção do

EB e do ADE (Buttar *et al.*, 2002; Oyama *et al.*, 2005). Em CEE também há um aumento na expressão de COX-2, já em epitélio esofágico com displasia de alto grau, em relação ao epitélio esofágico normal (Shamma *et al.*, 2000). Além disso, a superexpressão de COX-2 e o conseqüente aumento dos níveis de PGE2 estão associados a um pior prognóstico para os pacientes com CEE (Zimmerman *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 2007; Takatori *et al.*, 2008). Nesse tipo tumoral, já foi descrito que a expressão de COX-2 é regulada por metilação do promotor em resposta ao extrato de tabaco (Meng *et al.*, 2012).

Por fim, o consumo de bebidas em altíssimas temperaturas também é capaz de induzir inflamação no epitélio esofágico e predispõem ao desenvolvimento do CEE (Islami *et al.*, 2009). Em trabalho realizado pelo nosso grupo, utilizando um modelo murino com consumo de água quente (70°C) associado à administração de nitrosamina (NDEA), foi observado um aumento de células positivas para o marcador de proliferação Ki67 na camada basal do epitélio esofágico e o surgimento de lesões proliferativas pré-malignas (Rapozo *et al.*, 2016). No entanto, mais estudos devem ser realizados para melhor entender os mecanismos envolvidos nesse processo.

1.2 Corpúsculos Lipídicos

Corpúsculos lipídicos (CL) são organelas ricas em lipídios presentes em todos os organismos, incluindo plantas, leveduras, procariotos e células animais. São organelas formadas por um centro rico em lipídio neutro e colesterol, cercado por uma membrana monocamada de fosfolipídios com composição peculiar e exibindo diversas proteínas associadas (Figura 1.4) (Bozza *et al.*, 2011; Welfe, 2015). Os CLs seqüestram ácidos graxos dentro da célula para posterior utilização como combustível metabólico, componente de membranas, modificações pós-translacional de proteínas e moléculas sinalizadoras (Bickel *et al.*, 2009). Apesar de no passado terem sido atribuídos unicamente ao transporte e armazenamento de lipídios, os CLs são organelas ativas, altamente reguladas, dinâmicas e funcionais (Bozza *et al.*, 2007; Bozza *et al.*, 2009; Welfe, 2015). Em eucariotos, quase todas as células apresentam CLs, seja em condições basais, como os adipócitos e hepatócitos, seja quando cultivadas com ácidos graxos livres (Walter & Farese, 2012; Welfe, 2015).

A composição de proteínas associadas aos CLs pode variar entre os CLs de uma mesma célula, de acordo com as diferentes condições metabólicas. As principais proteínas encontradas nos CLs são as proteínas da família PAT (Perilipina, proteína relacionada à diferenciação de adipócitos -ADRP- e TIP47), que compartilham similaridade de sequência proteica e a habilidade de se ligar aos CLs (Londos *et al.*, 2005). Os membros dessa família de proteínas diferem entre si em relação ao tamanho, expressão tecidual, afinidade aos CLs, estabilidade quando ligadas aos CLs e regulação transcricional. Essas diferenças demonstram que cada membro da família PAT de proteínas apresentam funções celulares distintas, no entanto é comum a todos os membros a regulação da interface entre os CLs e o ambiente celular (Wolins *et al.*, 2006). As proteínas dessa família não são essenciais para a formação dos CLs, mas são de extrema importância na regulação do metabolismo lipídico dos CLs (Bulankina *et al.*, 2009).

A Perilipina foi a primeira proteína descrita na membrana dos CLs e é um marcador da diferenciação de adipócitos. A perilipina só é estável quando ligada aos CLs e quando há excesso de perilipina não ligada aos CLs elas são degradadas. Sua principal função é proteger o depósito lipídico dos CLs, restringindo o acesso de enzimas que hidrolizam lipídios ou que facilitam o acesso das mesmas a estas organelas, dependendo da condição metabólica. A regulação da Perilipina para controlar esse acesso aos lipídeos presentes dentro dos CLs ocorre através da sua fosforilação pela PKA em sítios específicos. Quando desfosforilada, a Perilipina previne o acesso das lípases aos lipídeos neutros dos CLs e quando fosforilada facilita a ação das lípases (Londos *et al.*, 1999; Bickel *et al.*, 2009). Dois diferentes grupos de pesquisa construíram camundongos deficientes para Perilipina, de forma independente, e em ambos os trabalhos, foi observado que os animais apresentavam peso normal, no entanto havia redução entre 65-75% do tecido adiposo. Além disso, esses animais consumiam alimento normalmente e eram resistentes à obesidade induzida pela dieta (Martinez-Botas *et al.*, 2000; Tansey *et al.*, 2001). Os primeiros trabalhos realizados sobre a caracterização da Perilipina identificaram que esta era expressa somente em tecido adiposo amarelo e marrom e tecidos esterogênicos, no entanto, trabalhos recentes identificaram a expressão da Perilipina no cérebro, mama e diversos tumores (Persson *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2016).

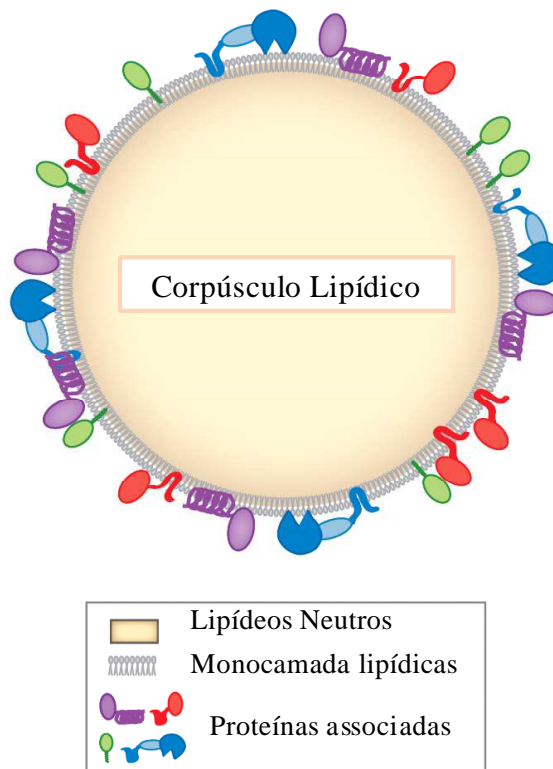


Figura 1.4 Representação esquemática da estrutura de um Corpúsculo Lipídico (CL). O CL é formado por um centro rico em lipídeos neutros, envolto numa monocamada lipídica. Nessa membrana são encontradas diversas proteínas associadas, como as proteínas da família PAT (Perilipina, proteína relacionada à diferenciação de adipócitos -ADRP- e TIP47) e Caveolina-1. Adaptado de Walther e Farese, 2012.

A ADRP é uma proteína de 50kDa, expressa em uma variedade de células. Em adipócitos sua expressão reduz conforme a diferenciação progride, em contraste com a expressão da Perilipina que aumenta conforme ocorre à diferenciação do adipócito (Londos *et al.*, 1999; Gross *et al.*, 2006). E, assim com a Perilipina, proteínas ADRP não ligadas aos CLs são degradadas pela via do proteossomo (Xu *et al.*, 2005). De forma geral, ambas as proteínas atuam como proteínas constitutivas dos CLs. Diferente da expressão mais restrita da Perilipina, a proteína ADRP é expressa em uma variedade de células, com exceção de adipócitos maduros. A principal função de ADRP é limitar a interação de lipases com os lipídeos neutros presentes nos CLs, promovendo dessa forma o acúmulo de lipídeos (Bickel *et al.*, 2009). O aumento da expressão de ADRP em diversos tipos celulares foi associado ao aumento do número de CLs (Imamura *et al.*, 2002; Listenberger *et al.*, 2007). O animal deficiente em ADRP, apesar de apresentar diferenciação normal de adipócitos, apresenta uma redução do conteúdo lipídico do fígado e atenuação da esteatose hepática decorrente de uma dieta rica em gordura (Chang *et al.*, 2006).

A proteína TIP47 também faz parte da composição dos CL e, de forma diferente ao que ocorre com a ADRP e Perilipina, é expressa em todos os tecidos e é estável quando não ligada aos CLs. Sua função, assim como a ADRP, é proteger os CLs contra lipólise (Fujimoto *et al.*, 2008).

Os CLs podem ser formados *de novo* ou por processo de fissão de CLs já existentes (Jacquier *et al.*, 2011; Long *et al.*, 2012). A formação *de novo* de CL em eucariotos ocorre no Retículo Endoplasmático (RE) e o modelo de formação supõe a seguinte seqüência de eventos: os lipídeos recém-sintetizados se acumulam na membrana do RE, entre as duas camadas, e, conforme ocorre o acúmulo de lipídeos excedendo o limite que a membrana suporta, a nova massa de lipídeos brota da membrana mãe do RE formando um novo CL (Ploegh *et al.*, 2007; Ohsaki *et al.*, 2008; Bulankina *et al.*, 2009). No entanto, evidências científicas que expliquem cada uma das etapas de formação dos CLs através do mecanismo descrito acima são bastante escassas.

Para acumular mais lipídeos, as células formam novos CLs ou há crescimento de CLs já existentes por adição de lipídeos a estes. A adição de novos lipídeos a CLs já existentes requer síntese local ou transferência do RE (Walther & Farese, 2012). A enzima que cataliza a última etapa da síntese de triacilglicerol, a diacilglicerol-aciltransferase-2 (DGTA2), normalmente encontrada na membrana do RE, também é encontrada na membrana de CLs, demonstrando que há síntese local de lipídeos nessas organelas (Moessinger *et al.*, 2011). De fato, enzimas envolvidas na síntese de fosfolipídeos, triacilglicerol e seus intermediários, e também lípases e reguladores lipolíticos, são encontrados na membrana dos CLs (Wilfling *et al.*, 2014). Ademais, também já foi descrito através de experimento com imagens em tempo real que os CLs podem crescer através da fusão de dois ou mais CLs já existentes (Bostrom *et al.*, 2005).

A função canônica dos CLs é armazenar lipídeos. Estes lipídeos armazenados podem ser utilizados na β -oxidação, síntese de membrana, modificação de proteínas, geração de moléculas sinalizadoras e outros produtos lipídicos (Walther & Farese, 2012; Wilfling *et al.*, 2014; Welfe, 2015). Os lipídeos armazenados nos CLs dos adipócitos representam uma reserva energética para o corpo, enquanto que, os armazenados em CLs de células esterogênicas são utilizados para síntese de esteroide e os dos macrófagos para síntese de eicosanóides (Fujimoto *et al.*, 2008). De forma geral, o armazenamento de lipídeo é

importante para defesa celular, já que, o excesso de ácidos graxos livres é tóxico para célula (Schaffer *et al.*, 2003).

Diversas doenças já foram caracterizadas como decorrentes do acúmulo excessivo de lipídeos em CLs. Atualmente, a que vem trazendo maiores preocupações em termos de saúde pública é a obesidade. A obesidade é um estado de acúmulo excessivo de lipídeos em CLs no tecido adiposo e não adiposo (Walther & Farese, 2012). Outra característica muito comum da obesidade é a esteatose hepática, representada pelo acúmulo de CL nos hepatócitos. A capacidade do hepatócito de acumular lipídeos nos CLs pode atingir um limite, promovendo inflamação e levando ao desenvolvimento de fibrose e até insuficiência hepática (Nagle *et al.*, 2009). Além disso, já foi demonstrado que adipocitocinas, como a leptina e a resistina, que se encontram aumentadas em obesos são capazes de induzir a formação de CL em macrófagos (Maya-Monteiro *et al.*, 2008; Maya-Monteiro *et al.*, 2008b). Adicionalmente, a formação de CLs induzida por leptina é acompanhada por um aumento nos níveis proteicos de ADRP em macrófago (Maya-Monteiro *et al.*, 2008).

Além de seu conhecido papel no metabolismo lipídico, existem evidências que os CLs também participam no processo de degradação de proteínas, resposta ao stress de retículo endoplasmático, glicosilação de proteínas e infecção de patógenos e também em aspectos celulares como: ativação celular, metabolismo celular, tráfico de membrana, controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios e também no processo de carcinogênese (Fei *et al.*, 2009; Bozza & Viola, 2010; Hartman *et al.*, 2010; Olzmann *et al.*, 2013; Krahmer *et al.*, 2013; Wilfling *et al.*, 2014). Também são encontrados nos CLs uma gama de diferentes proteínas além das proteínas estruturais da família PAT como citosinas (TNF α , IL-6, bFGF), enzimas envolvidas no metabolismo do colesterol e quinases (MAP, PKC e PI3K), entre outras (Yu *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2000). Mais recentemente foi demonstrado que os CLs são o sítio de localização tanto do substrato como de toda maquinaria enzimática necessária para a síntese de eicosanóides, constituindo, então, o principal sítio intracelular de formação de LTC₄, LTB₄ e PGE₂ (Bozza *et al.*, 2009).

1.2.1 Corpúsculos Lipídicos e inflamação

Os CLs são caracteristicamente mais abundantes em células associadas a reações inflamatórias. O aumento do número de CLs já foi observado em diferentes processos

inflamatórios, incluindo artrite, síndrome de angústia respiratória aguda e sepse (Bozza *et al.*, 1996; Pacheco *et al.*, 2002). Além disso, os CLs são encontrados em diversas células associadas à inflamação, como leucócitos e macrófagos, entre outros, sendo essas as mesmas células que estão envolvidas na produção de mediadores lipídicos na inflamação (Bozza *et al.*, 2009).

Os CLs encontrados nos leucócitos contêm reservas de ácido araquidônico (Dvorak *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1998). Além disso, são encontrados nos CLs, de diversos tipos celulares, as enzimas específicas envolvidas na mobilização e também no metabolismo oxidativo do ácido araquidônico, incluindo a ciclooxigenase (Dvorak *et al.*, 1992; Dvorak *et al.*, 1994; Pacheco *et al.*, 2002), a fosfolipase A2 e a lipoxigenase (Yu *et al.*, 1998; Pacheco *et al.*, 2002; Assis *et al.* 2003). Diversos estudos indicam que os CLs funcionam como domínios intracelulares envolvidos na formação de eicosanóides, incluindo leucotrienos e prostaglandinas, por células participantes da resposta inflamatória (Bandeira de Melo *et al.*, 2001; Pacheco *et al.*, 2007; Accioly *et al.*, 2008; D'Ávila *et al.*, 2008). Os eicosanóides são moléculas chaves tanto em situações fisiológicas quanto em patológicas, como na homeostase tecidual, inflamação e câncer. Em conjunto, estes resultados sugerem que os CLs são sítios intracelulares específicos envolvidos na produção de eicosanóides por leucócitos durante o processo inflamatório.

Além dos eicosanóides, encontramos nos CLs outro grupo de moléculas inflamatórias: as citosinas. Essas moléculas representam uma família de glicoproteínas com diversas atividades biológicas como crescimento celular, inflamação, imunidade, diferenciação e reparo (Bozza *et al.*, 2009). As citosinas são produzidas, secretadas e armazenadas por uma variedade de células inflamatórias, como leucócitos e macrófagos (Bandeira de Melo & Weller, 2005). As citosinas armazenadas podem ser encontradas em diferentes compartimentos celulares, como grânulos, vesículas e CLs. Entre as citosinas já encontradas nos CLs, podemos citar TNF- α , RANTES, IL-16, entre outras (Bozza *et al.*, 2009).

A formação de CLs em leucócitos ocorre através de vários estímulos, dentre eles: inflamação induzida pela obesidade, lipopolissacarídeo (LPS) e infecção por bactérias (Bozza *et al.*, 2009). Componentes presentes na parede bacteriana, como o LPS em *E. coli*, *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) em *M. bovis* e *Lipoarabinomannan* (LAM) em *M. tuberculosis*, são capazes de induzir o acúmulo de CLs de forma dose e tempo dependentes (Pacheco *et al.*,

2002; D'Avila *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2007). Os receptores TLR apresentam um papel importante na regulação da biogênese dos CLs durante a infecção (D'Avila *et al.*, 2008). Já foi demonstrado que o LPS induz a formação de CLs em macrófagos, via TLR4 (Pacheco *et al.*, 2002). Em animais deficientes para TLR2, tanto BCG quanto LAM foram incapazes de induzir a formação de CLs, demonstrando a importância desse receptor na formação de CLs em resposta a uma infecção (D'Avila *et al.*, 2006). No entanto, a produção de eicosanóides em CLs não é restrita a leucócitos ou células inflamatórias. Células que produzem grandes quantidades de eicosanóide em condições fisiológicas também os produzem em CLs como, por exemplo, células granulosas do folículo pré-ovulatório. Além dessas, as células endoteliais e epiteliais envolvidas em condições patológicas como câncer, hipóxia e infecção apresentam aumento de CLs sintetizando eicosanóides (Scarfo *et al.*, 2001; Accioly *et al.*, 2008; Plotkowski *et al.*, 2008).

De uma forma geral, mecanismos que aumentam a produção de eicosanóides são alvos terapêuticos para drogas anti-inflamatórias. Não existe um inibidor específico de C.L., no entanto, diversos trabalhos já demonstraram que aspirina e AINEs inibem a formação de CLs tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Bozza *et al.*, 1996b). Ainda, essa inibição ocorre de forma independente de COX-2, já que, em macrófagos deficientes para essa enzima também apresentam inibição da formação de CLs após tratamento com aspirina e AINEs (Bozza *et al.*, 1996b).

1.2.2 Corpúsculos Lipídicos e Câncer

A inflamação é uma condição fisiopatológica já bem associada ao desenvolvimento de tumores, sendo o processo inflamatório parte do microambiente tumoral que gera condições propícias para a transformação e progressão maligna (Balkwill & Mantovani, 2001; Abel-Latif *et al.*, 2009; Poehmann *et al.*, 2012). Os CLs estão envolvidos na produção de eicosanóides (leucotrienos e prostaglandinas), mediadores inflamatórios, que controlam processos celulares importantes como ativação celular, migração, proliferação e apoptose (Bozza & Viola, 2010). Além disso, os CLs são caracteristicamente mais abundantes em células associadas a reações inflamatórias e neoplasias (Fujimoto *et al.*, 2008; Bozza & Viola, 2010), corroborando a importância dessas moléculas no processo de carcinogênese.

Diversos trabalhos demonstram que há aumento do número de CLs em células proliferativas presentes em processos neoplásicos, quando comparado às células normais (Accioly *et al.*, 2008; Straub *et al.*, 2010; Moritane *et al.*, 2011; Boussahmain *et al.*, 2013; Goswami & Walia, 2016). Mais recentemente foi demonstrado maior número de CLs em células tronco tumorais de cólon, quando comparado às células epiteliais normais ou tumorais diferenciadas do cólon (Tirinato *et al.*, 2014). No entanto, o papel e função dos CLs em células tumorais são pouco conhecidos. Diferentes proteínas sinalizadoras que desempenham papéis já bem estabelecidos na inflamação e no câncer como PI3K, ERK1, ERK2, PKC, Cav-1 já foram detectadas nos CLs (Yu *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2000; Pol *et al.*, 2001; Fujimoto *et al.*, 2001). Demonstrando que essas organelas devem apresentar papel importante na carcinogênese.

Em trabalho realizado em adenocarcinoma de cólon foi observado correlação positiva entre o número de CLs e proliferação celular (Accioly *et al.*, 2008). Nesse trabalho, Accioly e colaboradores descreveram um aumento do número e tamanho dos CLs em linhagens celulares e amostras humanas de adenocarcinoma de cólon quando comparado ao tecido ou linhagem de epitélio normal do cólon. Esse fato foi associado a um aumento da proliferação celular e da expressão de COX-2. Ainda nesse trabalho, foi visto que os CLs eram o sítio de produção de PGE₂ e que os efeitos observados eram revertidos pela adição de aspirina e inibidores da enzima ácido graxo sintetase (FASN), enzima responsável pela formação de CLs. Recentemente, padrão parecido foi observado em câncer de mama. Goswami e Walia descreveram um aumento da via COX-2/ PGE₂ em linhagens de câncer de mama em relação a uma linhagem epitelial normal de mama. Sendo que o aumento dessa via estava associado ao aumento da expressão protéica de FASN e também de um aumento do número de CLs. E assim como foi observado em adenocarcinoma de cólon, COX-2 e PGE₂ co-localizavam com os CLs, e o uso de inibidores de COX-2 e FASN diminuíram o número de CLs nas linhagens de câncer de mama (Goswami & Walia, 2016). Mais uma vez demonstrando a importância dos CLs na carcinogênese.

Outro processo celular importante no desenvolvimento de neoplasias, a apoptose, foi associado aos CLs. Apesar de ser esperado a inibição da síntese celular de lipídeos durante o processo de morte celular, já foi descrito que a indução de apoptose leva ao acúmulo de CLs

(Hakumaki & Kauppinen, 2000). No entanto, os mecanismos envolvidos nesse fenômeno ainda não foram totalmente esclarecidos.

A observação que algumas neoplasias apresentavam um aumento do número de CLs levou a avaliação da expressão de diversos membros da família PAT, marcadores da presença de CLs, em alguns tipos tumorais. Já foi descrito que os diferentes membros da família PAT encontram-se superexpressos em hepatocarcinoma, adenocarcinoma de cólon e carcinoma de células renais (Straub *et al.*, 2010). A expressão de Perilipina também já foi detectada em glândulas sebáceas e, mais recentemente, foi utilizada como marcador em carcinoma mioepitelial sebáceo da glândula parótida (Muthusamy *et al.*, 2006; Shinozaki *et al.*, 2008). Recentemente, a proteína ADRP foi descrita como biomarcador de linfoma de Burkitt (Ambrosio *et al.*, 2012). Contudo nenhum trabalho avaliou de forma contundente a presença de CLs em câncer de esôfago, um tumor fortemente associado ao processo inflamatório.

Em conjunto, o papel dos CLs no desenvolvimento dos tumores parece ser importante, entretanto, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão esclarecidos. Isso mostra como é importante estudar CLs, especialmente em tumores que carecem de um conhecimento molecular mais aprofundado e de biomarcadores, como é o caso do câncer de esôfago, enfatizando a importância de estudar essa organela na carcinogênese esofágica.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Principal

Avaliar a presença e participação dos CLs no desenvolvimento do câncer de esôfago.

2.2 Objetivos específicos

1. Analisar a presença de CL em amostras humanas de esôfago normal de não-obesos, esôfago normal de obesos, EB, ADE e CEE;
2. Avaliar se a presença de CL se correlaciona com a proliferação nas amostras humanas de EB, ADE e CEE;
3. Analisar a presença de CL em linhagens celulares humanas de esôfago normal, ADE e CEE;
4. Analisar a influência dos fatores de risco associados ao ADE na formação de CL, na proliferação celular e na expressão de genes associados ao desenvolvimento do ADE em linhagens celulares humanas de esôfago normal, ADE e CEE;
5. Avaliar se a presença de CL correlaciona com o processo inflamatório nas amostras humanas de EB, ADE e CEE e nas linhagens celulares de esôfago;
6. Avaliar a participação de vias envolvidas no processo inflamatório na formação de CL em linhagens celulares e amostras humanas de ADE e CEE;
7. Avaliar o impacto da ativação de vias inflamatórias na proliferação e produção de mediadores inflamatórios em linhagens celulares humanas de ADE e CEE;
8. Investigar se os fatores de risco associados ao desenvolvimento do ADE levam à formação de CL através da ativação de vias inflamatórias;

3. Materias e Métodos

3.1 Amostras Humanas

As amostras humanas utilizadas nesse estudo para as análises de imuno-histoquímica foram constituídas por vinte e cinco amostras de CEE e sessenta e quatro amostras de ADE, provenientes do INCA (Instituto Nacional do Câncer) e da UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) e trinta amostras de EB provenientes do UFRGS. O uso das amostras foi aprovado pelo Comitê de Ética do INCA (protocolo de aprovação nº. 115/10) e pelo Comitê de Ética da UFRGS/HCPA (protocolo de aprovação nº 02223). As amostras utilizadas já haviam sido anteriormente coletadas e encontravam-se fixadas em formalina e embebidas em parafina. Os critérios utilizados para seleção das amostras foram: laudo histopatológico e/ou laudo endoscópico confirmando a presença da lesão, ausência de tratamento prévio e material em boa qualidade. As amostras tumorais (CEE e ADE) utilizadas foram provenientes de biópsias ou de cirurgias e as amostras de EB foram provenientes somente de biópsias. Todas as amostras utilizadas foram reavaliadas por três patologistas, de maneira independente, para confirmar a presença da lesão. Nas amostras de EB foi realizada marcação com Alcian Blue e Hematoxilina para confirmar o diagnóstico (Figura 3.1). Nesse estudo, também foram utilizadas dez amostras de esôfago normal de indivíduos não obesos e vinte e uma amostras de esôfago de indivíduos obesos obtidas no serviço de endoscopia da UERJ (Universidade Estadual do Rio de Janeiro) e provenientes de indivíduos saudáveis submetidos à endoscopia por motivos outros que não a presença de alguma lesão no esôfago. Para o grupo de obesos incluídos no estudo, o critério de inclusão foi ter índice de massa corporal (IMC) acima de 30. Dentre os indivíduos obesos incluídos no estudo, foi observada mediana de IMC de 41,65kg/cm², com intervalo de 35,9-52,5kg/cm². No momento da coleta do material também foram coletados os dados clínicos patológicos dos indivíduos. Essas amostras, coletadas especificamente para esse trabalho, foram fixadas em formol 10% e embebidas em parafina para posterior avaliação. O uso das amostras foi aprovado pelo Comitê de Ética da HUPE/UERJ (protocolo de aprovação nº 416).

3.2 Análises Imuno-histoquímicas

Os tecidos das amostras selecionadas, que tinham sido previamente fixados com formol e embebidos em parafina, foram submetidos à marcação imuno-histoquímica para ADRP (AP125; Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ, USA), Ki67 (MIB-1, Dako), COX-2 (policlonal, Cayman Chemicals), NFkB (F6 anti-p65; Santa Cruz Biotech.) e TLR4 (monoclonal 76B357.1, ABCAM). Os blocos contendo os tecidos foram cortados em cortes de 4µm e posicionados em lâminas tratadas com 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTS) 4% (Thermo Scientific). As lâminas foram incubadas à 60°C, por 16h em estufa e seguiu-se a etapa de desparafinização que foi realizada em cinco banhos sequenciais de 5 minutos em xilol, seguida da reidratação em cinco banhos sequencias de 3 minutos em concentrações decrescentes de etanol (100% à 50%), e banho em água corrente por 10 minutos. Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica que ocorreu em solução EDTA pH 9.0 à 98°C por 40 min para COX-2, em solução citrato pH 6.0 à 98°C por 40 min para ADRP, NFkB e TLR4 e em panela de pressão em solução citrato pH 6.0 por 3 min para Ki67. O kit de amplificação de sinal utilizado foi o NOVOLINK (NovoCastra). Neste kit temos o inibidor da peroxidase endógena, o bloqueio das ligações inespecíficas, a amplificação do sinal e o revelador DAB que foram utilizados seguindo o protocolo do fabricante. Os anticorpos primários foram incubados por 12 horas à 4°C. Ao final da coloração, os cortes foram contra corados com hematoxilina por 30 seg, desidratados em 5 banhos de etanol absoluto e embebidos em 5 banhos de xilol. As lâminas foram, então, montadas utilizando meio Ery-Mount (EasyPath). As reações de imunohistoquímica foram avaliadas por três patologistas de forma independente. Para Ki67 e ADRP foi determinado o percentual de células com marcação positiva. Para COX-2 e NFkB (subunidade p65), além da avaliação do percentual de células positivas, foi avaliada também a intensidade de marcação. Para intensidade fraca era atribuído o valor 1, para marcação moderada o valor 2 e para marcação forte o valor 3. Na ausência de marcação era atribuído o valor zero. Os valores dos percentuais de células positivas foram, então, multiplicados pelo valor da intensidade resultando no valor final da marcação para COX-2 e NFkB, conforme descrito por Bhandari *et al.*, 2006. O valor final utilizado para cada marcação foi a mediana dos valores atribuídos por cada um dos 3 patologistas que realizaram a leitura das lâminas.

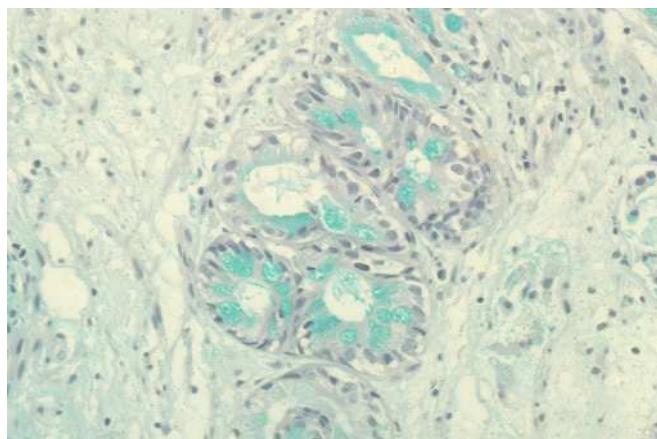


Figura 3.1. Marcação com Alcian Blue e Hematoxilina em amostra humana de esôfago de Barrett. Imagem representativa de marcação de tecido de esôfago de Barrett humano fixado em formalina e embebido em parafina com Alcian Blue e Hematoxilina. Foto tirada em microscópio de campo claro (40x).

3.3 Cultura de células

Todas as linhagens celulares utilizadas foram cultivadas em estufa à 37°C e 5% de CO₂. As linhagens OE21, OE33 e CACO-2 foram cultivadas com o meio de cultura RPMI (Invitrogen). Foram adicionados ao meio de cultura RPMI: 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (GIBCO), 2mM de L-Glutamina (GIBCO) e os antibiótico Estreptomicina (100mg) e Penicilina (100.000 unidades) (Sigma). A linhagem Het1a foi cultivada com meio BEBM adicionado dos seus suplementos específicos (Lonza). As características específicas das linhagens utilizadas neste trabalho estão detalhadas abaixo (Tabela 3.1):

Tabela 3.1. Tabela das características específicas das linhagens celulares utilizadas.

Linhagem Celular	Tecido	Origem
Het1a	Linhagem celular derivada de autópsia do epitélio esofágico humano e imortalizada com o vírus SV-40.	ATCC
OE21	Linhagem celular estabelecida a partir de um carcinoma epidermóide do terço médio do esôfago humano em estágio IIA e diferenciação moderada.	ECACC
OE33	Linhagem celular estabelecida a partir de um adenocarcinoma do terço distal do esôfago humano, em metaplasia de Barrett, estágio IIA e pouco diferenciado.	ECACC

As linhagens celulares OE21 e OE33 são aderentes e para soltá-las das placas de cultivo foi utilizado Tripsina 0,25% e 4mM EDTA. As células foram incubadas por aproximadamente 5 minutos com esta solução, que foi inativada com meio contendo 10% SFB. Todas as células foram congeladas em solução de SFB 6%DMSO.

A linhagem celular de esôfago normal imortalizada Het1a também é uma célula aderente. Porém para soltá-la da placa foi utilizada tripsina 0,05% com 0,53mM de EDTA e 0,5% de PVP. Para inativar a tripsina, foi usado um inibidor de Tripsina de grão de soja 0,1% (Invitrogen). Além disso, seu congelamento foi feito em meio Leibovitz's L-15 com adição de 2mM de L-glutamina, 10mM de HEPES, 1% PVP, 10%SFB e 7.5% DMSO.

3.4 Coloração de Corpúsculos Lipídicos por Oil Red O

As diferentes linhagens celulares de esôfago (OE21, OE33 e Het1a) foram cultivadas (2×10^4 células/ poço) por 24h em lamínulas tratadas com gelatina em placas de 24 poços com 500 μ L de meio de cultivo, tratadas ou não com diferentes substancias. Para linhagem celular Het1a, esperou-se 16h após o cultivo nas lamínulas tratadas com gelatina para adicionar os tratamentos com diferentes substâncias. Após esse período, as células foram fixadas para análise. Ao final da incubação com os diferentes tratamentos, as células foram lavadas com PBS e, então, fixadas por 10 min em Formalina 3,7%. Em seguida, as células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS e, então, incubadas por 5 min com Propileno Glicol 100% (Sigma). Ao final dos 5 min foi retirado todo excesso de Propileno Glicol e as células foram incubadas por 10 min com Oil Red O (ORO) (Sigma) pré-aquecido por 15 min à 60°C. Ao final dessa incubação as células foram incubadas com Propileno Glicol 85% por 5 min, seguida de 2 lavagens com PBS. Para contra corar o núcleo das células, estas, foram incubadas por mais 5 min com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Molecular Probes-Invitrogen) e, em seguida, foram lavadas mais 2 vezes com PBS. As lamínulas foram, então, montadas em lâminas com meio VECTASHIELD (Vector Laboratories Inc.).

3.5 Contagem de Corpúsculos Lipídicos

A contagem dos CL das diferentes linhagens celulares de esôfago utilizadas (OE21, OE33 e Het1a) com seus diferentes tratamentos foi feita a partir de fotos tiradas das células coradas com ORO e DAPI como descrito no tópico anterior. Segue detalhamento da técnica.

3.5.1 Microscopia de Fluorescência

As células coradas com ORO e DAPI foram avaliadas no Microscópio de Fluorescência em lente objetiva de imersão de 100x. Para cada linhagem celular e condição de tratamento foram tiradas fotos de 50 células com o tempo de exposição fixo. A seleção das células nas lamínulas foi feita através da fluorescência do DAPI e de forma aleatória. As fotos foram salvas separadamente para cada marcador (ORO, adquirido em 540-580nm e DAPI, adquirido em 461nm). Dessa forma, a foto do ORO foi usada para contar os C.L. enquanto que a foto do DAPI, da mesma imagem, foi usada para contar o número de células que haviam em cada foto tirada.

3.5.2 Tratamento das Imagens

As fotos tiradas no Microscópio de Fluorescência das células marcadas com ORO passaram por um tratamento de imagens para o qual foi utilizado o software Photoshop antes dos CL serem contados. Nesse tratamento de imagem utilizando o software Photoshop, o padrão de cores foi invertido de forma que os CL aparecessem como pontos pretos em um fundo branco. Essa inversão foi necessária para que as imagens pudessem ser avaliadas pelo software utilizado para contar o número de CL.

3.5.3 Software utilizado para a contagem de CL

Para contar os CL, as imagens tratadas foram avaliadas utilizando o software ImageQuant TL (GE Healthcare) na opção contagem de colônias. Somente as fotos do ORO foram analisadas utilizando esse software. Foram fixados os valores de: Sensibilidade (9800),

Tamanho (31), *Background* (1000), *Noise Factor* (25) e *Splitting* (09). Cada uma das imagens que representavam as 50 células foram avaliadas pelo software. Ao final, para a elaboração dos gráficos, foram utilizados os valores obtidos a partir da média do número de CL das 50 células avaliadas em cada linhagem celular e tratamento em no mínimo 3 experimentos independentes.

3.6 Tratamentos das Linhagens Celulares

Para a avaliação do efeito dos fatores de risco associados ao desenvolvimento dos tumores de esôfago na alteração do número de CL, as linhagens celulares (OE21, OE33 e Het1a) foram incubadas por 24h com os tratamentos específicos, enquanto que para, avaliar a proliferação celular, esse tempo variou entre 48 e 96h, dependendo do tratamento. O tratamento com o inibidor de TLR4, CLI95, foi adicionado à cultura 6h antes dos estímulos adicionais. Segue Tabela 3.2 com os tratamentos utilizados:

Tabela 3.2. Tabela com as substâncias e suas concentrações utilizadas para o tratamento das linhagens celulares de esôfago.

Nome da Substância	Concentração utilizada	Fabricante
Nicotina	50, 100 e 200µg/mL	Sigma
Ácido Oleico (AO)	1, 2 e 5µM	Sigma
Ácido Desoxicólico (DCA)	200µM	Sigma
Ácido acetil salicílico (ASA)	500µg/mL	Sigma
Meio ácido	pH 5.0	LONZA
Lipopolysaccharides (LPS)	0,5µg/mL	Sigma
Leptina	0,3 e 0,6µg/mL	Sigma
CLI095	2µg/mL	InVivoGen

Os tratamentos com o ácido biliar (DCA) e com o meio com pH ácido tiveram como objetivo simular o refluxo gástrico-esofágico e, por isso, foram realizados na forma de pulsos. Esses pulsos consistiam em 3 min de incubação com cada um dos tratamentos sozinhos à 37°C e 5% de CO², intercalados por 30min em meio sem adição dos tratamentos à 37°C e 5% de CO². A quantidade de pulsos realizados variou de 1 até 8 pulsos. O período de incubação de

24h, nesse caso, foi contado a partir do primeiro pulso. Também foram realizados experimentos na forma de pulsos com as possíveis combinações de meio com pH ácido e DCA.

Para o co-tratamento com DCA e o inibidor de TLR4, não foi possível realizar pulsos de incubação com DCA. Isso porque o inibidor deve ser adicionado a cultura 6h antes do estímulo, e a cada pulso de incubação com DCA o meio de cultura é trocado. A alternativa empregada foi então expor as células a um tratamento constante com DCA. Inicialmente, a linhagem celular OE33 foi incubada com a mesma concentração utilizada para realização dos pulsos de incubação com DCA, 200 μ M, no entanto, houve grande morte celular, impossibilitando a contagem dos CL. Seguimos, então, para avaliação de outras concentrações. Utilizamos, então, 50 e 100 μ M de DCA por 24h na linhagem OE33.

3.7 Proliferação Celular

As diferentes linhagens celulares (OE21, OE33 e Het1a) foram plaqueadas (6×10^4 células/ poço) em placas de 12 poços e incubadas por diferentes tempos, que variavam entre 48 e 96h, com ou sem tratamentos (para detalhes dos tratamentos, ver tópico 3.6). O tratamento foi adicionado somente 16h após as células serem plaqueadas, para garantir que todas as células estivessem aderidas. Ao final do período de incubação, o número de células foi contado. As células foram contadas utilizando o equipamento de contagem de células Countess (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Esse equipamento conta o número de células vivas baseado no método de coloração por Tripán 0,4%.

3.8 Ensaio de Cristal Violeta

As linhagens celulares de esôfago, OE21 e OE33, (5×10^3 células/poço) foram cultivadas em placa de 96 poços à 37°C e 5% de CO², por 96h. Ao final desse período, o sobrenadante foi retirado, as células lavadas com PBS e fixadas por 10 min com etanol. Em seguida, as células foram coradas com cristal violeta 0,05% em etanol 20% por 10 min e, então, lavadas com água destilada. O cristal violeta presente nas células coradas foi

solubilizado em metanol absoluto e a leitura da placa realizada em espectrofotômetro à 595nm. A absorvância à 595nm é proporcional ao número de células vivas fixadas.

3.9 Dosagem de Prostaglandina E2 e Interleucina 8

As linhagens celulares de esôfago (OE21, OE33 e Het1a) foram cultivadas (2×10^5 células/poço) em placa de 24 poços em 500 μ L de meio à 37°C e 5% de CO², por 48h ou 72h. Ao final desse período, o meio de cultivo de cada linhagem celular foi recolhido, centrifugado para retirar qualquer vestígio de células e, então, congelado à -20°C até o momento da dosagem de Prostaglandina E2 (PGE2) e Interleucina 8(IL-8). A dosagem foi realizada em placa de 96 poços utilizando o kit Prostaglandina E2 EIA KIT- Monoclonal (Cayman Chemicals) e o kit IL-8 EIA KIT- Monoclonal (Cayman Chemicals), seguindo o protocolo do fabricante. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro à 420nm. O resultado foi dado em pg/ μ L, correlacionando a absorvância das amostras com a da curva padrão fornecida.

3.10 Imunofluorescência

As diferentes linhagens celulares (OE21, OE33 e Het1a) foram cultivadas (2×10^4 células/ poço) em placas de 24 poços sobre lamínulas tratadas com gelatina por 24h. Após esse período, as células foram ou estimuladas por mais 24h ou lavadas em PBS e então fixadas por 30min com Formalina 3,7%. Após a fixação, as células foram lavadas por 3 vezes com PBS e permeabilizadas em PBS/Saponina 0,05% por 30 min para a marcação para ADRP ou permeabilizadas em PBS/Triton 0,04% para a marcação de NFkB. Após essa incubação, as células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS e incubadas por 20 min em solução para bloqueio das ligações inespecíficas (PBS/SFB 1%). O anticorpo primário anti-ADRP (AP125; Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ, USA) foi diluído em PBS/Saponina 0,05% e o anticorpo primário anti-NFkB (F6; Santa Cruz Biotech.) foi diluído em PBS/Triton 0,04%. Ambos os anticorpos foram incubados por 2h, logo após o bloqueio das ligações inespecíficas, sem lavagens entre as incubações. Após 3 lavagens com PBS, o anticorpo secundário anti-mouse Alexa Fluor 568 (Life Technologies) foi, então, adicionado e incubado por 45 min. Na marcação para ADRP, juntamente com o anticorpo secundário foi incubado o BODIPY (Life

Technologies). Seguiram-se 3 lavagens com PBS. Ao final, as células foram contra coradas com DAPI (Molecular Probes-Invitrogen) por 5min e lavadas mais 2 vezes com PBS. As lamínulas foram, então, montadas em lâminas com VECTASHIELD (Vector Laboratories Inc.). As imunofluorescências foram avaliadas em Microscópio Confocal com aumento de 100x.

3.11 Análise da expressão gênica

3.11.1 Extração de RNA

Para as análises de expressão gênica, as diferentes linhagens celulares (OE21, OE33 e Het1a) foram plaqueadas (1×10^6 células/ poço) em placas de 6 poços, deixadas aderir por 16h e, então, estimuladas ou não por mais 24 ou 48h com os diferentes tratamentos especificados anteriormente. Ao final desse período, os poços foram lavados com PBS e adicionado 1mL de TRIzol[®] (Ambion) para a coleta das células. O RNA total foi extraído com o reagente TRIzol[®], conforme descrito pelo fabricante. Ao final da extração, o RNA foi ressuscitado em água DEPC e dosado no espectrofotometro NanoDrop (Thermo). O RNA foi considerado de boa qualidade para uso, quando a relação 260/280 e 260/230 obtida encontrava-se próxima de 2.

3.11.2 Reação de Transcrição Reversa

O cDNA foi construído a partir de 1µg de RNA pela reação de transcrição reversa. Antes da reação de transcrição reversa, o RNA foi tratado com DNase (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Para a construção do cDNA, foram utilizados primers randômicos (Invitrogen), dinucleotídeos trifosfatos (DNTPs) e a enzima transcriptase reversa SuperScript II (Invitrogen), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

3.11.3 Reação de PCR em tempo real

A análise da expressão do RNAm dos genes avaliados foi realizada pela técnica de qRT-PCR. Foi utilizado o termociclador Illumina - ECO e o sistema de amplificação SYBR

Green (Invitrogen). O cDNA foi diluído entre 5 e 10 vezes dependendo do gene analisado e 1 μ L de cDNA diluído foi utilizado para a amplificação gênica. A concentração usada dos primers foi 10 μ M e o volume final da reação foi de 10 μ L. O programa utilizado foi: 10min à 95°C, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15s, 60°C por 30s e 72°C por 30s, ao final foi realizada uma curva de dissociação que consistia em 15s à 95°C, 1min e 30s à 60°C e 15s à 95°C. Segue Tabela 3.3 contendo a sequencia dos pares de primers utilizados:

Tabela 3.3. Sequência dos primers utilizados no trabalho.

Gene	Primer Senso	Primer Anti-senso
GAPDH	5' CAACAGCCTCAAGATCATCAGCAA3'	5' AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT 3'
CDX2	5' CAGCAGCTCTGCAGTACGTC 3'	5' CTCAGGCCTTGAAGAAGTG 3'
IL-8	5' CACCGGAAGGAACCATCT CACT 3'	5' TGCACCTTCACACAGAGCTGC3'
COX-2	5' GCCCTTCCTCCTGTGCC 3'	5' AATCAGGAAGCTGCTTTT TAC 3'
TLR-2	5' TAGTTGTGGGTTGAAGCACTGGA 3'	5' GTGAGCCCTGAGGGAATGGA 3'
TLR-3	5' TGCCACACACTTCCCTGAT 3'	5' ATGATTCTGTTGGATGACTGGT3'
TLR-4	5' CGGTCAGACGGTGATAGC3'	5' TAGGAACCACCTCCACGC3'
TLR-5	5' TCACCAAACCAGGGATGCTA3'	5' TCTCCAGGTTCCGGACAGC 3'

3.11.4 Análise dos resultados de PCR em tempo real

A análise da expressão do RNAm dos genes estudados nas linhagens celulares sob as diferentes condições experimentais foi feita utilizando o método comparativo do C_T (número de ciclos em que a fluorescência emitida por uma amostra ultrapassa um limiar fixo acima da linha de base), que avalia a diferença de expressão entre as amostras considerando a diferença entre o valor do ΔC_T do gene alvo e do ΔC_T do controle endógeno.

3.12 Análise da Expressão Proteica por *Western Blot*

3.12.1 Extração e Dosagem de Proteínas

As diferentes linhagens celulares (Het1a, OE21, OE33) foram cultivadas (1 x 10⁶ células/ poço) em placas de 6 poços por 24h. Após esse período, as células foram

tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 20 µL de tampão de ressuspensão (40mM de Tris-Cl pH 7.5, 10mM EDTA e 60mM pirofosfato de sódio) com adição de 20 µL de SDS 10% e então incubadas à 100°C por 15 minutos. Os extratos foram estocados a -80°C.

As proteínas dos extratos foram então dosadas, utilizando o kit DC Protein Assay seguindo protocolo do fabricante (BIORAD).

3.12.2 Western Blot

Foram utilizados 30µg de proteína. Os extratos proteicos foram separados em um gel de poliacrilamida SDS-PAGE 8% (30% bis-acrilamida (29:1) e tampão de separação 4x pH 8.8 à 25mA. Junto com os extratos, foi aplicado o padrão de peso molecular (Kaledoscope Prestained Standards-BIORAD). Após a corrida, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (10% Metanol), por corrente elétrica (15 volts), por 1 hora à temperatura ambiente (Trans-Blot[®] Semi-Dry electrophoretic transfer cell - BioRad)

Após transferência, as membranas foram bloqueadas por 2 horas com TBS 1x contendo 5% de leite desnatado. Depois do bloqueio, as membranas foram lavadas com TBS-Tween 0,05% e então incubadas por 2 horas com os anticorpos primários: anti-ADRP (1:1000, Fitzgerald- monoclonal), anti-GAPDH (1:1000, Santa Cruz, clone 6C5). Após a incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-Tween 0,05% e incubadas por 1 hora com os respectivos anticorpos secundários conjugados à peroxidase (HRP). Foram utilizados os seguintes anticorpos secundários: anti-guinea pig HRP (Invitrogen) e anti-mouse HRP (Amersham Biosciences) ambos na diluição 1:10000. Em seguida, as membranas foram lavadas 6 vezes com TBS-Tween 0,05% e incubadas com o substrato da peroxidase pelo kit “ECL Western blotting detection reagent” (Amersham Biosciences), como indicado pelo fabricante e autoradigrafadas.

3.13 Marcação dupla com Iodeto de Propideo e BrDU

A linhagem celular Het1a foi cultivadas (1 x 10⁶ células/garrafa) em garrafas pequenas por 24h. Após esse período, as células foram ou não estimuladas por mais 48h com AO e Nicotina. As células foram então pulsadas com BrDU 3h antes do final do período de

incubação de 48h. Após esse período as células foram tripsinizadas, lavadas em PBS, fixadas em etanol 70% e então mantidas à -20°C por 16h. Ao final desse período as células foram lavadas e incubadas em solução HCl 2N com TritonX-100 0,5% por 30min a temperatura ambiente. Em seguida as células foram centrifugadas e ressuspensas em uma solução neutralizadora de Borax 0,1M (Sigma). As células foram novamente centrifugadas, lavadas em PBS 0,1% BSA e então incubadas com anti-BrDU marcado com FITC (Fabricante) por 60min a temperatura ambiente. Ao final as células foram centrifugadas, lavadas em PBS 0,1% BSA e então marcadas com solução de Iodeto de Propídeo a $20\mu\text{g/mL}$ contendo 1mg/mL de RNase em PBS com 0,1% TritonX-100 por 16h a 4°C .

As diferentes amostras marcadas foram então analisadas por Citometria de Fluxo no FACSCalibur (Becton Dickinson). As populações de células em cada perfil de marcação foi delimitado e o percentual de células em cada perfil foi obtido.

3.14 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Incorporated, São Diego, CA, EUA). Foram utilizados o teste *t*-Student não pareado e o teste exato de Fisher para determinar diferenças na análise das amostras, as quais foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. Para as análises das amostras humanas foi utilizado o teste ANOVA e Person R.

4. Resultados

4.1 Avaliação da presença de CL em amostras humanas de tecidos esofágicos

A primeira etapa do trabalho foi avaliar a presença de CL na evolução do câncer de esôfago. Para responder essa questão foi avaliada a expressão da proteína ADRP pela técnica de imunohistoquímica em dez amostras de esôfago normal de não-obesos, 22 amostras de esôfago normal de indivíduos obesos, 19 amostras de indivíduos com EB, 59 amostras de pacientes com ADE e 25 amostras de pacientes com CEE. O perfil sócio-demográfico dos pacientes, assim como as características patológicas das amostras utilizadas no trabalho encontram-se descritas na Tabela 4.1. Como controle positivo da marcação para ADRP foi utilizada uma amostra de adenocarcinoma de cólon.

Na Figura 4.1 podemos ver imagens representativas da marcação para ADRP nos diferentes grupos de amostras humanas avaliados. Podemos observar que não houve marcação para ADRP no epitélio escamoso de esôfago normal de não-obeso, no entanto, no epitélio escamoso do esôfago normal de obesos houve marcação. E esta marcação foi citoplasmática, difusa e fraca. Já nas amostras de EB e ADE, houve marcação para ADRP nas células metaplásicas e tumorais, respectivamente, e essa marcação também ocorreu no citoplasma, porém de forma mais intensa e concentrada na região apical da célula. O mesmo padrão de marcação foi observado na amostra de adenocarcinoma de cólon. Nas amostras de CEE foi observada marcação fraca e difusa para ADRP em apenas poucos casos. Na Figura 4.2 podemos ver imagens representativas da marcação para ADRP nas diferentes amostras de ADE avaliadas pelos patologistas associados ao estudo e classificadas como: marcação fraca, menos de 10% de células marcadas; marcação média, entre 10% e 50% de células marcadas; e marcação forte, onde houve mais de 50% das células marcadas. Na Figura 4.3, está representada graficamente a avaliação do percentual de células positivas para ADRP em cada um dos grupos avaliados. Podemos observar que houve um aumento progressivo no percentual de células ADRP positivas na evolução do ADE (não-obesos sem alteração no esôfago → obesos sem alteração no esôfago → EB → ADE). Já nas amostras de CEE, foi observada uma baixa frequência de células ADRP positivas, com uma média de 4,2% de células esofágicas marcadas. Podemos observar também que o percentual de células positivas

para ADRP em amostras de ADE foi significativamente maior que nas amostras de esôfago normal de não-obesos e CEE. Entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as amostras de EB e ADE quanto ao percentual de células esofágicas marcadas para ADRP.

Seguimos, então, para a investigação de uma possível associação entre a expressão de ADRP nas amostras de ADE, CEE e EB e as características clínico-patológicas dos pacientes. O resultado dessas análises está descrito na Tabela 4.2. Houve uma correlação positiva entre o aumento do percentual de células expressando ADRP e a idade dos pacientes com CEE. Além disso, nas amostras de EB houve uma associação estatisticamente significativa entre a marcação positiva para ADRP e a presença de displasia nas amostras.

Tabela 4.1: Características sócio-demográficas e clínico-patológicas dos pacientes incluídos no estudo

		Esôfago Normal de Não Obesos			Esôfago Normal de Obesos			Esôfago de Barrett			Adenocarcinoma		Carcinoma Epidermoide		
		n	%	p	n	%	p	n	%	p	n	%	n	%	p
	Número de indivíduos	10			22			19			59		25		
Idade (anos)	Mediana	55		0,32	34,5		<0,0001	64		0,69	62		56		0,13
	Intervalo	28 – 84			27 – 60			16 – 83			34 – 83		36 – 84		
Tempo de Seguimento (meses)	Mediana										12,13		31,56		0,12
	Intervalo										0,86 – 139,53		0,5 – 122,4		
Gênero	Feminino	4	40,0%		11	50,0%	0,0006	10	52,6%	0,0006	7	11,8%	6	24,0%	
	Masculino	6	60,0%	0,04	11	50,0%		9	47,3%		52	88,2%	19	76,0%	0,19
	SI	0			0			0			0		0		
Tabagismo	Não	7	70,0%		14	63,6%		4	21,0%		14	23,7%	5	20,0%	
	Sim	0	0,0%		2	9,1%		3	15,7%		20	33,8%	16	64,0%	
	Ex	3	30,0%	0,007	6	27,3%	0,0015	3	15,7%	0,43	24	40,6%	2	8,0%	1
	SI	0			0			9	47,3%		1	1,7%	2	8,0%	
Consumo de bebidas alcoólicas	Não	2	20,0%		9	40,9%		6	31,6%		23	38,9%	14	56,0%	0,22
	Sim	8	80,0%	0,30	13	59,1%	1,00	4	21,0%	0,30	21	35,6%	8	32,0%	
	SI	0			0			9	47,3%		15	25,4%	3	12,0%	
Localização Central do Tumor	Superior										0	0,0%	1	4,0%	
	Médio										10	16,9%	13	52,0%	0,006
	Inferior										37	62,7%	10	40,0%	
	SI										12	20,3%	1	4,0%	
Diferenciação do Tumor	Bem										2	3,4%	2	8,0%	
	Moderadamente										34	57,6%	16	64,0%	0,41
	Pouco										19	32,2%	5	20,0%	
	SI										4	6,7%	2	8,0%	
Estadiamento do Tumor	I										3	5,1%	2	8,0%	
	II										11	18,6%	4	16,0%	
	III										16	27,1%	7	28,0%	0,76
	IV										2	3,4%	4	16,0%	
	SI										27	45,7%	8	32,0%	
Histórico de Refluxo	Não	7	70,0%		17	77,3%		63	66,3%						
	Sim	3	30,0%		5	5,3%		14	14,7%						
	SI	0			0			18	18,9%						

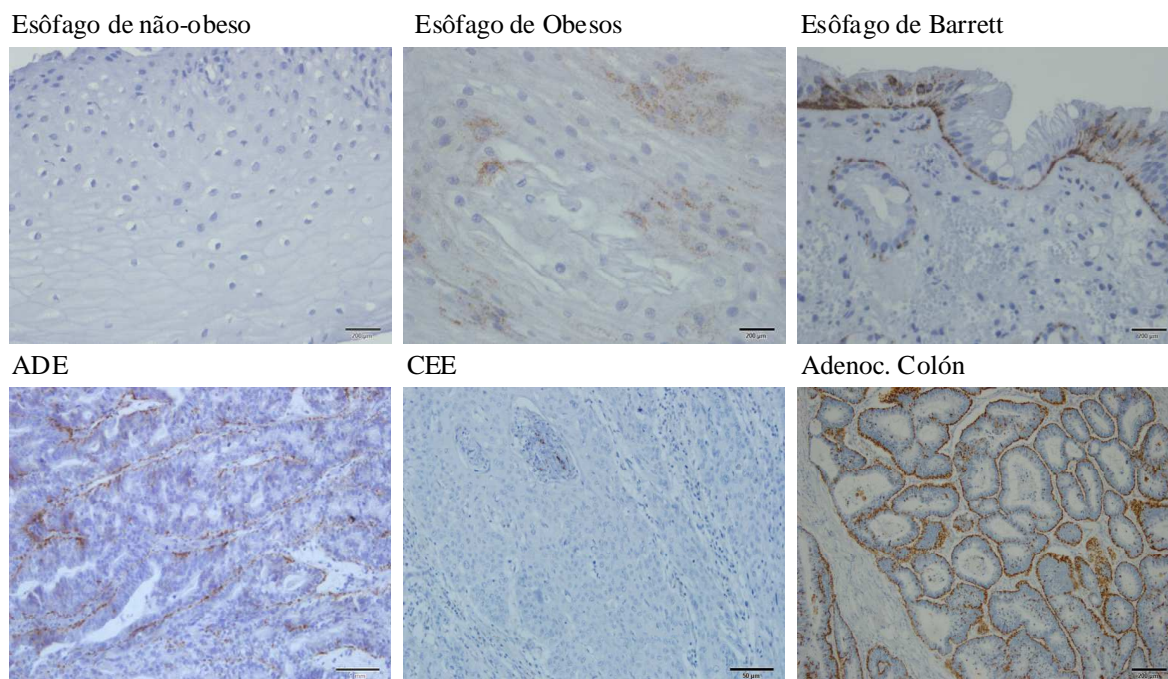


Figura 4.1. Avaliação da expressão de ADRP em amostras humanas de tecidos esofágicos e em adenocarcinoma de cólon. Imagens representativas da marcação de ADRP que foi realizada utilizando a técnica de imunohistoquímica em 10 amostras de esôfago normal de não-obesos, 22 amostras de esôfago normal de obesos, 19 amostras de BE, 25 amostras de CEE, 61 amostras humanas de ADE e uma amostra humana de adenocarcinoma de cólon, provenientes do HUPE, INCA e UFRGS. Fotos feitas em microscópio de campo claro com aumento de 40X em amostras com marcação para ADRP.

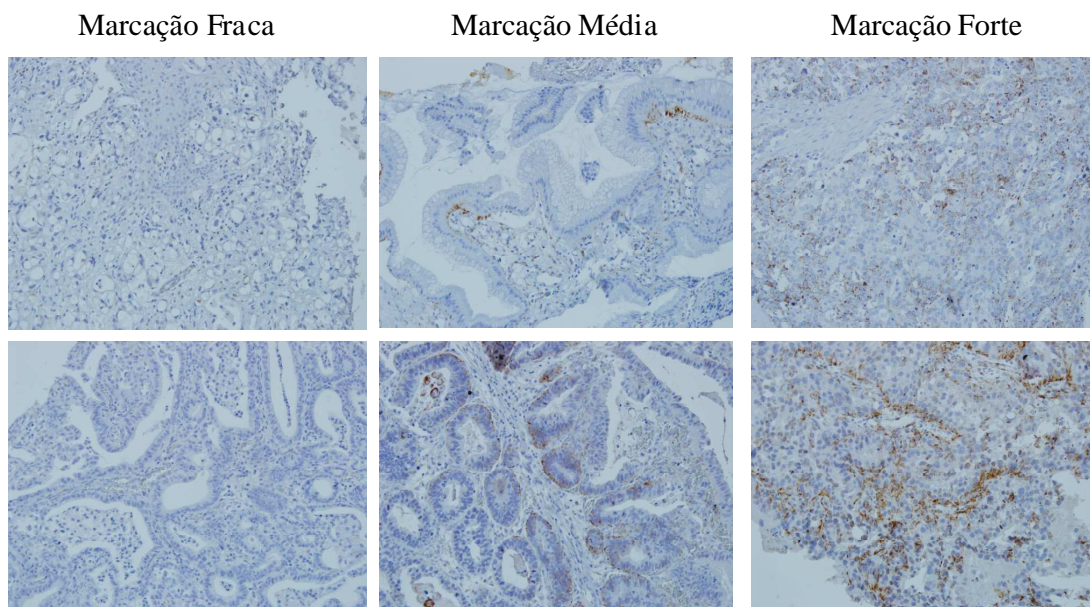


Figura 4.2. Fotos representativas da marcação para ADRP em amostras de ADE. Fotos representativas em microscópio de campo claro (40x) de amostras de ADE com marcação para ADRP fraca, com menos de 10% de células marcadas; marcação média, com mais de 10% de células marcadas e menos de 50% de células marcadas; e marcação forte, com mais de 50% de células marcadas.

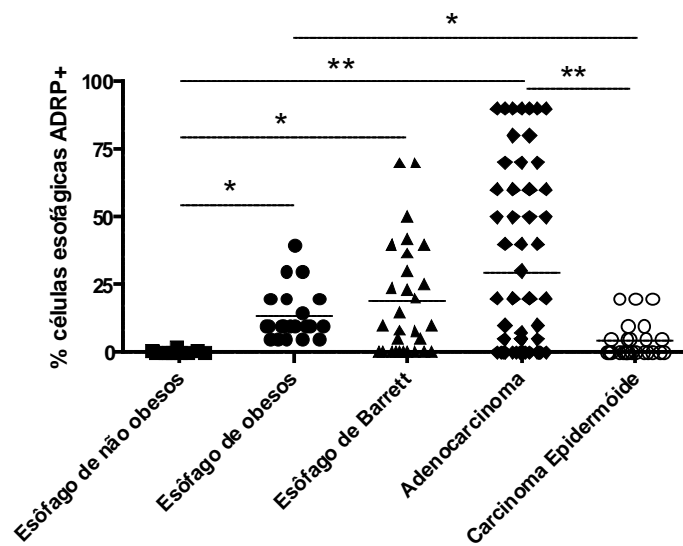


Figura 4.3. Avaliação do percentual de células positivas para ADRP em amostras humanas de tecidos esofágicos. Representação gráfica da distribuição do percentual de células esofágicas com marcação positiva para ADRP nas amostras humanas. Foram analisadas dez amostras de esôfago normal de não obesos, 22 amostras de esôfago normal de indivíduos obesos, 19 amostras de indivíduos com EB, 59 amostras de pacientes com ADE e 25 amostras de pacientes com CEE. As amostras foram avaliadas por 3 patologistas de forma independente. Foi feita mediana dos valores obtidos de cada patologista. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. ANOVA

Tabela 4.2: Associação entre os dados clinico-patológicos e a marcação para ADRP nas amostras de Adenocarcinoma de Esôfago, Carcinoma Epidermóide de Esôfago e Esôfago de Barrett

		Adenocarcinoma		Carcinoma Epidermóide		Barrett	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Idade (anos)	r	0,003		0,47		0,355	
	p	0,98		0,017		0,1357	
Gênero	Feminino	4	3	2	4	7	3
	Masculino	34	18	8	11	6	3
	p	0,691		1		1	
Tabagismo	Nunca	8	6	3	2	3	1
	Sim	29	15	6	12	6	0
	p	0,7504		0,3428		0,4	
Consumo de Bebidas alcoólicas	Nunca	9	14	4	4	5	1
	Sim	23	13	5	9	4	0
	p	0,1071		0,6619		1	
Localização Central do Tumor (terço)	Médio	2	3	6	8		
	Inferior	30	13	3	7		
	p	0,3164		0,6785			
Diferenciação do Tumor	Bem	1	1	1	1		
	Moderadamente	24	12	7	9		
	Pouco	12	7	1	4		
	p	0,8739		0,6033			
Estadiamento do Tumor	Precoce	11	3	2	4		
	Tardio	9	9	4	7		
	p	0,1467		1			
Displasia	Sim					7	0
	Não					6	6
	p					0,0436	

Além da marcação para ADRP foi realizada também a marcação para Ki67 por imunohistoquímica nas amostras humanas de EB, ADE e CEE, com objetivo de avaliar o perfil proliferativo das amostras e comparar à marcação para ADRP. Na Figura 4.4 estão representadas as marcações para Ki67 em amostras de ADE (foto da esquerda) e de CEE (foto da direita), demonstrando que a marcação foi observada, como esperado, no núcleo das células. Houve diferença significativa no percentual de células positivas para Ki67 entre os grupos avaliados (Figura 4.5A), sendo o grupo de amostras de ADE aquele com maior número de casos com percentual elevado de células positivas para Ki67 (Figura 4.5A). Podemos ver na figura 4.5B que não houve correlação entre o percentual de células positivas para Ki67 com o percentual de células positivas para ADRP nas amostras de ADE. O mesmo resultado foi observado para as amostras de EB (dado não mostrado). Apesar de não ter ocorrido tal correlação, o ADE foi o grupo que teve tanto um maior número de casos com alta positividade para ADRP quanto para Ki67.

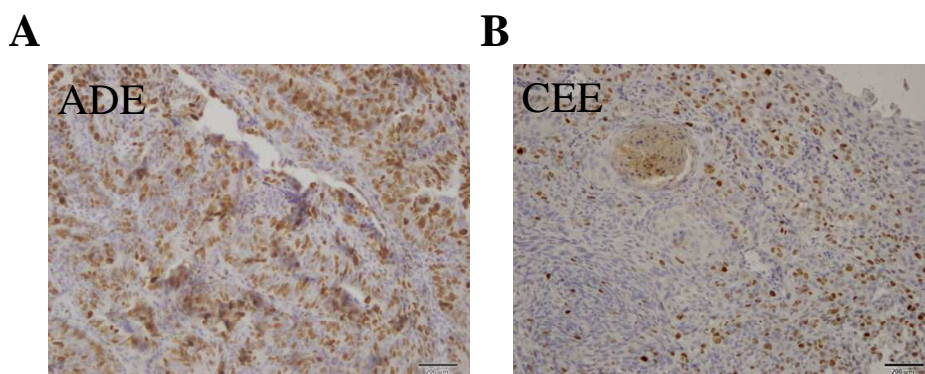


Figura 4.4. Avaliação da expressão de Ki67 em amostras de Adenocarcinoma de esôfago e Carcinoma Epidermóide de esôfago. Fotos representativas em microscópio de campo claro (40x) de marcação positiva para Ki67 em (A) amostra de ADE e (B) amostra de CEE.

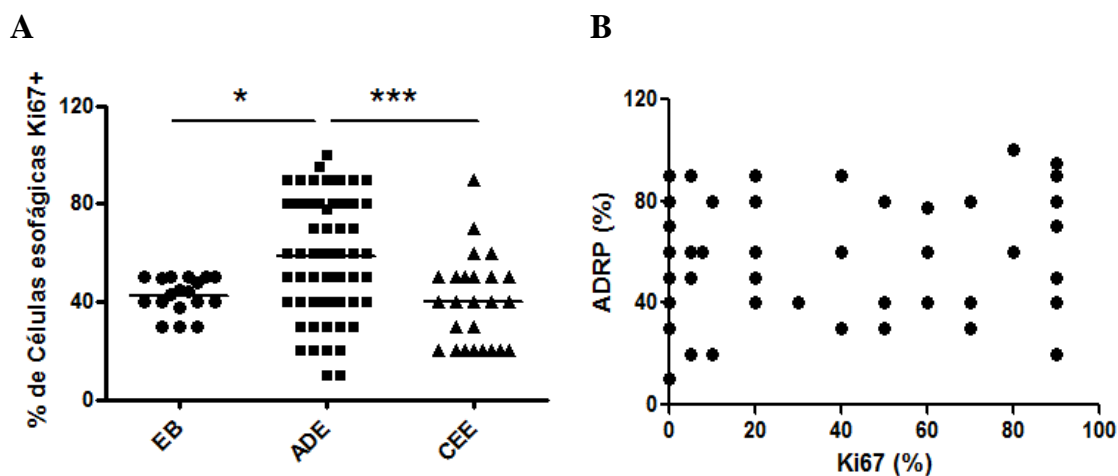


Figura 4.5. Avaliação do percentual de células positivas para Ki67 em amostras humanas de Esôfago de Barrett, Adenocarcinoma de esôfago e Carcinoma Epidermóide de esôfago. Foi realizada marcação por Imuno-histoquímica para Ki67 nas amostras humanas de EB (19 amostras), ADE (59 amostras) e CEE (25 amostras). (A) Representação gráfica da distribuição do percentual de células com marcação positiva para Ki67 em amostras humanas de EB, ADE e CEE. (B) Gráfico de correlação entre o percentual de células com marcação positiva para ki67 com o percentual de células com marcação positiva para ADRP em amostras humanas de ADE. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. ANOVA e Person r

4.2. Avaliação da presença de CL em linhagens celulares de esôfago.

Com objetivo de investigar a diferença significativa no número de CL observada entre os grupos de amostras humanas de esôfago estudados, fomos avaliar o número de CL presentes em diferentes linhagens celulares de esôfago, através da marcação com Oil Red O (ORO). Foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: Het1a, que é uma linhagem de esôfago normal imortalizada, a linhagem OE33, derivada de ADE, e a OE21 que é uma linhagem celular de CEE. Na Figura 4.6A, vemos fotos representativas da marcação com ORO, marcador de lipídeos neutros, e DAPI, um marcador nuclear, nas linhagens celulares de esôfago. Nas Figuras 4.6 A e B é possível observar que a linhagem celular de ADE, OE33, apresentou um número elevado de CL que foi estatisticamente maior que o número observado na linhagem celular de esôfago normal (Het1a) e de CEE (OE21). Esse resultado corrobora a observação prévia nas amostras humanas, onde obtivemos uma marcação mais intensa para CL nas amostras de ADE em relação às amostras de CEE e de esôfago normal de não-obesos.

O perfil proliferativo das linhagens celulares de esôfago também foi avaliado utilizando a técnica de coloração por Tripán 0,4%. A Figura 4.6C mostra que as linhagens

celulares OE33 e OE21 apresentaram maior taxa de proliferação do que a linhagem celular Het1a e que não houve diferença na taxa de proliferação entre as linhagens OE33 e OE21.

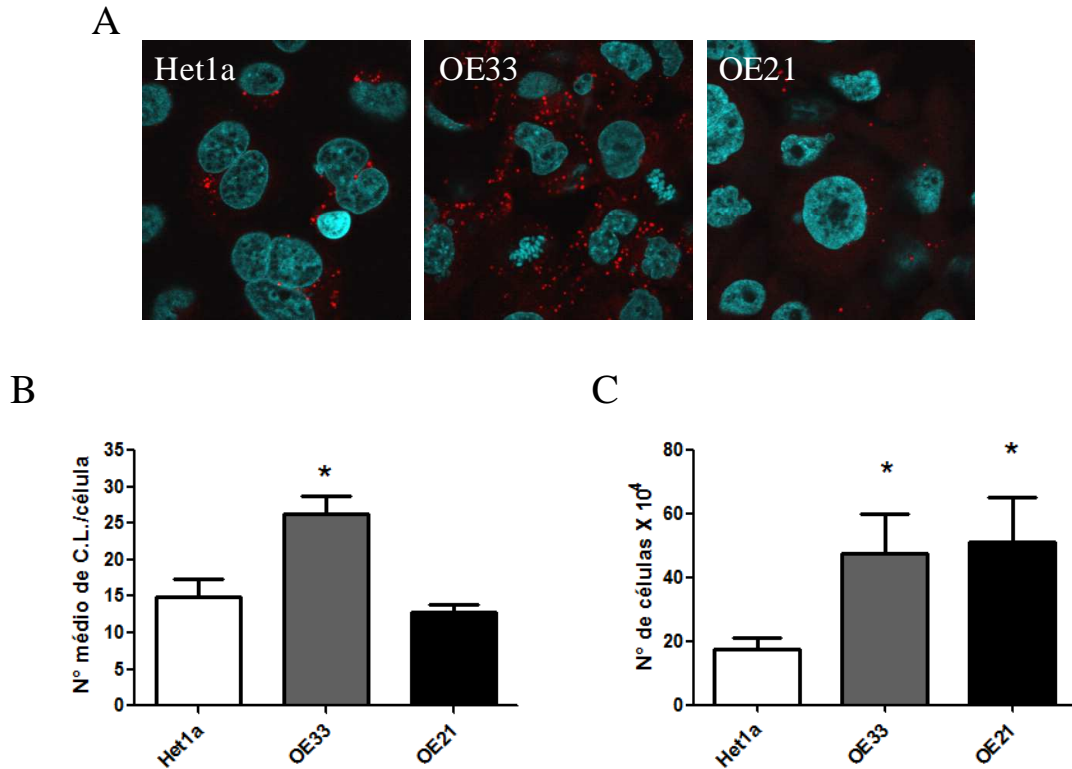


Figura 4.6. Avaliação do número de CL e proliferação nas linhagens celulares de esôfago (A) Fotos representativas em microscopia confocal (100x) da marcação com Oil Red O e DAPI das linhagens de células Het1a, OE33 e OE21. (B) Gráfico representando número médio de CL nas linhagens Het1a, OE33 e OE21. Este gráfico representa a média de quatro experimentos independentes. (C) Gráfico representa a média de quatro experimentos independentes de contagem do número de células após 96h de cultivo das linhagens celulares Het1a, OE33 e OE21. * $p < 0,05$ ANOVA

Ainda com o objetivo de caracterizar a presença de CL nas linhagens celulares de esôfago, foi investigada a expressão da proteína ADRP pela técnica de *Western Blot*, nas linhagens celulares Het1a, OE21, OE33. Na Figura 4.7 vemos que dentre as linhagens celulares de esôfago, somente a linhagem celular OE33 apresentou expressão de ADRP. O passo seguinte foi avaliar a localização de ADRP nas linhagens celulares de esôfago e, para isso, realizamos uma dupla marcação por imunofluorescência para a proteína ADRP e para um marcador de lipídeos neutros (Bodipy). Para corar o núcleo celular utilizamos o marcador fluorescente DAPI. Na Figura 4.8, imagens de microscopia confocal mostram o campo claro, cada uma das marcações separadas e a sobreposição das marcações realizadas nas diferentes

linhagens de esôfago avaliadas. Podemos observar que todas as linhagens apresentaram marcação para Bodipy no citoplasma em forma de pontos, indicando a presença de CL. No entanto, a quantidade de pontos em cada linhagem foi diferente. Conforme observado na marcação para ORO, a linhagem OE33 foi a que apresentou maior número de pontos marcados no citoplasma e a única que apresentou também marcação para ADRP. Além disso, a marcação observada para ADRP na linhagem celular OE33 se sobrepôs à marcação para Bodipy (Figura 4.8), mostrando que a proteína está localizada nos CLs, organelas ricas em lipídeos neutros.

Os resultados observados nas linhagens celulares de esôfago corroboram aqueles obtidos nas amostras humanas de tecido esofágico, indicando que essas células são um bom modelo para estudar o papel dos CLs na carcinogênese esofágica *in vitro*.

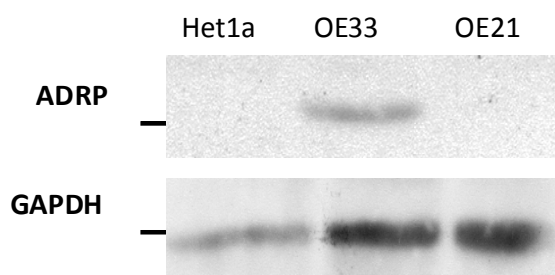


Figura 4.7. Avaliação da expressão proteica de ADRP nas linhagens celulares de esôfago. A linhagem de esôfago normal imortalizada (Het1a) e as linhagens celulares de ADE (OE33) e CEE (OE21) tiveram a expressão da proteína ADRP avaliada pela técnica de *Western Blot* utilizando anticorpo anti-ADRP. Este resultado é representativo de dois experimentos independentes.

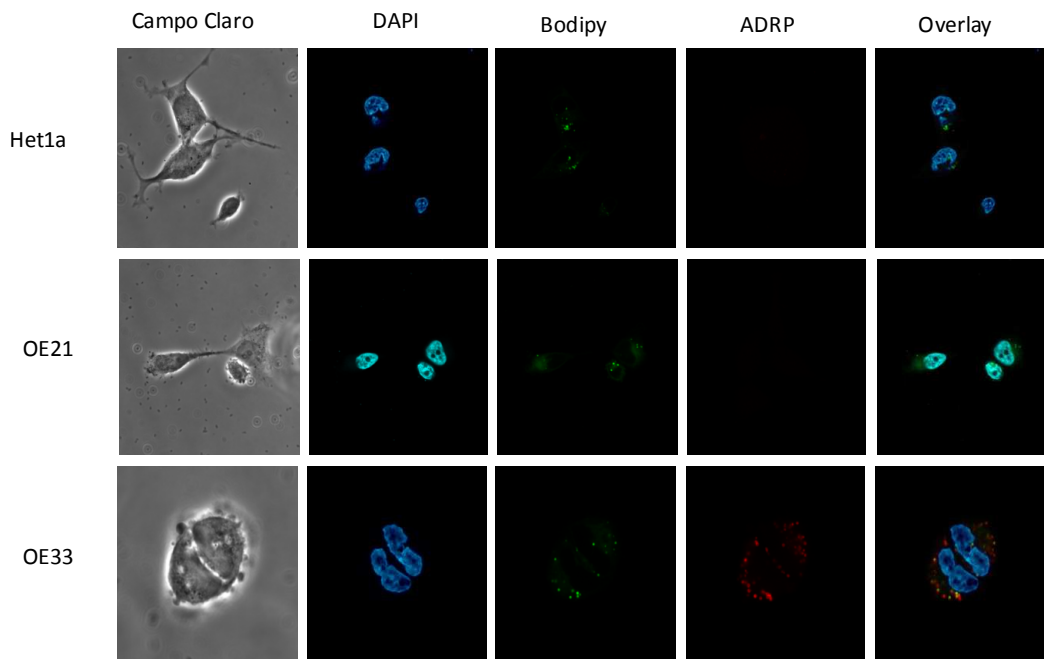


Figura 4.8. Avaliação da localização da proteína ADRP nas linhagens celulares de esôfago. A linhagem de esôfago normal imortalizada (Het1a) e as linhagens celulares de ADE (OE33) e CEE (OE21) foram cultivadas e marcadas com anticorpo anti-ADRP (Alexa Fluor 568), Bodipy (Verde) e DAPI (azul). Fotos representativas em microscopia confocal (100x) das linhagens em campo claro, das marcações separadas e em sobreposição. Este resultado é representativo de três experimentos independentes.

4.3. Avaliação do papel dos fatores de risco associados ao ADE na formação de CL e suas consequências funcionais em linhagem celular de esôfago normal

O aumento na quantidade de CL observado nos grupos de amostras humanas que representam a evolução do ADE (não-obesos sem alteração no esôfago→obesos sem alteração no esôfago→EB→ADE), levantou a hipótese de que o aumento no número de CL poderia estar ocorrendo desde estágios iniciais da carcinogênese esofágica e que os fatores de risco associados ao desenvolvimento do ADE poderiam ter participação nessa alteração. Dessa forma, a etapa seguinte foi avaliar o número de CL e a modulação de funções celulares cruciais em células de tecido esofágico normal submetidas aos fatores de risco associados ao ADE.

4.3.1 Influência dos fatores de risco associados ao ADE na formação de CL em linhagem celular de esôfago normal

Com o objetivo de avaliar a possível participação dos fatores de risco associados ao desenvolvimento do ADE na alteração do número de CL na progressão do câncer de esôfago, estimulamos a linhagem celular de esôfago normal, Het1a, com: 1. ácido oléico (AO) ou leptina, como estímulos associados a obesidade; 2. ácido desoxicólico (DCA), um ácido biliar, e meio com pH ácido (pH 5.0), ajustado com ácido clorídrico (HCl), simulando *in vitro* o refluxo gástrico-esofágico; e 3. nicotina, como estímulo associado ao tabagismo. Ao final de cada um dos estímulos, contamos o número de CL, através da marcação por ORO.

Como ilustrado na figura 4.9A e 4.9B, as diferentes concentrações de ácido oléico utilizadas foram capazes de induzir um aumento significativo, dose-dependente no número de CL na linhagem Het1a, enquanto que a Leptina, nas doses empregadas, não foi capaz.

O ácido biliar (DCA) e o meio com pH ácido foram capazes de induzir um aumento no número de CL (Figuras 4.9C e 4.9D) e esse aumento foi proporcional ao número de pulsos de incubação com DCA e pH ácido, ajustado com HCl. O DCA pareceu ser mais eficiente em induzir aumento no número de CL na linhagem celular Het1a do que o meio com pH ácido, já que, com menor número de pulsos de incubação o DCA já foi capaz de levar à formação de um número maior de CL. Além disso, a combinação do DCA com o meio com pH ácido acentuou o aumento do número de CL, quando comparamos aos estímulos isolados, na linhagem celular Het1a (Figura 4.9E).

Por último, observamos que a nicotina também induziu aumento do número de CL na linhagem celular Het1a, na maior concentração utilizada (Figura 4.9F). Esses resultados demonstram que os fatores de risco associados ao desenvolvimento do ADE, com exceção da leptina, são capazes de induzir um aumento no número de CL em linhagem celular de esôfago normal.

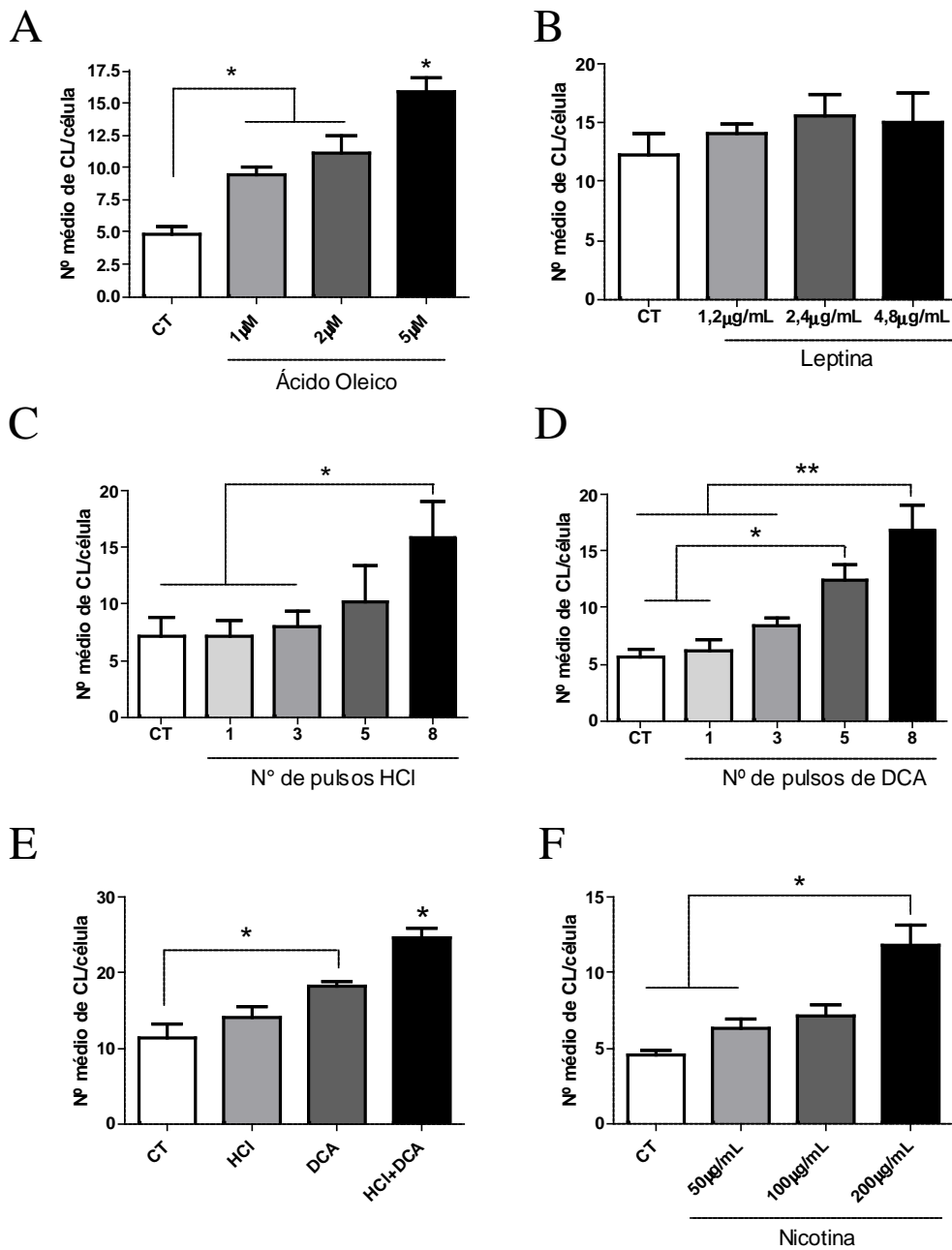


Figura 4.9. Avaliação do número de CL na linhagem de esôfago normal quando exposta aos fatores de risco associados ao Adenocarcinoma de Esôfago. O número de C.L. foi avaliado através da marcação para Oil Red O e determinados através do software ImageQuant TL (GE Healthcare) na linhagem Het1a submetida aos seguintes estímulos: **(A)** concentrações crescentes (1,2 e 3µM) de ácido oleico. **(B)** concentrações crescentes (1,2, 2,4 e 4,8µg/mL) de Leptina. Gráfico representativo da média de 2 experimentos independentes. **(C)** a diferentes quantidades (1, 3, 5 e 8) de exposições de 3 min com meio ajustado para pH 5.0 com HCl. O intervalo entre cada exposição era de 30min. **(D)** exposta a diferentes quantidades (1, 3, 5 e 8) de exposições de 3 min com DCA à 200µM. O intervalo entre cada exposição era de 30min. **(E)** exposta a diferentes quantidades de exposições de 3 min com meio ajustado para o pH5.0 com HCl, com meio com DCA à 200µM e meio ajustado para o pH5.0 com HCl e DCA. O intervalo entre cada exposição era de 30min. Ao final da última exposição às células foram mantidas por mais 24h em meio pH7.2. **(F)** concentrações crescentes (50, 100 e 200µg/mL) de Nicotina. Gráficos representativo da média de 3 experimentos independentes. * p<0,05; ** p<0,01 ANOVA

4.3.2 Influência dos fatores de risco associados ao ADE na modulação de parâmetros celulares associados ao processo carcinogênico em linhagem celular de esôfago normal

Tendo observado que os fatores de risco associados ao desenvolvimento do ADE foram capazes de induzir um aumento no número de CL, fomos avaliar se esses estímulos também eram capazes de modular outras características associadas a carcinogênese. Primeiramente, avaliamos a proliferação, por coloração com Tripán 0,4%, e o perfil do ciclo celular, através da marcação com iodeto de propídeo (PI) e análise por citometria de fluxo, na linhagem celular Het1a submetida aos estímulos anteriormente citados.

Na figura 4.10A pode ser observado que a administração de AO nas concentrações mais baixas (1 e 2 μ M), onde já havia sido detectado um aumento no número de CL, não foi capaz de aumentar a proliferação celular, comparando com o controle não tratado. Na concentração mais elevada (5 μ M) de AO, onde houve a maior indução no número de CL, observamos um pequeno aumento no número de células. Seguimos, então, para avaliar se o AO era capaz de alterar o perfil do ciclo celular na linhagem celular Het1a, através da marcação com PI. Podemos ver na Figura 4.10B que não houve alteração no percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular, quando comparamos as diferentes concentrações de AO utilizadas e o controle. Com intuito de melhor elucidar o papel do AO na proliferação e ciclo celular, seguimos para uma análise mais específica e realizamos uma marcação dupla de PI e BrDU na linhagem celular Het1a. Podemos ver na Figura 4.11 que o AO não alterou o percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular, na concentração de 5 μ M, quando comparado ao controle, confirmando o resultado obtido com a marcação simples para PI.

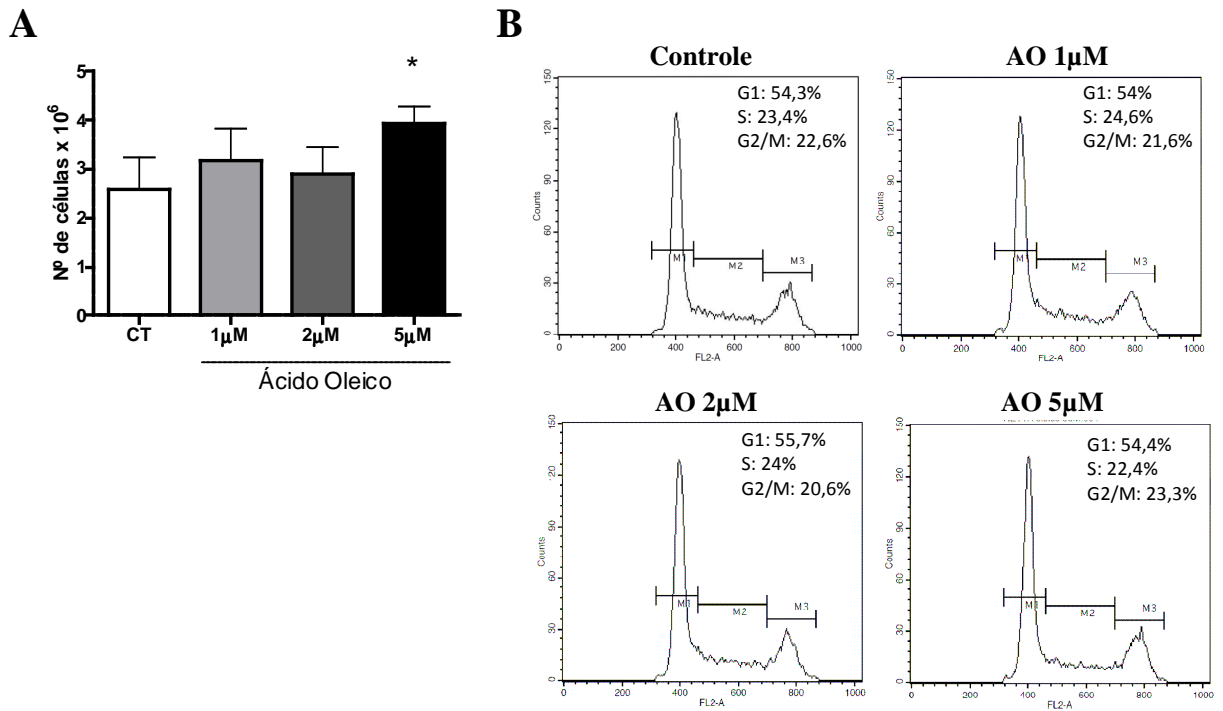


Figura 4.10. Avaliação da proliferação e perfil de ciclo celular da linhagem celular de tecido esofágico normal Het1a após estímulo com diferentes concentrações de ácido oléico. A linhagem Het1a foi incubada com diferentes concentrações de ácido oleico e, após 48h, (A) as células foram contadas com Tripán blue 0,4% no Countess (Invitrogen). Gráficos representativos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ ANOVA (B) e marcadas com tampão de Iodeto de Propídeo e analisada por citometria de fluxo.

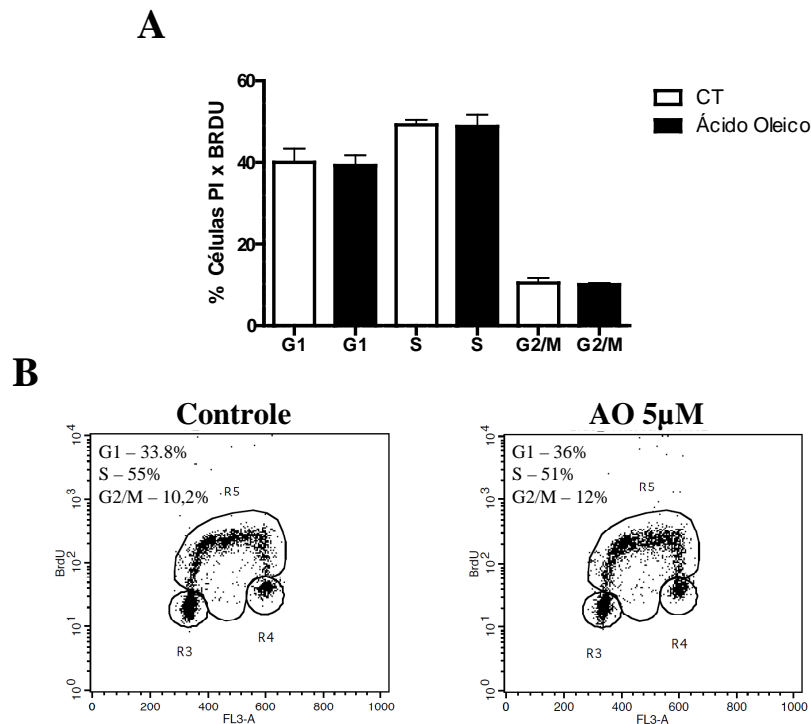


Figura 4.11. Avaliação do perfil de ciclo celular da linhagem celular de tecido esofágico normal Het1a após estímulo com ácido oléico. A linhagem Het1a foi incubada com ácido oleico 5µM e após 48h, as células foram incubadas por 3h com BrDU. Seguiu-se então para marcação com tampão de Iodeto de Propídeo e anti-BrDU e análise por citometria de fluxo. **(A)** Gráfico demonstrativo do percentual de células nas diferentes fases do ciclo no controle e estimulado com ácido oleico. Gráfico representa a média de três experimentos independentes. **(B)** Gráfico de citometria de fluxo representativo de três experimentos independentes.

Em seguida, avaliamos a influência do meio com pH ácido, ajustado com HCl, e do DCA na proliferação da linhagem celular Het1a. Na Figura 4.12 é possível observar que tanto o meio com pH ácido, ajustado com HCl (pH5,0) quanto o DCA, como a combinação dos dois tratamentos foram capazes de induzir um aumento no número de células, quando comparado ao controle. No entanto, não houve diferença entre o número de células detectado nos tratamentos isolados e na combinação deles.

Avaliamos também o papel da nicotina na proliferação e ciclo celular na linhagem celular Het1a. Na Figura 4.13A é possível observar que a nicotina, nas diferentes concentrações utilizadas (50, 100 e 200µg/mL), não foi capaz de alterar o número de células, quando comparado ao controle. No entanto, a análise do perfil do ciclo celular (Figura 4.13B) revelou um aumento de 15% no número de células nas fases S e G2/M quando tratadas com a concentração mais alta de nicotina utilizada (200µg/mL), em relação às células controle. O passo seguinte foi a avaliação da dupla marcação para PI e BrDU que mostrou que a nicotina

(200 μ g/mL) foi capaz de levar a um aumento de 18% no percentual de células nas fases S e G2/M, quando comparamos com o controle, corroborando o resultado observado na marcação simples para PI (Figura 4.14).

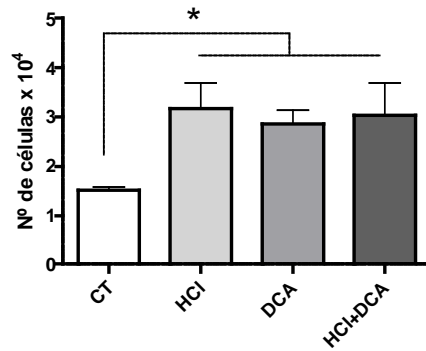
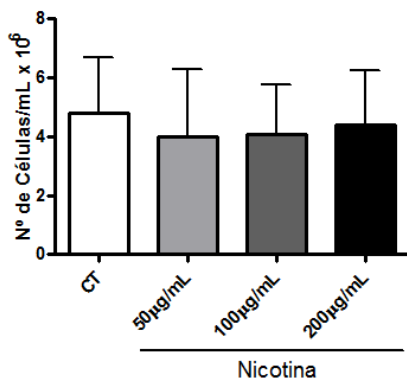


Figura 4.12. Avaliação da proliferação celular nas células de tecido esofágico normal Het1a após pulsos de meio ácido, meio contendo DCA 200 μ M e meio ácido e DCA. A linhagem Het1a foi incubada com 3 pulsos de meio ajustado para o pH5.0 com HCl, meio contendo DCA 200 μ M e meio ajustado para o pH5.0 com HCl e DCA 200 μ M. Após 48h, as células foram contadas com Tripán blue 0,4% no Countess (Invitrogen). Gráfico representa a média de cinco experimentos independentes. * p<0,05. ANOVA

A



B

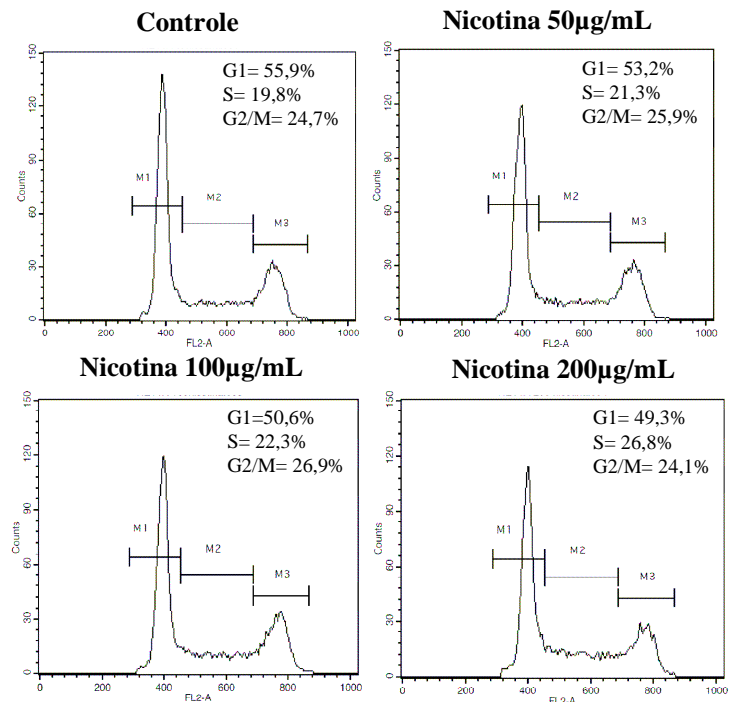


Figura 4.13. Avaliação da proliferação e perfil de ciclo celular da linhagem celular de tecido esofágico normal Het1a após estímulo com diferentes concentrações de Nicotina. (A) A linhagem Het1a foi incubada com diferentes concentrações de Nicotina (50, 100 e 200 μ g/mL). Após 48h, as células foram contadas com Tripán blue 0,4% no Countess (Invitrogen). Gráfico representa a média de três experimentos independentes. (B) A linhagem Het1a foi incubada com diferentes concentrações de Nicotina. Após 48h, as células foram marcadas com tampão de Iodeto de Propídeo e analisadas por citometria de fluxo. Gráfico representativo de três experimentos independentes.

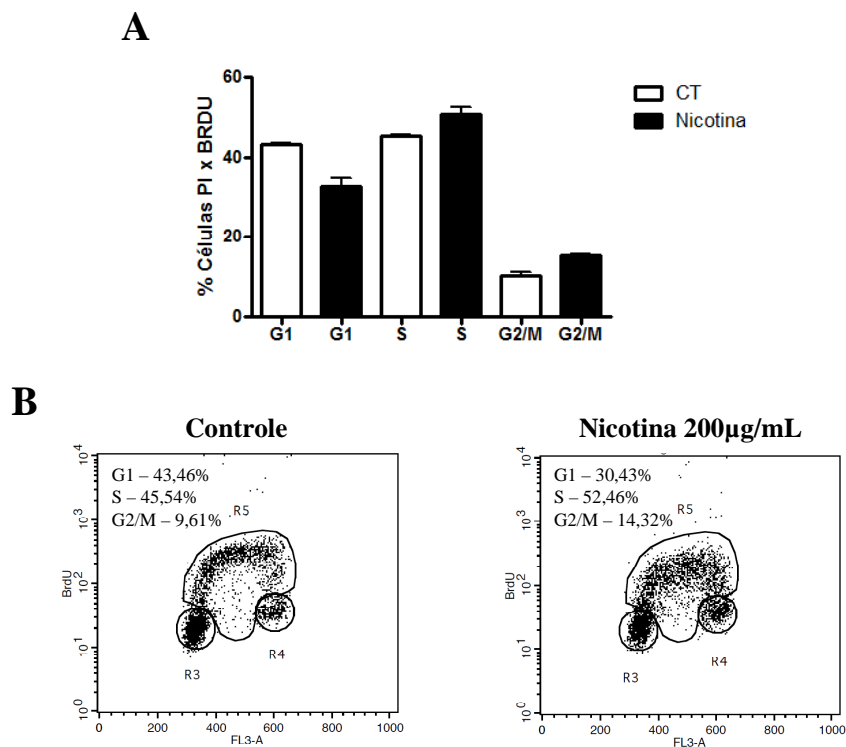


Figura 4.14. Avaliação do perfil de ciclo celular da linhagem celular de tecido esofágico normal Het1a após estímulo com Nicotina. A linhagem Het1a foi incubada com Nicotina 200µg/mL. Após 48h, as células foram incubadas por 3h com BrDU e então seguiram para marcação com tampão de Iodeto de Propídeo e anti-BrDU e analisada por citometria de fluxo. (A) Gráfico demonstrativo do percentual de células nas diferentes fases do ciclo no controle e estimulado com Nicotina. Gráfico representa a média de dois experimentos independentes. (B) Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

4.3.3 Influência dos fatores de risco associados ao ADE na expressão de genes envolvidos nas etapas iniciais da carcinogênese esofágica em linhagem celular normal de esôfago

Ainda na avaliação das possíveis alterações moduladas pelos estímulos associados ao desenvolvimento do ADE, partimos para avaliar a expressão de genes já descritos como alterados em momentos iniciais da carcinogênese esofágica, como *COX-2*, *IL-8* e *CDX2*, por qRT-PCR.

O AO, utilizado na concentração de 5µM, induziu um aumento significativo na expressão gênica de *COX-2* e *CDX2* na linhagem de esôfago normal Het1a, quando comparamos ao controle (Figura 4.15A e B). Ainda, a concentração de 2µM de AO já foi capaz de induzir um aumento significativo de *CDX2* na linhagem celular Het1a, quando comparamos com o controle (Figura 4.15B). Além disso, a expressão de *IL-8* também sofreu

um aumento no tratamento com 5 μ M de AO na linhagem celular Het1A, entretanto, esse aumento não foi estatisticamente significativo (Figura 4.15C). Realizamos, também, a dosagem de IL-8 no meio de cultura da linhagem celular Het1a estimulada com AO e observamos um leve aumento na produção do mesmo após o tratamento com 5 μ M de AO, quando comparado ao controle (Figura 4.15D), corroborando o resultado observado na expressão gênica.

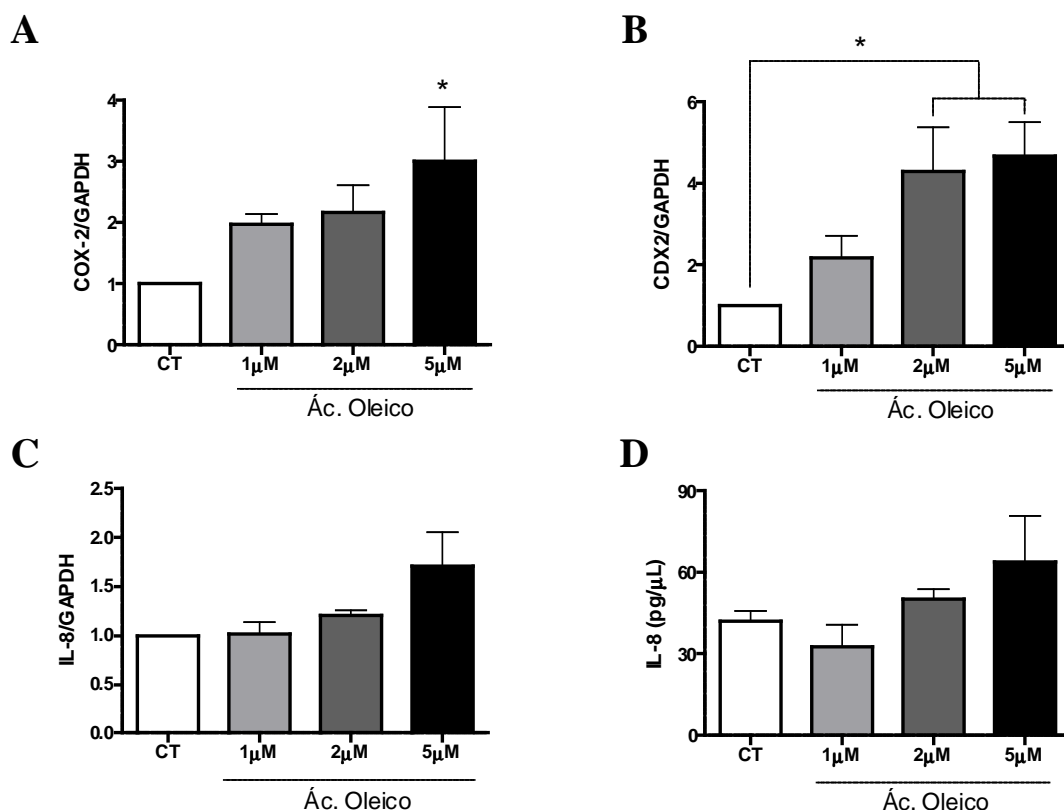


Figura 4.15. Análise da expressão de genes associados ao desenvolvimento do Adenocarcinoma de Esôfago na linhagem celular de esôfago normal (Het1a) estimulada com diferentes doses de ácido oleico. A linhagem Het1a foi incubada com diferentes concentrações de ácido oleico por 24h. Ao final da incubação as células foram colocadas em TRIzol e o RNA foi extraído e passou pela reação da transcriptase reversa. (A) O cDNA formado foi utilizado para realizar PCR em tempo real para os genes *COX-2* e *GAPDH*. (B) O cDNA formado foi utilizado para realizar PCR em tempo real para os genes *CDX2* e *GAPDH*. (C) O cDNA formado foi utilizado para realizar PCR em tempo real para os genes *IL-8* e *GAPDH*. (D) A linhagem Het1a foi estimulada com diferentes concentrações de ácido oleico. Após 24h o sobrenadante foi recolhido e usado para dosagem de IL-8 por ELISA. Gráficos representam a média de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ ANOVA

Seguimos, então, para a avaliação da influência do meio com pH ácido, ajustado com HCl, em combinação com DCA na expressão dos genes acima citados na linhagem celular Het1a. Podemos ver nas Figuras 4.16A, B e C que a combinação do meio com pH ácido (pH5,0) com o DCA (200 μ M) foi capaz de induzir um aumento significativo na expressão de

COX-2, que foi acompanhado por um aumento na produção de PGE_2 , bem como um aumento na expressão de *CDX2*, quando comparamos ao controle. Na Figura 4.16D e E podemos observar um aumento significativo na expressão e produção de IL-8 após estímulo com o meio com pH ácido e DCA na linhagem celular Het1a.

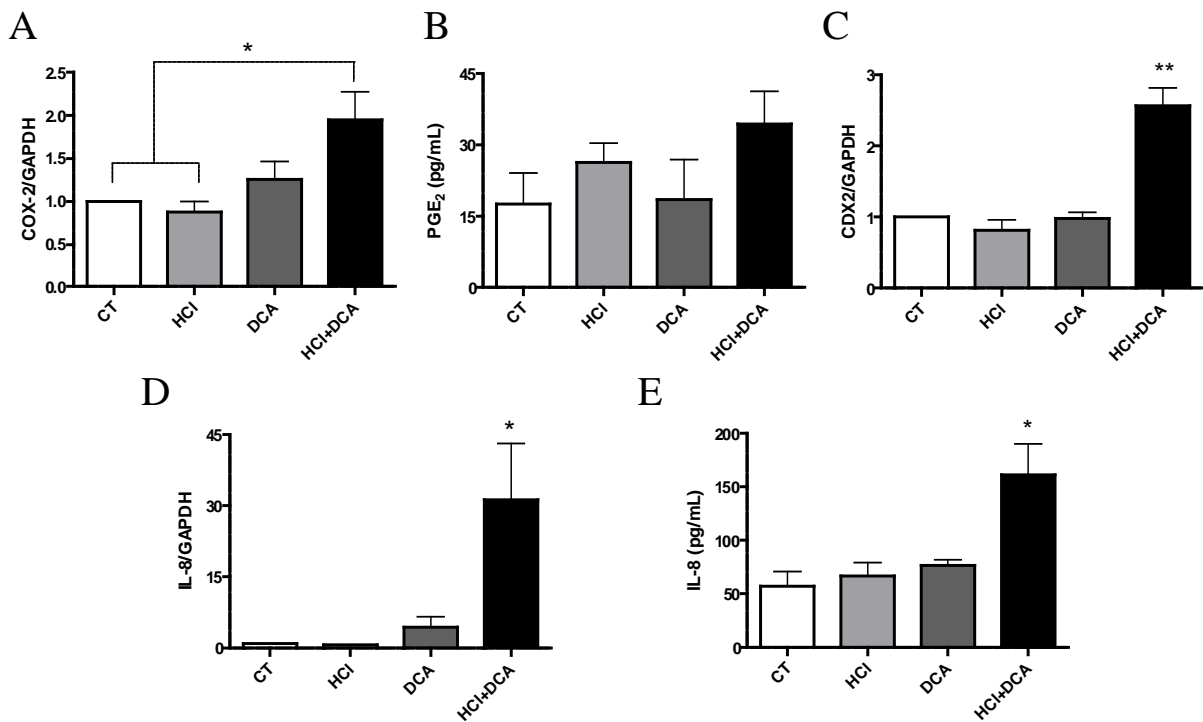


Figura 4.16. Análise da expressão de genes associados ao desenvolvimento do Adenocarcinoma de Esôfago na linhagem celular de esôfago normal (Het1a) estimulada com a combinação de meio com pH ácido com DCA. A linhagem Het1a foi incubada com 3 pulsos de meio com pH5.0, ajustado com HCl, meio contendo DCA 200μM e meio com pH5.0, ajustado com HCl, e DCA 200μM. Ao final da incubação as células foram colocadas em TRIZol, o RNA foi extraído e passou pela reação da transcriptase reversa. (A) O cDNA formado foi utilizado para realizar PCR em tempo real para os genes *COX-2* e *GAPDH*. (B e E) A linhagem Het1a foi estimulada com 3 pulsos de meio com pH5.0, ajustado com HCl, meio contendo DCA 200μM e meio com pH5.0, ajustado com HCl, e DCA 200μM. (B) Após 24h o sobrenadante foi recolhido e usado para dosagem de PGE_2 por ELISA. (C) O cDNA formado foi utilizado para realizar PCR em tempo real para os genes *CDX2* e *GAPDH*. (D) O cDNA formado foi utilizado para realizar PCR em tempo real para os genes *IL-8* e *GAPDH*. Gráficos representam a média de três experimentos independentes. (E) Após 24h o sobrenadante foi recolhido e usado para dosagem de IL-8 por ELISA. Gráfico representa a média de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ ANOVA

Por fim, o tratamento com a nicotina foi capaz de alterar apenas a expressão do gene *COX-2* na linhagem Het1a, na concentração de 200μg/mL (Figura 4.17A). Apesar de ter sido capaz de alterar a expressão de *COX-2*, o tratamento com nicotina não foi capaz de modular a expressão de *CDX2* e *IL-8*, bem como induzir aumento na produção de PGE_2 e *IL-8* em nenhuma das doses utilizadas na linhagem Het1a (Figura 4.17B-E).

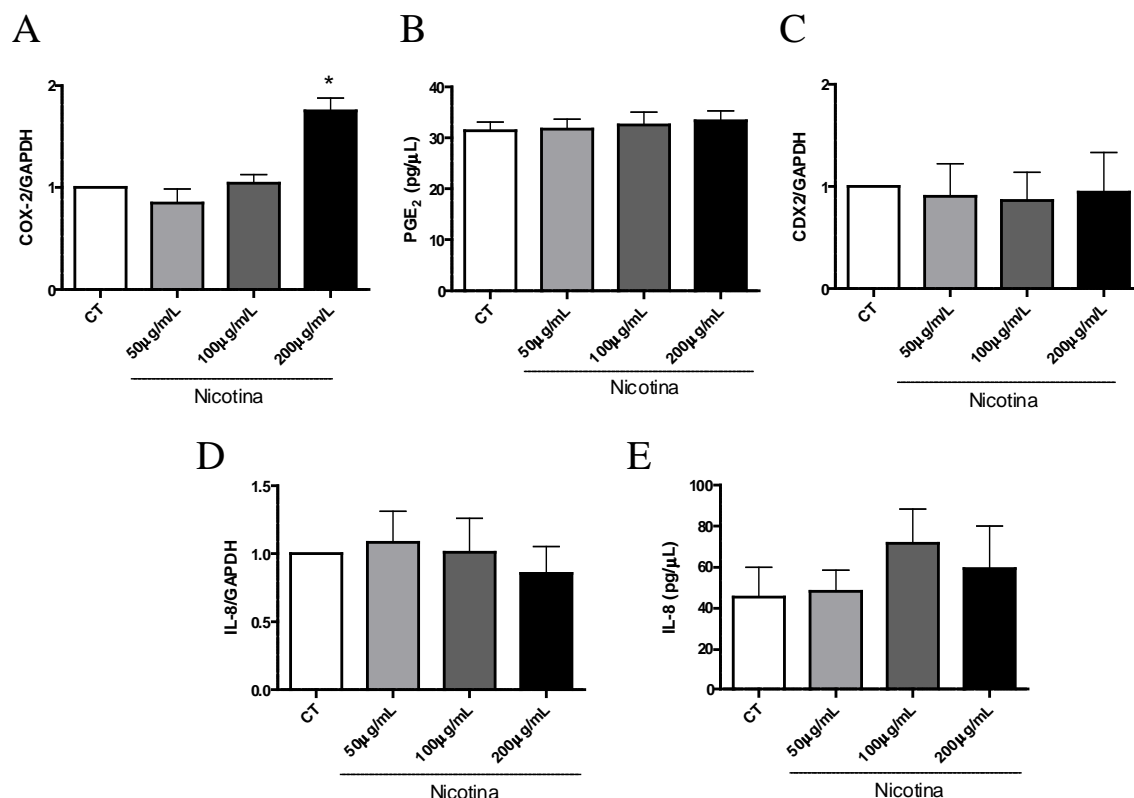


Figura 4.17. Análise da expressão de genes associados ao desenvolvimento do Adenocarcinoma de Esôfago na linhagem celular de esôfago normal (Het1a) estimulada com diferentes doses de Nicotina. A linhagem Het1a foi incubada com diferentes concentrações de Nicotina por 24h. Ao final da incubação as células foram colocadas em TRIzol, o RNA foi extraído e passou pela reação da transcriptase reversa. (A) O cDNA formado foi utilizado para realizar PCR em tempo real para os genes *COX-2* e *GAPDH*. (B e E) A linhagem Het1a foi estimulada com diferentes concentrações de Nicotina. (B) Após 24h o sobrenadante foi recolhido e usado para dosagem de PGE₂ por ELISA. (C) O cDNA formado foi utilizado para realizar PCR em tempo real para os genes *CDX2* e *GAPDH*. (D) O cDNA formado foi utilizado para realizar PCR em tempo real para os genes *IL-8* e *GAPDH*. (E) Após 24h o sobrenadante foi recolhido e usado para dosagem de IL-8 por ELISA. Gráficos representam a média de três experimentos independentes. $p < 0,05$ ANOVA

4.4 Avaliação do papel dos fatores de risco associados ao ADE na formação de CL e suas consequências funcionais em linhagens celulares de ADE e CEE

Uma vez que observamos que os fatores de risco associados ao ADE são capazes de levar a um aumento no número de CL, bem como alterar a proliferação e perfil de ciclo celular e modular a expressão de genes envolvidos em processos iniciais da carcinogênese esofágica, nas células Het-1a, provenientes de tecido esofágico normal, o passo seguinte foi avaliar esses mesmos parâmetros em linhagens celulares de ADE e CEE, após os estímulos com os fatores de risco.

4.4.1 Influência dos fatores de risco associados ao ADE na formação de CL em linhagens celulares de ADE e CEE

O objetivo seguinte do trabalho foi avaliar se os estímulos associados ao desenvolvimento do ADE poderiam levar à alterações no número de CL nas linhagens celulares de ADE e CEE. Para responder essa questão, incubamos as linhagens OE33 e OE21, respectivamente de ADE e CEE, com AO, meio com pH ácido, ajustado com HCl, mais DCA e nicotina e avaliamos o número de CL.

Podemos observar na Figura 4.18A que o AO foi capaz de induzir aumento no número de CL, na maior concentração empregada ($5\mu\text{M}$), somente na linhagem de ADE, OE33, quando comparamos ao controle. Para o estímulo com DCA ($200\mu\text{g/mL}$), meio com pH ácido ($\text{pH}5,0$) e a combinação dos dois, observamos novamente que somente a linhagem celular OE33 apresentou um aumento do número de CL, quando comparado ao controle (Figura 4.18B). De forma semelhante, foi observado um aumento do número de CL na linhagem celular OE33 após o estímulo dessas células com $200\mu\text{g/mL}$ de nicotina (Figura 4.18C). Esses resultados demonstram que apenas a linhagem celular de ADE, OE33, apresenta um aumento no número de CL após os estímulos empregados.

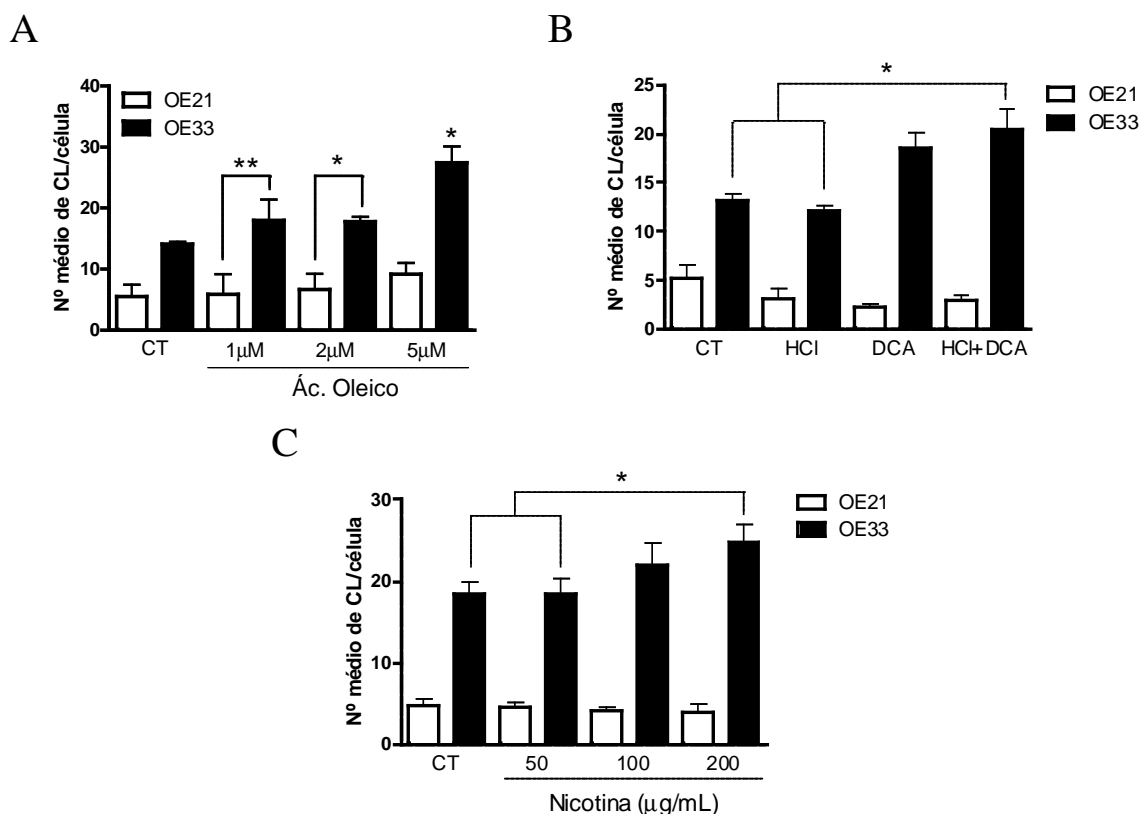


Figura 4.18. Avaliação do número de CL nas linhagens celulares de Adenocarcinoma de Esôfago (OE33) e Carcinoma Epidermóide de Esôfago (OE21) após incubação com ácido oleico, meio com pH ácido, DCA e Nicotina. As linhagens (OE21 e OE33) foram cultivadas e incubadas com diferentes tratamentos por 24h. Ao final da incubação com os respectivos agentes as células foram fixadas, incubadas com Oil Red O e contra-coradas com DAPI. O número de CL por célula foi determinado através do software ImageQuant TL. (A) As linhagens foram incubadas com diferentes concentrações de AO (1, 2 e 5 μM). (B) As linhagens foram expostas a 3 pulsos de exposições com DCA à 200 μM em meio pH5.0, ajustado com HCl. (C) As linhagens foram incubadas com diferentes concentrações de Nicotina (50, 100 e 200 μg/mL) Gráficos representam a média de 3 experimentos independentes. *p<0,05 ANOVA

4.4.2 Influência dos fatores de risco associados ao ADE na expressão de genes envolvidos nas etapas iniciais da carcinogênese esofágica em linhagens celulares de ADE e CEE

Continuando a avaliação do papel dos fatores de risco associados ao ADE nas linhagens OE33 e OE21, seguimos para a avaliação da expressão gênica de *COX-2*, *CDX2* e *IL-8*, por qRT-PCR, após os mesmos estímulos anteriormente utilizados nas linhagens celulares de ADE e CEE.

Na Figura 4.19A podemos ver que com as concentrações de AO utilizadas, houve um aumento na expressão de *COX-2* somente na linhagem OE33, quando comparado ao controle. Além disso, é possível observar que a linhagem celular OE33 apresenta níveis de expressão de

RNA_m de *COX-2* duas vezes maiores do que a linhagem celular OE21 (Figura 4.19A). Observamos, também, que o AO parece não ser capaz de alterar a expressão de *CDX2* de forma significativa nas concentrações utilizadas em ambas as linhagens avaliadas (Figura 4.19B). Entretanto, a linhagem celular OE33 apresenta expressão basal de *CDX2* quase 400 vezes mais alta do que a linhagem celular OE21 (Figura 4.19B). Já para *IL-8*, vemos que o AO foi capaz de induzir aumento na expressão em todas as doses utilizadas, quando comparamos ao controle, somente na linhagem celular OE33 (Figura 4.19C).

A combinação de meio com pH ácido (pH5,0) e DCA (200µg/mL), além do DCA isoladamente, foram capazes de induzir aumento na expressão de *COX-2*, quando comparado ao controle, na linhagem celular OE33 e na linhagem celular OE21. No entanto, esse aumento não foi estatisticamente significativo (Figura 4.20A). Não foi observada alteração na expressão de *CDX2* após estímulo com meio com pH ácido e DCA tanto na linhagem celular OE33, quanto na linhagem celular OE21 (Figura 4.20B). Para *IL-8*, também não foi observada alteração na expressão gênica nem após estímulo somente com DCA nem com a combinação do meio com pH ácido e DCA, em ambas as linhagens (Figura 4.20C). No entanto, a expressão basal de *IL-8* foi mais de 10 vezes maior na linhagem celular OE33 do que na linhagem celular OE21 (Figura 4.20C).

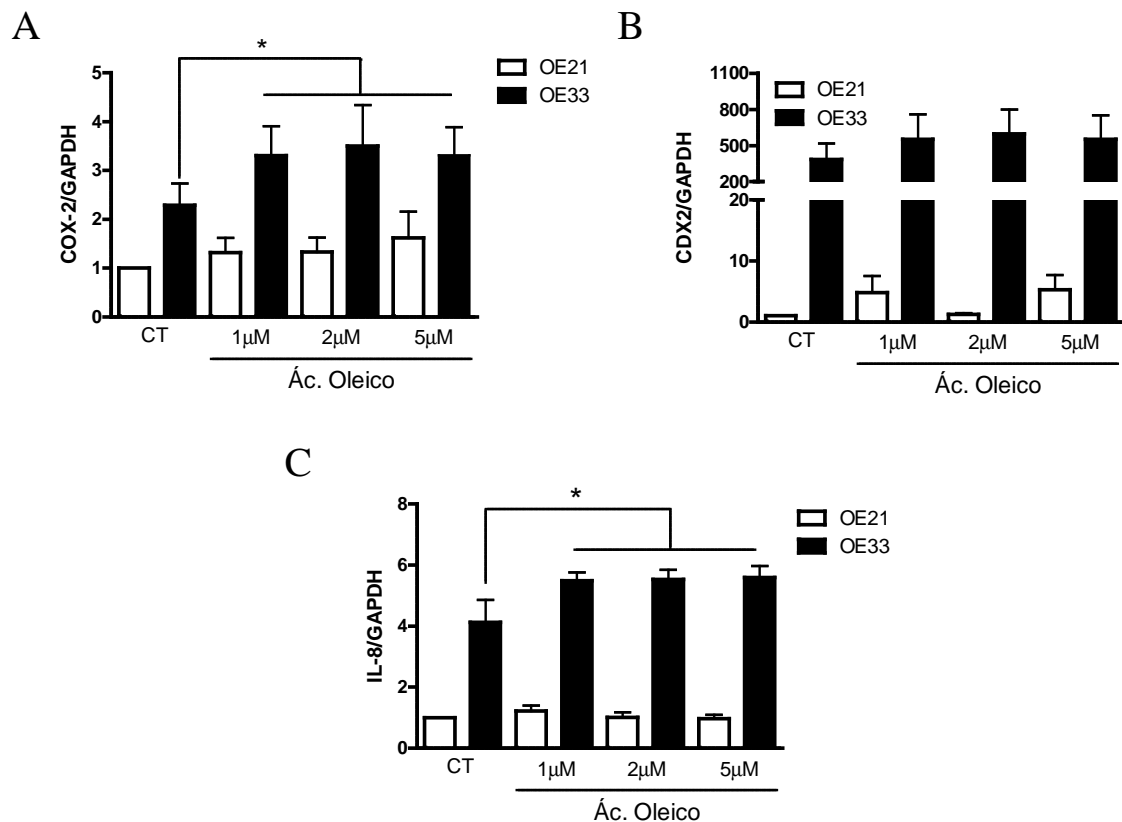


Figura 4.19. Avaliação da expressão de genes envolvidos no desenvolvimento do Adenocarcinoma de Esôfago nas linhagens de Adenocarcinoma de Esôfago (OE33) e Carcinoma Epidermóide de Esôfago (OE21) após incubação com diferentes doses de ácido oleico. As linhagens (OE21 e OE33) foram incubadas com diferentes concentrações de AO (1, 2 e 5µM) por 24h. Ao final da incubação as células foram colocadas em TRIZol, o RNA foi extraído e passou pela reação da transcriptase reversa. **(A)** O cDNA formado foi utilizado para realizar PCR em tempo real para os genes *COX-2* e *GAPDH*. **(B)** O cDNA formado foi utilizado para realizar PCR em tempo real para os genes *CDX2* e *GAPDH*. **(C)** O cDNA formado foi utilizado para realizar PCR em tempo real para os genes *IL-8* e *GAPDH*. Gráficos representam a média de quatro experimentos independentes. * $p < 0,05$ ANOVA

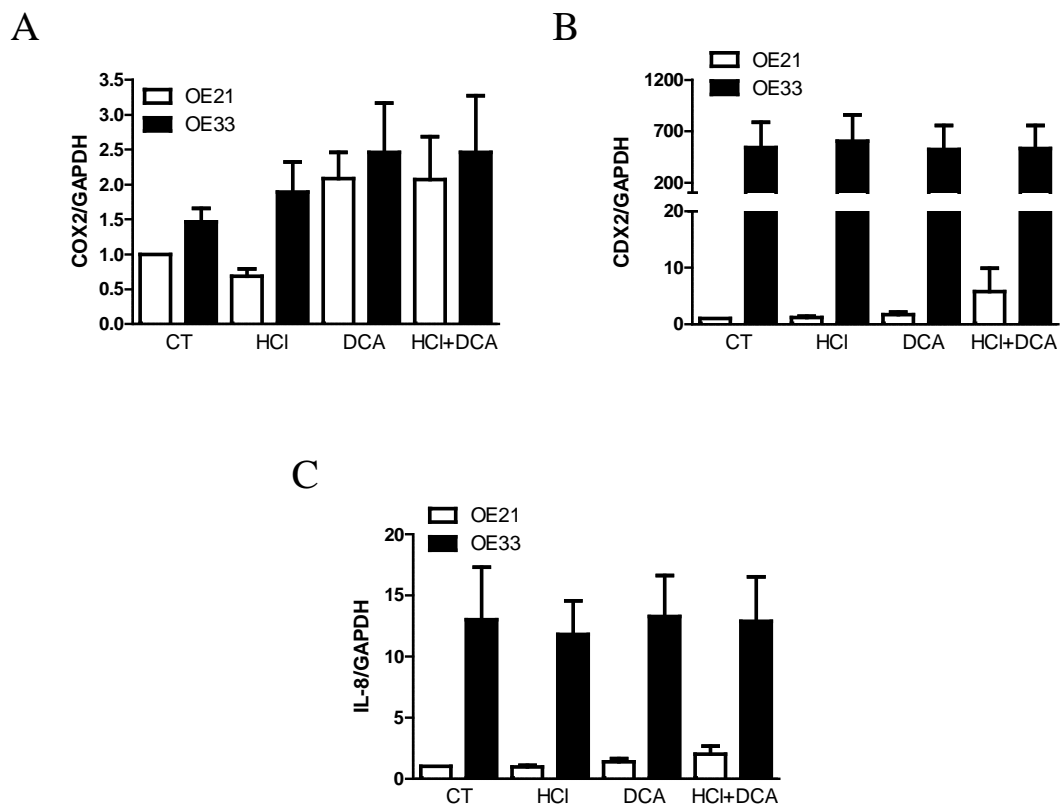


Figura 4.20. Avaliação da expressão de genes envolvidos no desenvolvimento do Adenocarcinoma de Esôfago nas linhagens de Adenocarcinoma de Esôfago (OE33) e Carcinoma Epidermóide de Esôfago (OE21) após incubação com meio com pH ácido e DCA. As linhagens (OE21 e OE33) foram expostas a 3 pulsos de exposições com DCA à 200 μ M em meio com pH5.0 por 24h. Ao final da incubação com os respectivos agentes as células foram colocadas em TRIZol, o RNA foi extraído e passou pela reação da transcriptase reversa. (A) O cDNA formado foi utilizado para realizar PCR em tempo real para os genes *COX-2* e *GAPDH*. (B) O cDNA formado foi utilizado para realizar PCR em tempo real para os genes *CDX2* e *GAPDH*. (C) O cDNA formado foi utilizado para realizar PCR em tempo real para os genes *IL-8* e *GAPDH*. Gráfico representativo de 4 experimentos independentes.

O tratamento das linhagens celulares OE21 e OE33 com concentrações crescentes de nicotina não induziu alterações significativas na expressão de *COX-2*, *CDX2* e *IL-8*, quando comparamos ao controle (Figura 4.21). Mais uma vez vale ressaltar que a linhagem celular OE33 apresenta expressão de *CDX2* aproximadamente 100 vezes maior que a linhagem celular OE21.

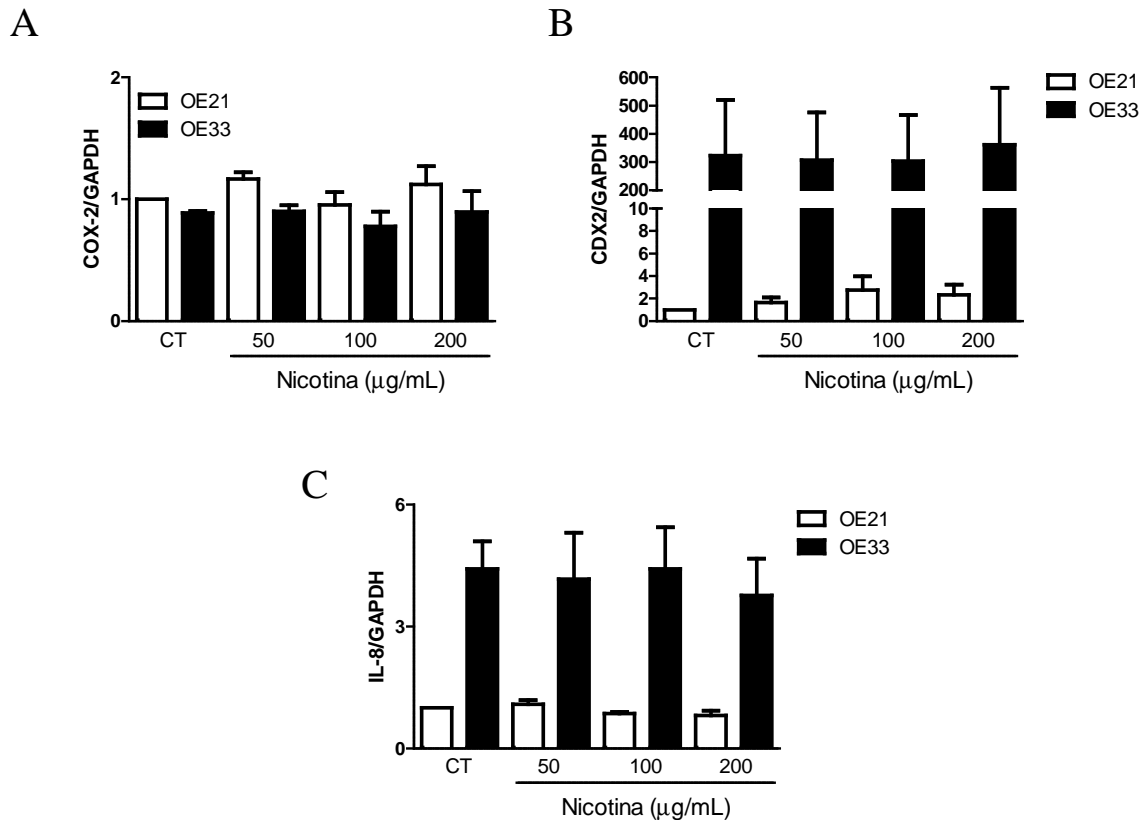


Figura 4.21. Avaliação da expressão de genes envolvidos no desenvolvimento do Adenocarcinoma de Esôfago nas linhagens de Adenocarcinoma de Esôfago (OE33) e Carcinoma Epidermóide de Esôfago (OE21) após incubação com nicotina. As linhagens (OE21 e OE33) foram incubadas com diferentes concentrações de nicotina (50, 100 e 200µg/mL) por 48h. Ao final da incubação com nicotina as células foram colocadas em TRIZol, o RNA foi extraído e passou pela reação da transcriptase reversa. **(A)** O cDNA formado foi utilizado para realizar PCR em tempo real para os genes *COX-2* e *GAPDH*. Gráfico representa a média de dois experimentos independentes. **(B)** O cDNA formado foi utilizado para realizar PCR em tempo real para os genes *CDX2* e *GAPDH*. **(C)** O cDNA formado foi utilizado para realizar PCR em tempo real para os genes *IL-8* e *GAPDH*. Gráfico representa a média de quatro experimentos independentes.

4.5 Avaliação de vias envolvidas no processo inflamatório e correlação com a presença de CL no câncer de esôfago.

Os resultados obtidos até então demonstram que ocorre um aumento no número de CL ao longo da evolução do ADE e que os fatores de risco associados à gênese e/ou progressão desse tumor são capazes de induzir um aumento no número dessas organelas, bem como modular funções celulares e a expressão de genes envolvidos com etapas iniciais da carcinogênese esofágica, tanto em linhagem celular de tecido esofágico normal quanto de ADE. Além disso, o papel do processo inflamatório na carcinogênese já é bem estabelecido (Balkwill & Mantovani, 2001; Abel-Latif *et al.*, 2009; Poehmann *et al.*, 2012). No câncer de

esôfago, a inflamação apresenta um papel central e várias vias envolvidas no processo inflamatório já foram descritas participarem em diversas etapas da carcinogênese esofágica, tanto em ADE quanto em CEE (Anderson *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2007; Abel-Latif *et al.*, 2009). Os CLs são organelas também envolvidas de forma ativa no processo inflamatório, sendo sítios envolvidos na produção de eicosanoides (Fujimoto *et al.*, 2008). Com isso, o passo seguinte deste trabalho foi avaliar a expressão de fatores envolvidos em vias inflamatórias e que participam da carcinogênese esofágica, tanto em amostras humanas quanto nas linhagens celulares de ADE e CEE, com intuito de encontrar possíveis alterações que possam explicar a diferença observada no número de CL entre os dois subtipos histopatológicos de câncer de esôfago.

Primeiramente, fomos avaliar a expressão proteica de COX-2 nas amostras humanas de esôfago normal de não-obesos (10 amostras), esôfago normal de obesos (11 amostras), EB (19 amostras), CEE (25 amostras) e ADE (54 amostras), por imunohistoquímica. Como podemos ver na Figura 4.22, a marcação de COX-2 é citoplasmática e, em alguns casos, perinuclear. No esôfago normal de indivíduos não-obesos houve marcação em alguns casos para COX-2 no citoplasma na região apical. Também podemos ver que houve marcação de células do infiltrado inflamatório. Essa marcação foi utilizada como controle positivo interno da marcação para COX-2. Na figura 4.23A, vemos a representação gráfica do percentual de células positivas para COX-2 nos grupos de amostras avaliados. Podemos ver que houve um maior número de casos com elevado número de células positivas para COX-2 nos grupos de EB, ADE e CEE e, que esse número foi significativamente maior do que o observado para o grupo de esôfago normal de obesos. Somente o grupo de ADE teve percentual de células positivas para COX-2 significativamente maior que no grupo do esôfago normal de não-obesos. Não houve diferença significativa entre os grupos EB, ADE e CEE em relação às células positivas para COX-2 (Figura 4.23A). Quando consideramos a intensidade de marcação, juntamente com o percentual de células positivas para COX-2, vemos que não houve diferença significativa em relação à avaliação feita somente com o percentual de células positivas. Os grupos EB, ADE e CEE permaneceram com maior marcação para COX-2 em relação ao grupo de esôfagos normais de obesos e, diferente da avaliação feita somente com o percentual de células positivas, observamos que o grupo EB apresentou maior marcação para COX-2 em relação ao esôfago normal de não-obesos (Figura 4.23B).

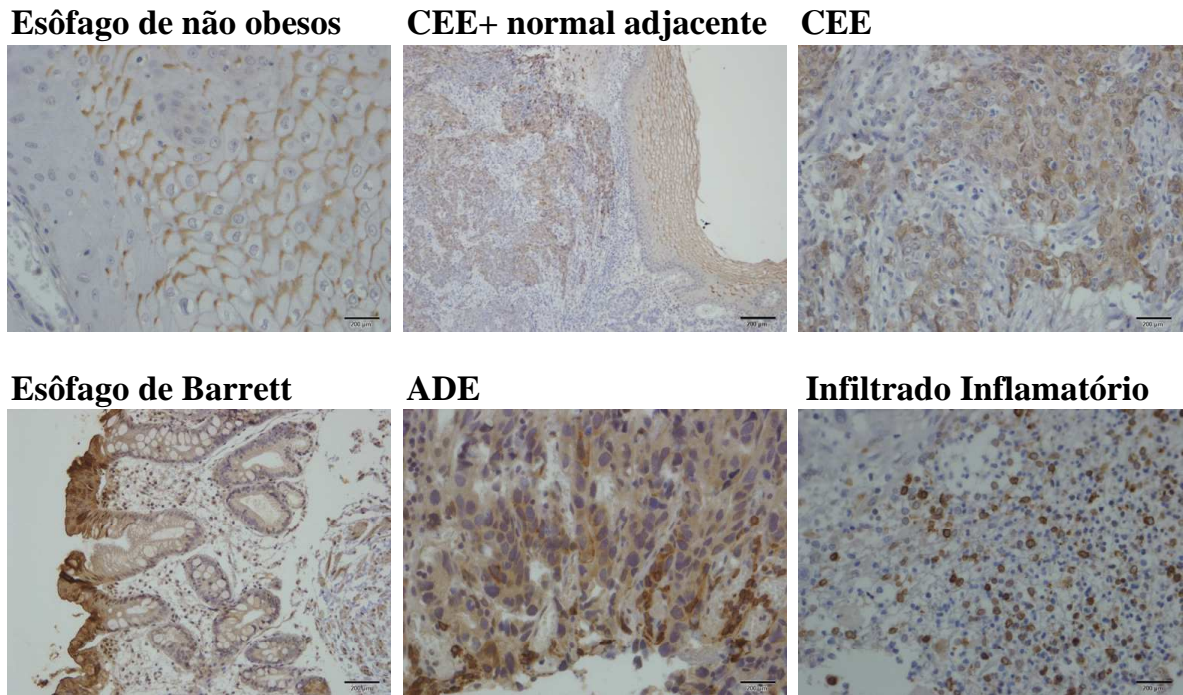


Figura 4.22. Fotos representativas da marcação de COX-2 por Imuno-histoquímica em amostras humanas de esôfago. Dez amostras de esôfago normal de não obesos, 11 amostras de esôfago normal de obesos, 19 amostras de BE, 25 amostras de CEE, 54 amostras humanas de ADE, provenientes do HUPE, INCA e UFRGS, foram selecionadas e realizada marcação por Imuno-histoquímica para COX-2. Fotos representativas em microscópio de campo claro (40x) de amostras com marcação para COX-2.

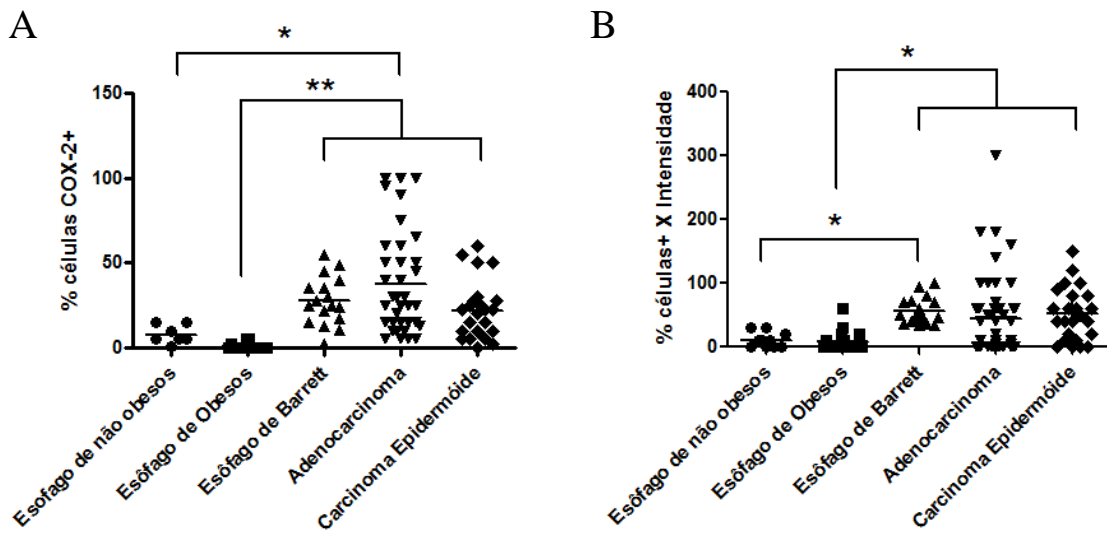


Figura 4.23. Avaliação da marcação para COX-2 em amostras de esôfago normal, Esôfago de Barrett, Adenocarcinoma de Esôfago e Carcinoma Epidermóide de Esôfago. Dez amostras de esôfago normal de não obesos, 11 amostras de esôfago normal de obesos, 19 amostras de BE, 25 amostras de CEE, 54 amostras humanas de ADE, provenientes do HUPE, INCA e UFRGS, foram selecionadas e realizada marcação por Imuno-histoquímica para COX-2. Todas as amostras foram avaliadas de forma independente por três patologistas. (A) Representação gráfica da distribuição do percentual de células com marcação positiva para COX-2 nas amostras humanas. (B) Representação gráfica da avaliação do percentual de células positivas para COX-2 vezes o valor de intensidade para COX-2 nas amostras humanas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ANOVA

Além disso, como nessas mesmas amostras já havia sido realizada a marcação para ADRP, também por imunohistoquímica (Figura 4.1), realizamos uma análise de correlação entre o percentual de células marcadas para ADRP e COX-2 e observamos uma correlação positiva entre o percentual de células positivas para COX-2 e o percentual de células positivas para ADRP nas amostras de ADE (Figura 4.24A), no entanto, para os casos de CEE essa correlação não foi observada (Figura 4.24B).

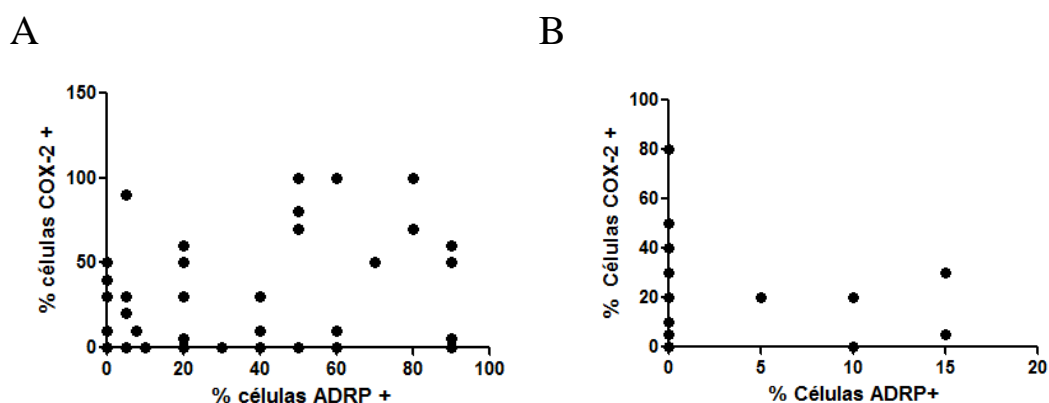


Figura 4.24. Análise da correlação entre as marcações para COX-2 e para ADRP nas amostras de Adenocarcinoma de Esôfago e Carcinoma Epidermóide de Esôfago. (A) Gráfico de correlação entre o percentual de células com marcação positiva para COX-2 com o percentual de células com marcação positiva para ADRP em amostras humanas de ADE. Correlação teve valor de $p < 0,046$ e R^2 0,80 (B) Gráfico de correlação entre o percentual de células com marcação positiva para COX-2 com o percentual de células com marcação positiva para ADRP em amostras humanas de CEE. Correlação teve valor de $p < 0,5656$ e R^2 0,014. Pearson

Seguimos, então, para a avaliação da expressão gênica, por qRT-PCR, de *COX-2* e da produção de PGE_2 , por ELISA, nas linhagens celulares de esôfago normal (Het1a), de ADE (OE33) e de CEE (OE21). Como pode ser observado, a linhagem celular OE33 foi a que mais expressou *COX-2*, quando comparada às outras linhagens celulares avaliadas (Figura 4.25A). Além disso, observamos, também, que a linhagem celular OE33 também foi a que mais produziu PGE_2 (Figura 4.25B), demonstrando que, além da expressão gênica, a atividade da *COX-2* também estava aumentada nessas células.

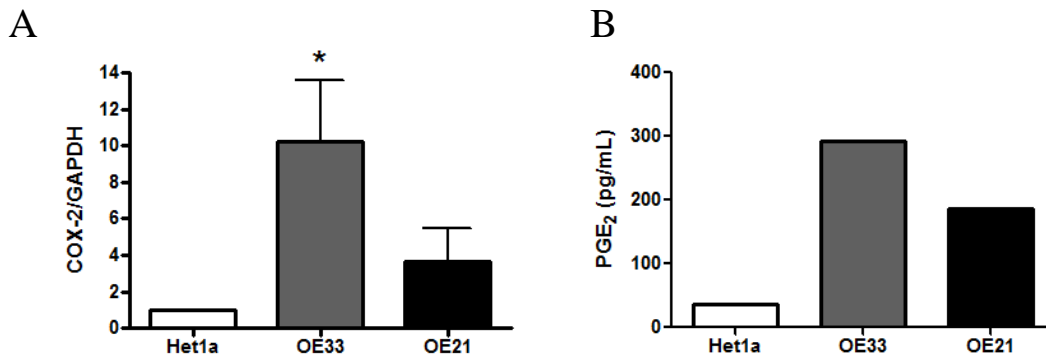


Figura 4.25. Avaliação da expressão de COX-2 e produção de PGE₂ nas linhagens celulares de esôfago. (A) As linhagens celulares de tecido esofágico normal (Het1a), de ADE (OE33) e de CEE (OE21) foram cultivadas por 24h e, ao final desse período, foram colocadas em TRIZol (Invitrogen). O RNA foi extraído e passou pela reação da transcriptase reversa. O cDNA sintetizado foi utilizado para realizar RT-PCRq para os genes *COX-2* e *GAPDH*. Gráfico representa média de 4 experimentos independentes. (B) As diferentes linhagens foram cultivadas por 72h, ao final desse período, o sobrenadante foi recolhido. O sobrenadante foi utilizado para dosagem de Prostaglandina E₂, pelo kit Prostaglandina E2 EIA KIT. Foi realizado apenas um experimento. *p<0,05 ANOVA

A expressão de COX-2 pode ser induzida através de diversas vias celulares, a partir da ativação de vários receptores. Dentre os receptores que ativam a via de COX-2, podemos ressaltar os receptores Toll-Like (TLR) (Pacheco *et al.*, 2002; D'Avila *et al.*, 2006). Com objetivo de avaliar a possível participação dos TLRs na ativação da expressão de COX-2 nas linhagens celulares de câncer de esôfago, o passo seguinte do trabalho foi avaliar a expressão gênica de diversos membros da família dos TLRs nas linhagens celulares OE21 e OE33, por qRT-PCR. Como podemos ver na Figura 4.26, a linhagem celular OE33 apresentou maior expressão dos genes *TLR2*, *TLR4* e *TLR7* do que a linhagem celular OE21.

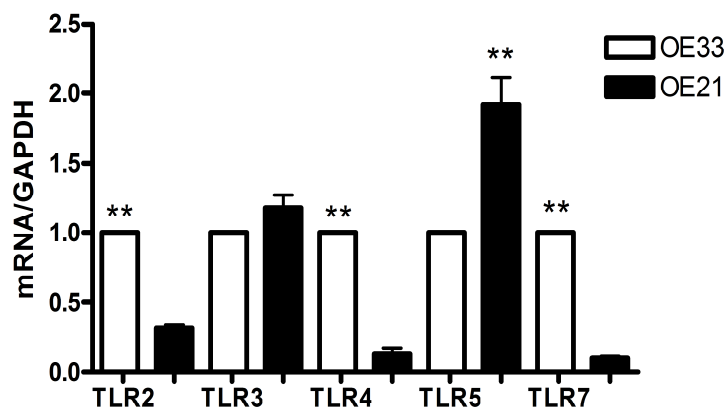


Figura 4.26. Avaliação dos receptores TLR nas linhagens celulares OE21 e OE33. As diferentes linhagens (OE21 e OE33) foram cultivadas por 24h e, após esse período, as células foram colocadas em TRIZol (Invitrogen), RNA foi extraído e passou pela reação da transcriptase reversa. O cDNA sintetizado foi utilizado para realizar RT-PCRq para os genes *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR7* e *GAPDH*. **p<0,01 Teste T

Em seguida, avaliamos se a diferença encontrada na expressão gênica dos *TLRs* e *COX-2* estaria relacionada à formação de CL. Para tal, ativamos o TLR4 nas linhagens celulares OE21 e OE33 através do tratamento das mesmas com 0,5µg/mL de LPS, seu ligante específico. Além disso, para avaliarmos se a ativação de TLR4 nas linhagens celulares OE21 e OE33 e as possíveis alterações no número de CL ocorrem via *COX-2*, utilizamos também um inibidor de COX, o ácido acetil salicílico (ASA), na concentração de 500µg/mL e verificamos o número de CL pela marcação com Oil Red O, a proliferação celular, pela marcação com cristal violeta, a expressão gênica de *IL-8* por RT-PCRq e a produção de PGE₂ e de IL-8, empregando a técnica de ELISA.

Como podemos ver na figura 4.27, o LPS foi capaz induzir um aumento no número de CL na linhagem OE33, quando comparamos ao controle não tratado. A adição de ASA à linhagem OE33 tratada com LPS inibiu esse aumento do número de CL induzido por LPS, demonstrando que a inibição de COX é capaz de reverter o fenômeno. No entanto, o mesmo resultado não foi observado para linhagem celular OE21. Nesta linhagem celular, todos os tratamentos foram incapazes de alterar o número de CL de forma significativa. Entretanto, a ativação de TLR4 por LPS nas linhagens OE21 e OE33, levou ao mesmo fenótipo em relação à proliferação, produção de PGE₂ e expressão gênica de *IL-8*. Como podemos ver nas figuras 4.28A, B e C, o LPS foi capaz de induzir um aumento na proliferação, produção de PGE₂ e expressão gênica de *IL-8*, e a ASA foi capaz de reverter esse aumento, em ambas as linhagens celulares. Porém, para produção de PGE₂, a diferença observada na linhagem celular OE21 não foi estatisticamente significativa. No entanto, quando avaliamos a produção de IL-8 nas linhagens celulares de câncer de esôfago, vimos que o estímulo com LPS só foi capaz de induzir aumento na produção de IL-8 na linhagem celular OE33, enquanto que na linhagem celular OE21 nenhum dos estímulos foi capaz de alterar de forma significativa a produção de IL-8. Ainda, a quantidade de IL-8 induzida por LPS na linhagem celular OE33 foi quase 3 vezes maior do que na linhagem celular OE21. A ASA foi capaz de reverter a produção de IL-8 induzida por LPS na linhagem celular OE33 (Figura 4.28D).

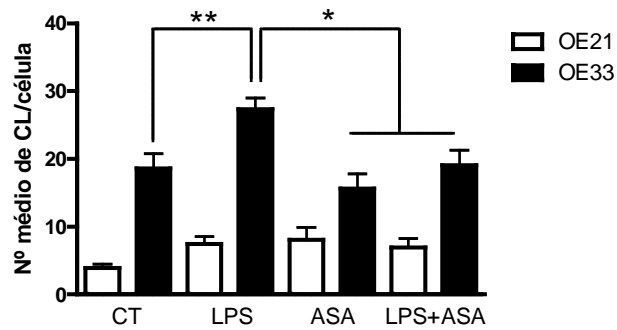


Figura 4.27. Avaliação do número de CL após ativação de TLR4 com LPS e inibição de COX-2 com ASA nas linhagens celulares OE21 e OE33. As linhagens celulares OE21 e OE33 foram cultivadas com ou sem adição de LPS (0,5µg/mL), ASA (500µg/mL) e LPS mais ASA por 24 horas. Após esse período foram fixadas com formaldeído 3,7% e incubadas com Oil Red O e contra-coradas com DAPI. O número de CL por célula foi determinado através do software ImageQuant TL (GE Healthcare). Gráfico representa a média de cinco experimentos independentes. * $p < 0,05$ ANOVA

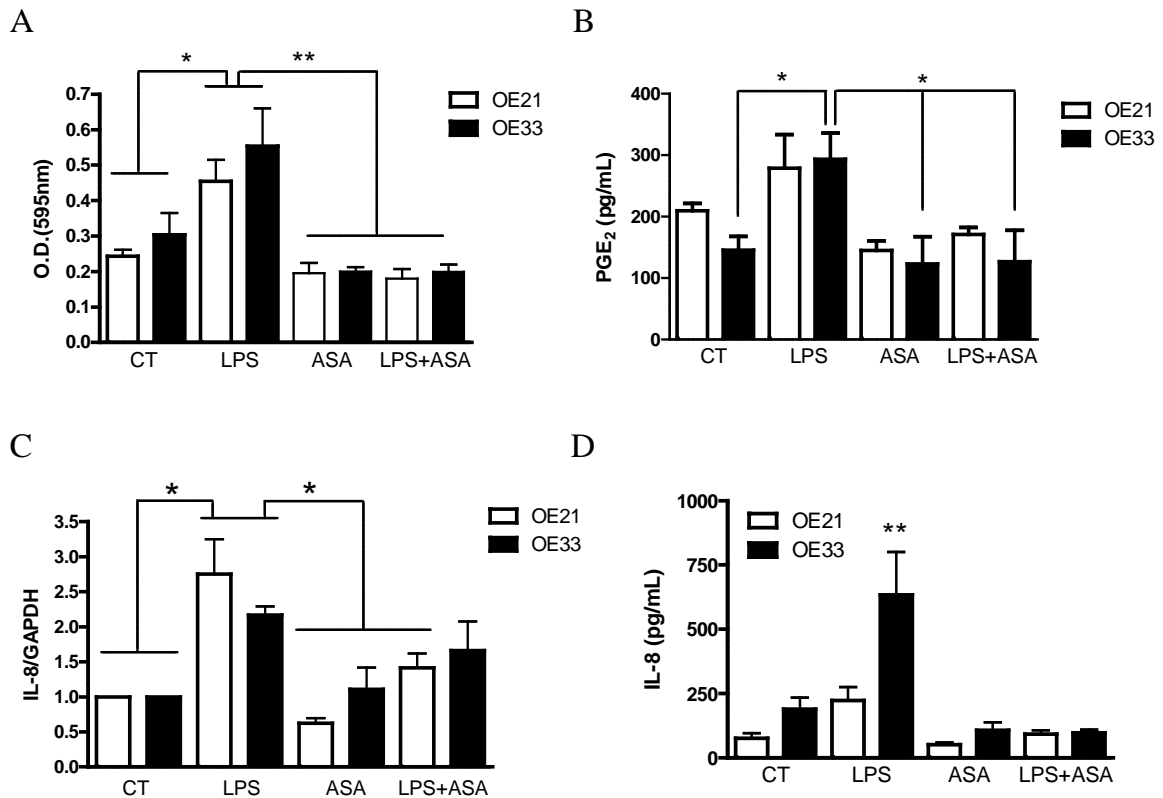


Figura 4.28. Avaliação da proliferação, produção de PGE₂, expressão e produção de IL-8, após ativação de TLR4 com LPS nas linhagens de câncer de esôfago. (A) As linhagens OE21 e OE33 foram cultivadas por 48h com ou sem adição de LPS (0,5µg/mL), ASA (500µg/mL) e LPS mais ASA. Ao final desse período, as células foram fixadas e então coradas com Cristal Violeta. A absorbância foi obtida a 595nm. (B e D) As linhagens OE21 e OE33 foram cultivadas por 72h com ou sem adição de LPS (0,5µg/mL), ASA (500µg/mL) e LPS mais ASA e, ao final desse período, o sobrenadante foi recolhido. (B) O sobrenadante foi utilizado para dosagem de PGE₂. (C) As linhagens OE21 e OE33 foram cultivadas por 48h com ou sem adição de LPS (0,5µg/mL), ASA (500µg/mL) e LPS mais ASA, ao final desse período as células foram colocadas em TRIZol, o RNA foi extraído e passou pela reação da transcriptase reversa. O cDNA sintetizado foi utilizado para realizar RT-PCRq para os genes *IL-8* e *GAPDH*. (D) O sobrenadante foi utilizado para dosagem de IL-8. Gráficos representam a média de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ANOVA

Uma vez que observamos que a ativação de TLR4 por LPS foi capaz de induzir um aumento no número de CL e que COX-2 parece estar envolvida nesse processo, partimos para avaliar como a ativação dessa via poderia estar ocorrendo. Um dos principais fatores de transcrição induzidos pela ativação de TLR4 é o NFκB, que por sua vez é capaz de ativar transcricionalmente diversos genes, incluindo *COX-2* (Baeuerle & Henkel, 1994; Abdel-Latif *et al.*, 2009). Com isso, fomos avaliar se LPS seria capaz de ativar NFκB nas linhagens celulares de câncer de esôfago.

Avaliamos a ativação de NFκB através da sua translocação nuclear, pela técnica de imunofluorescência. Como podemos ver na Figura 4.29, o tratamento das células com LPS foi capaz de levar à translocação nuclear da subunidade p65 de NFκB, na linhagem celular de ADE, OE33, enquanto que na linhagem celular de CEE, OE21, esse fenômeno foi observado de forma mais discreta.

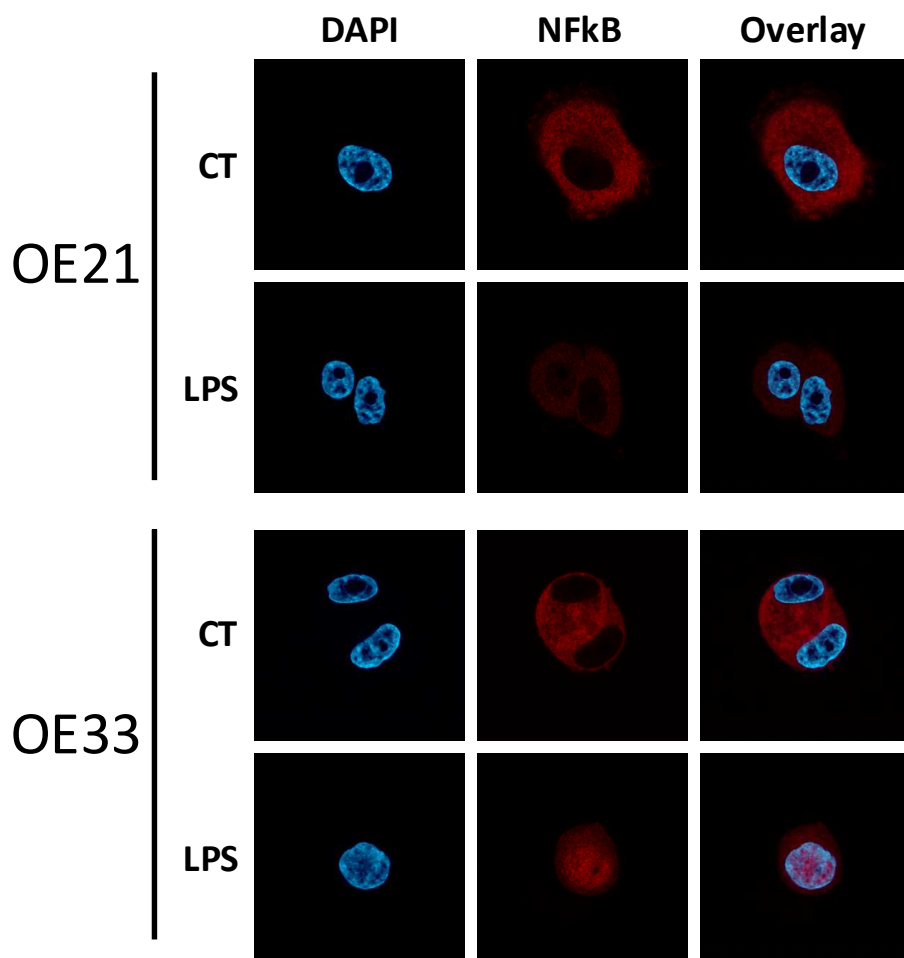


Figura 4.29. Avaliação da translocação nuclear de p65 após ativação com LPS nas linhagens celulares OE21 e OE33. As linhagens OE21 e OE33 foram cultivadas (2×10^4 células) em lâminas redondas forradas com gelatina com ou sem adição LPS por 45min. Após esse período as células foram fixadas e marcadas com anticorpo anti-p65 (Vermelho) e com o marcador nuclear DAPI (azul) e, então, avaliadas por microscopia confocal. Fotos representativas de 3 experimentos independentes.

Com intuito de melhor elucidar a importância do NFκB na formação de CL, fomas, então, avaliar a expressão proteica de p65 nas amostras humanas de CEE (25 amostras) e ADE (56 amostras), por imunohistoquímica. Como podemos ver na Figura 4.30A, C e D, a marcação de p65 foi predominantemente citoplasmática e, em alguns casos tanto de ADE quanto de CEE, nuclear. Além disso, houve marcação de células do infiltrado inflamatório nas amostras de ambos os tumores avaliados (Figura 4.30B e C). Na Figura 4.31, vemos a representação gráfica do percentual de células positivas para p65 multiplicada pela intensidade da marcação nos grupos de amostras avaliados. Podemos ver que não houve diferença de

marcação para p65 entre os grupos de ADE e CEE. Também, não houve diferença entre o percentual de células com marcação nuclear entre os dois tipos de câncer de esôfago.

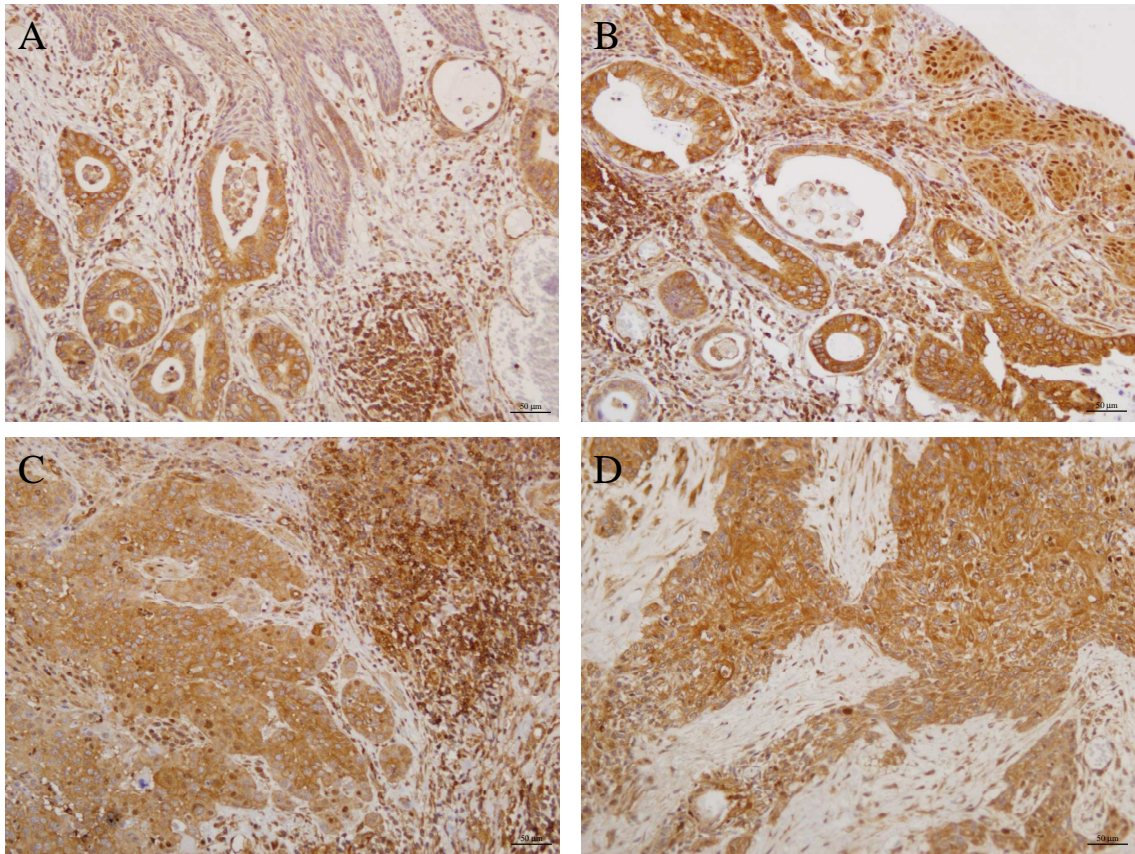


Figura 4.30. Fotos representativas da marcação de p65 por Imunohistoquímica em amostras humanas de esôfago. Vinte e cinco amostras de CEE e 56 amostras humanas de ADE, provenientes do INCA e UFRGS, foram selecionadas e realizada marcação por Imuno-histoquímica para p65. Fotos representativas em microscópio de campo claro (20x) de amostras com marcação para p65. (A) Foto representativa de amostra de ADE em área tumoral e inflamatória com forte marcação citoplasmática para p65. (B) Foto representativa de amostra de ADE com marcação nuclear para p65 em área tumoral. (C) Foto representativa de amostra de CEE em área tumoral e inflamatória com forte marcação citoplasmática e nuclear para p65. (D) Foto representativa de amostra de CEE em área tumoral marcada para p65 junto a área de estroma com marcação fraca. Régua representa 50µm.

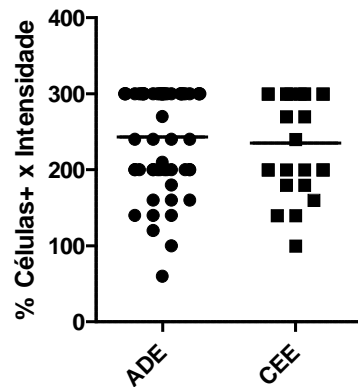


Figura 4.31. Representação gráfica do percentual de células marcadas vezes a intensidade de marcação para p65 nas amostras Adenocarcinoma de Esôfago e Carcinoma Epidermóide de Esôfago. Vinte e cinco amostras de CEE e 56 amostras humanas de ADE, provenientes do INCA e UFRGS, foram selecionadas e realizada marcação por Imuno-histoquímica para p65. Representação gráfica da avaliação do percentual de células positivas para p65 vezes o valor de intensidade para p65 nas amostras humanas. Todas as amostras foram avaliadas por um patologista.

Por último, realizamos marcação de TLR4 na amostras humanas de CEE e ADE por IHQ. Podemos ver na Figura 4.32 que a marcação de TLR4 foi tanto citoplasmática, quanto membranar. Em alguns casos também foi observado marcação nuclear para TLR4 (Figura 4.32). Foi avaliado o percentual de células tumorais marcadas positivamente para TLR4 e a intensidade da marcação. Obsevamos, no entanto que não houve diferença nem no percentual de células marcadas, nem na intensidade de marcação entre os grupos de amostras avaliados (Figura 4.33).

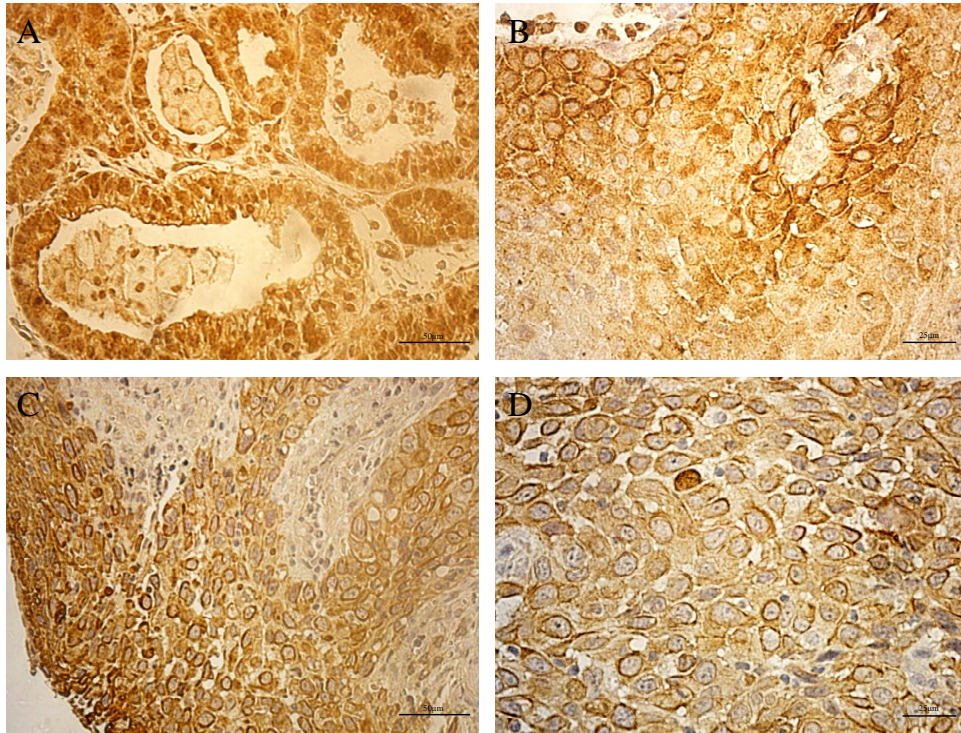


Figura 4.32. Fotos representativas da marcação de TLR4 por Imuno-histoquímica em amostras humanas de esôfago. Vinte e cinco amostras de CEE e 56 amostras humanas de ADE, provenientes do INCA e UFRGS, foram selecionadas e realizada marcação por Imuno-histoquímica, para TLR4. Fotos representativas em microscópio de campo claro de amostras com marcação para TLR4. (A) Foto representativa de amostra de ADE em área tumoral com forte marcação citoplasmática e nuclear (40x). (B) Foto representativa de amostra de ADE com marcação citoplasmática forte em área tumoral (60x). (C) Foto representativa de amostra de CEE em área tumoral com forte marcação citoplasmática junto a área de estroma com marcação fraca. (40x). (D) Foto representativa de amostra de CEE em área tumoral marcada (60x). (A e C) Régua representa 50µm. (B e D) Régua representa 25µm.

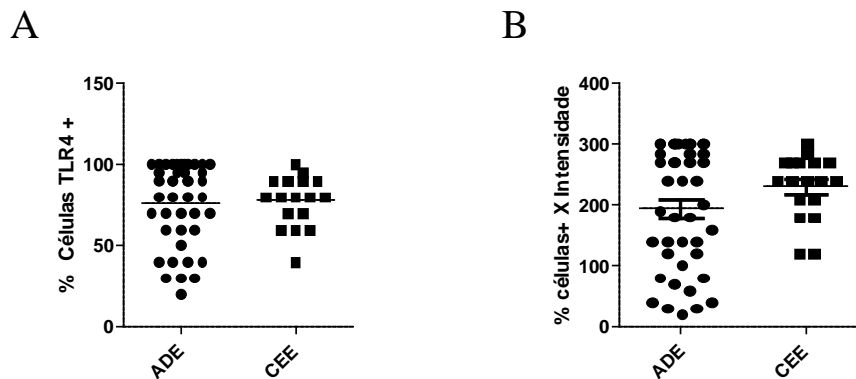


Figura 4.33. Representação gráfica da marcação para TLR4 nas amostras Adenocarcinoma de Esôfago e Carcinoma Epidermóide de Esôfago. Vinte e cinco amostras de CEE e 56 amostras humanas de ADE, provenientes do INCA e UFRGS, foram selecionadas e realizada marcação por Imuno-histoquímica para TLR4. (A) Representação gráfica da avaliação do percentual de células positivas para TLR4 nas amostras humanas de câncer de esôfago. (B) Representação gráfica da avaliação do percentual de células positivas para TLR4 vezes o valor de intensidade para TLR4 nas amostras humanas de câncer de esôfago. Todas as amostras foram avaliadas por duas patologistas

4.6 Avaliação do envolvimento dos fatores de risco associados ao ADE na ativação e modulação da expressão do receptor TLR4.

Uma vez que nossos resultados sugerem o envolvimento do TLR4 no aumento do número de CL no ADE, a etapa seguinte do trabalho foi avaliar se os estímulos simulando os fatores de risco associados ao desenvolvimento do ADE estariam induzindo a formação de CL através da ativação direta e/ou indução da expressão do receptor TLR4. Alguns trabalhos já descreveram que ácidos graxos (Lager *et al.*, 2012; Mutoh & Ueda, 2013; Hwang *et al.*, 2016), nicotina (Lin *et al.*, 2010) e ácidos biliares (Awla *et al.*, 2011) são capazes de ativar e/ou induzir a expressão do receptor TLR4 em diferentes tipos celulares. Para avaliar essa questão, utilizamos um inibidor de TLR4, o CLI095. Como podemos ver na Figura 4.33A, o LPS foi capaz de induzir o aumento de CL na linhagem celular OE33 e o inibidor de TLR4, CLI095, foi capaz de inibir esse aumento. Podemos ver, também, que o inibidor sozinho não alterou o número de CL nem a proliferação celular da linhagem OE33 (Figura 4.34A e B).

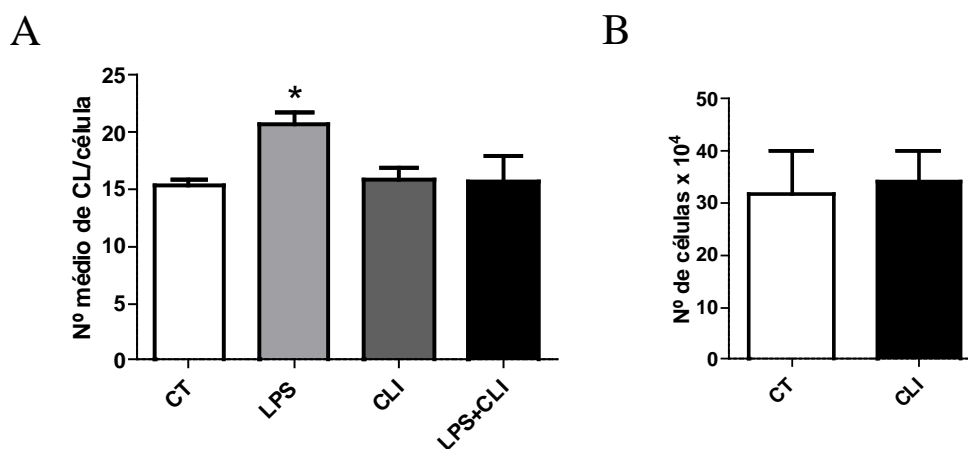


Figura 4.34. Avaliação da inibição da ativação de TLR4 com LPS na formação de CL pelo inibidor de TLR4, CLI095 na linhagem celular OE33. (A) A linhagem OE33 foi cultivada com ou sem adição de LPS (50µg/mL), CLI095 (2µg/mL) e LPS mais CLI095 por 24 horas. Após 24h as células foram fixadas e incubadas com Oil Red O e contra-coradas com DAPI e o número de CL foi determinado. Gráfico representa a média de quatro experimentos independentes (B) Gráfico representa a média de dois experimentos independentes de contagem do número de células após 24h de cultivo da linhagem OE33 com ou sem CLI095 (2µg/mL). * p<0,05 ANOVA

Seguimos para avaliar se o inibidor de TLR4, o CLI095, seria capaz de inibir a formação de CL induzida pelo AO, nicotina e DCA. Podemos ver na Figura 4.35A, que o AO foi capaz de induzir aumento na formação de CL na linhagem OE33, como já tinha sido

observado anteriormente. No entanto, o inibidor CLI095 não foi capaz de reverter esse aumento (Figura 4.35A). Conforme ilustrado na Figura 4.35B, o mesmo fenômeno foi observado após o tratamento das células OE33 com nicotina: houve um aumento no número de CL que não foi revertido pela administração do inibidor CLI095.

O estímulo com DCA não pode ser realizado na forma de pulsos, como anteriormente, devido a grande toxicidade observada, mas em uma incubação por 24h seguidas, o que não resultou em indução de CLs (Figura 4.36) (como observado quando o tratamento foi na forma de pulsos), impossibilitando a avaliação do inibidor de TLR4, o CLI095, na formação de CL induzida por DCA.

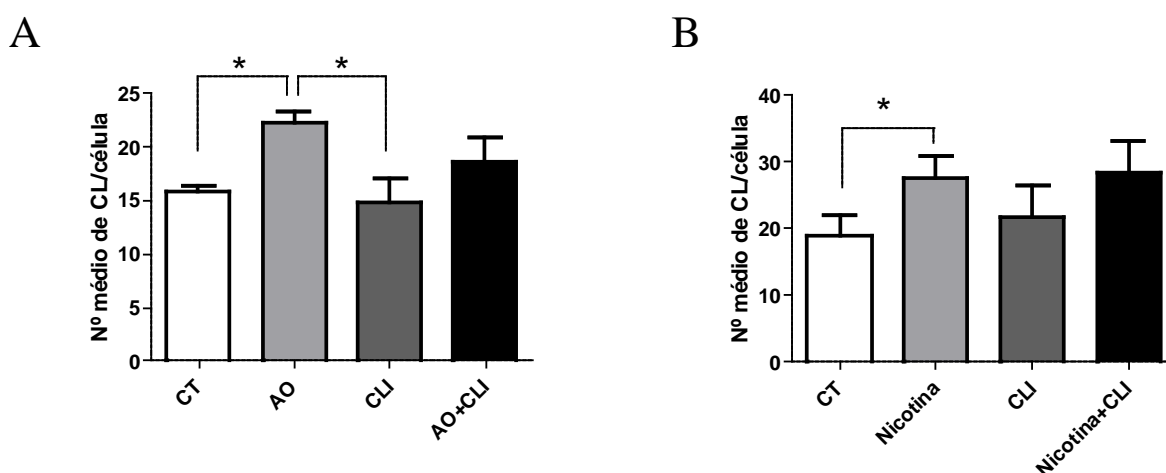


Figura 4.35. Avaliação do inibidor de TLR4, CLI095 na formação de CL, após ativação da linhagem celular OE33 com ácido oléico e nicotina. (A) A linhagem OE33 foi cultivada com ou sem adição de AO (5 μ M), CLI095 (2 μ g/mL) e AO mais CLI095 por 24 horas. (B) A linhagem OE33 foi cultivada com ou sem adição de Nicotina (200 μ g/mL), CLI095 (2 μ g/mL) e Nicotina mais CLI095 por 24 horas. (A e B) Após 24 horas, as células foram fixadas e incubadas com Oil Red O e contra-coradas com DAPI e o número de C.L. foi determinado. Gráficos representam a média de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ ANOVA

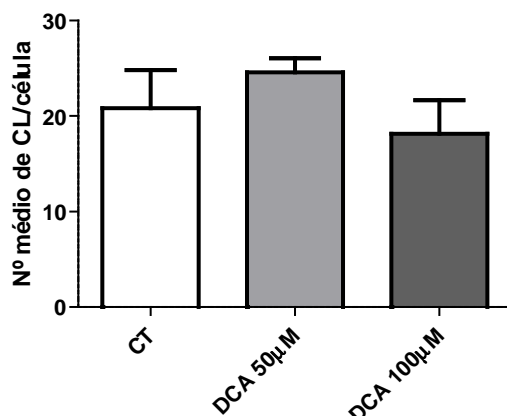


Figura 4.36. Avaliação do número de CL após estímulo com diferentes concentrações de DCA por 24h na linhagem OE33. A linhagem OE33 foi cultivada com ou sem adição de DCA (50 e 100µM) por 24 horas e, após esse período, foram fixadas e incubadas com Oil Red O e contra-coradas com DAPI e o número de CL foi determinado. Gráficos representam a média de três experimentos independentes.

Seguimos, então, para investigar se os estímulos simulando os fatores de risco associados ao desenvolvimento do ADE seriam capazes de induzir um aumento na expressão gênica de *TLR4*. Iniciamos nossa avaliação na linhagem celular Het1a incubada por 24h com AO, nicotina e DCA em pH ácido. Como podemos ver na Figura 4.37A, o AO não foi capaz de alterar a expressão de *TLR4* na linhagem Het1a quando comparado ao controle sem estímulo. Entretanto, a nicotina foi capaz de induzir um aumento na expressão de *TLR4*, quando comparado ao controle (Figura 4.37B), enquanto, que o DCA em meio com pH ácido levou a redução da expressão desse gene (Figura 4.37C), na linhagem celular Het1a.

Avaliamos, também, o papel desses estímulos na indução da expressão de *TLR4* nas linhagens celulares de CEE e ADE, OE21 e OE33. Observamos que não houve alteração na expressão de *TLR4*, em ambas as linhagens celulares avaliadas, quando comparamos as linhagens celulares tratadas com os estímulos às células controle não tratadas (Figura 4.38). Podemos observar, corroborando os resultados anteriores, que a linhagem celular OE33 expressa entre 5 a 10 vezes mais *TLR4*, do que a linhagem OE21 (Figura 4.38).

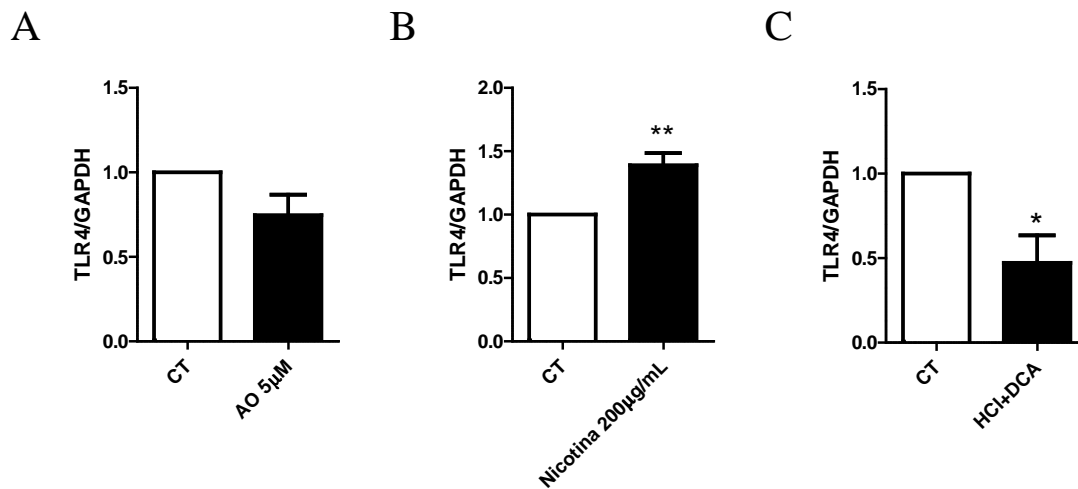


Figura 4.37. Avaliação da expressão de TLR4 após ativação da linhagem Het1a com ácido oléico, nicotina e DCA em meio ácido. (A) A linhagem Het1a foi incubada com AO (5µM) por 24h. Ao final da incubação as células foram colocadas em TRIZol, o RNA foi extraído e passou pela reação da transcriptase reversa. (B) A linhagem Het1a foi incubada com nicotina (200µg/mL) por 24h. Ao final da incubação as células foram colocadas em TRIZol, o RNA foi extraído e passou pela reação da transcriptase reversa. (C) A linhagem Het1a foi incubada com 3 pulsos de meio contendo DCA 200µM com pH 5.0. Após 24h, as células foram colocadas em TRIZol, o RNA foi extraído e passou pela reação da transcriptase reversa. (A, B e C) O cDNA sintetizado foi utilizado para realizar a RT-PCRq para os genes *TLR4* e *GAPDH*. Gráficos representam a média de três experimentos independentes. *p<0,05; **p<0,01 Teste T

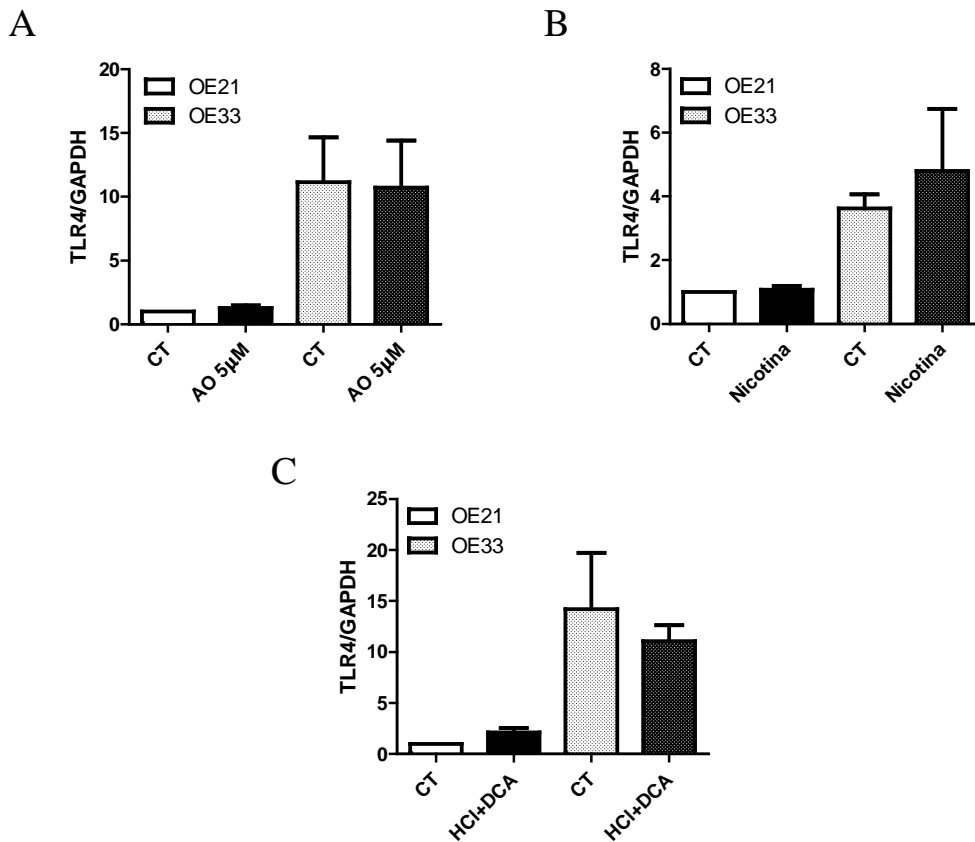


Figura 4.38. Avaliação da expressão de TLR4, após ativação das linhagens OE21 e OE33 com ácido oléico, nicotina e DCA em meio ácido. (A) As linhagens (OE21 e OE33) foram incubadas com AO (5µM) por 24h. Ao final da incubação as células foram colocadas em TRIZol, o RNA foi extraído e passou pela reação da transcriptase reversa. (B) As linhagens (OE21 e OE33) foram incubadas com nicotina (200µg/mL) por 48h. Ao final da incubação com nicotina as células foram colocadas em TRIZol, o RNA foi extraído e passou pela reação da transcriptase reversa. (C) As linhagens (OE21 e OE33) foram expostas a 3 pulsos de exposições com DCA à 200µM em meio com pH5.0 por 24h. Ao final da incubação com os respectivos agentes as células foram colocadas em TRIZol, o RNA foi extraído e passou pela reação da transcriptase reversa. (A, B e C) O cDNA sintetizado foi utilizado para realizar a RT-PCRq para os genes *TLR4* e *GAPDH*. Gráficos representam a média de três experimentos independentes.

5. Discussão

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar presença e participação dos CLs, cuja presença aumentada já foi descrita em uma variedade de tumores, nas diferentes etapas do desenvolvimento de ambos os tipos histopatológicos predominantes de CE para melhor entender seus mecanismos de carcinogênese (Straub *et al.*, 2010; Matsubara *et al.*, 2011; Boussahmain *et al.*, 2013; Fujimoto *et al.*, 2016; Accioly *et al.*, 2008).

Nesse sentido, a presença de CL foi avaliada em amostras humanas de esôfago de indivíduos saudáveis, de indivíduos obesos, de indivíduos com EB e pacientes com ADE, que representam o perfil de progressão para o desenvolvimento desse tumor, e em amostras de esôfago de pacientes com CEE. O perfil sócio-demográfico e clínico-patológico dos indivíduos selecionados para o trabalho se enquadra no que já é descrito para as doenças em questão. Os pacientes com ADE e CEE avaliados são predominantemente do sexo masculino, como esperado (Cook *et al.*, 2009; Rutegard *et al.*, 2010), e fumantes ou ex-fumantes nesses grupos, valendo ressaltar que o tabagismo é um fator de risco para ambos os tipos tumorais (Vizcaino *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2007; Whiteman *et al.*, 2008). Em relação ao consumo de bebidas alcoólicas, não houve diferença entre o percentual de pacientes que consomem bebidas alcoólicas entre os grupos de ADE e CEE, ambos os grupos apresentaram alto percentual de consumo, apesar deste hábito estar associado apenas ao desenvolvimento de CEE. Além disso, observamos que nos grupos de indivíduos com esôfago sem alterações e no grupo dos obesos há um alto percentual de indivíduos que consomem bebidas alcoólicas. Quanto à localização dos tumores, foi observada uma predominância dos casos de ADE no terço inferior do esôfago, conforme esperado, já que esse tumor tem como fator de risco o refluxo esôfago gástrico (Shaheen *et al.*, 2009; Sharma, 2009; Spechler *et al.*, 2010) e para os casos de CEE, houve uma predominância de tumores no terço médio do esôfago, corroborando achados de outros estudos (Vizcaino *et al.*, 2002; Kamangar *et al.*, 2009). Dentre os pacientes com EB, houve um baixo percentual de pacientes que relataram terem refluxo, no entanto, já se sabe que o refluxo, que é uma característica relatada pelo paciente, e pode ser assintomático em alguns casos (Rubenstein & Taylor, 2010).

Em relação ao modelo proposto nesse estudo para a avaliação da evolução do ADE, é importante citar que a maior parte dos trabalhos utiliza amostras de EB com diferentes graus

de displasia, para simular um quadro da evolução natural da doença. Infelizmente, no nosso grupo de amostras de EB, não contamos com amostras com diferentes graus de displasia. Entretanto, o nosso trabalho foi o primeiro a incluir amostras de esôfago de indivíduos obesos em análises de mecanismos envolvidos com a evolução do ADE, considerando essa condição como uma das etapas no desenvolvimento dessa neoplasia.

A análise da presença de CL ao longo da evolução do ADE e em CEE foi realizada através da marcação de ADRP, pela técnica de imunohistoquímica (IHQ). ADRP é uma proteína presente na membrana do CL e crucial para sua síntese, sendo, dessa forma, um marcador reconhecido e validado de acúmulo de lipídeos (Heid *et al.*, 1998; Londos *et al.*, 2005; Straub *et al.*, 2013). A marcação de lipídeos neutros em amostras humanas representa uma outra forma de avaliar a presença de CL, entretanto, não pode ser empregada em nosso estudo devido ao fato de nossas amostras terem sido selecionadas retrospectivamente e estarem embebidas em parafina. Isso ocorre devido ao fato de, durante o processo de fixação e impregnação da parafina, haver perda dos lipídeos nas amostras, o que impossibilita sua marcação. Corroborando a técnica utilizada em nosso estudo, diversos outros trabalhos também avaliaram a expressão de proteínas da família PAT, como a Perilipina 1, ADRP e TIP47, por IHQ (Straub *et al.*, 2010; Boussahmain *et al.*, 2013). Além disso, no trabalho realizado por Straub e colaboradores em 2010, foi avaliado, por IHQ, a presença das proteínas Perilipina1, ADRP e TIP47 em uma variedade de tipos tumorais e foi observado que a marcação para Perilipina1 era encontrada apenas em tumores sebáceos e em tumores mesenquimais com diferenciação adipogênica, já a marcação para TIP47 e ADRP pareceu estar presentes ao mesmo tempo em uma variedade de tipos tumorais. Vale ressaltar que nesse trabalho (Straub *et al.*, 2010) não foi avaliada a marcação para as proteínas da família PAT em câncer de esôfago. Vale lembrar que ADRP é uma proteína que se encontra associada à membrana dos CLs e, quando não ligada a essas organelas, essas proteínas são degradadas pela via do proteossomo (Xu *et al.*, 2005). Dessa forma, a marcação de ADRP pode inferir diretamente a presença de CL (Heid *et al.*, 1998; Londos *et al.*, 2005; Straub *et al.*, 2013).

O padrão de marcação para ADRP obtido nas nossas amostras de tecido esofágico foi similar ao observado no controle positivo (adenocarcinoma de cólon) e também em outros trabalhos onde foi realizada a marcação para ADRP por IHQ (Straub *et al.*, 2010; Matsubara *et al.*, 2011; Fujimoto *et al.*, 2016). As análises revelaram um aumento progressivo na

marcação de ADRP ao longo das etapas de desenvolvimento do ADE (não-obesos sem alteração no esôfago - obesos sem alteração no esôfago - EB - ADE), no entanto, nas amostras de CEE, essa marcação foi muito pouco encontrada. O aumento da presença de CL já foi demonstrado para outros tipos de tumores, quando comparado com tecido não tumoral, como: adenocarcinoma de colón, câncer de mama, câncer de fígado, linfoma de Burkitt, câncer cutâneo e em um percentual de câncer de pulmão (Accioly *et al.*, 2008; Ostler *et al.*, 2010; Straub *et al.*, 2010; Ambrosio *et al.*, 2012; Boussahmain *et al.*, 2013; Fujimoto *et al.*, 2016). No entanto, para o câncer de esôfago, esse fenômeno ainda não havia sido demonstrado.

Além disso, esse trabalho demonstra, pela primeira vez, uma alteração na presença de CL em tecido esofágico normal de indivíduos obesos, quando comparado ao tecido esofágico saudável de indivíduos não-obesos. Já foi demonstrado aumento no número de CLs em processo de obesidade, entretanto, apenas em tecidos envolvidos com metabolismo lipídico como o fígado e o tecido adiposo (Motomura *et al.*, 2006). A obesidade está associada ao desenvolvimento de diversos tipos de tumores (Calle & Kaaks, 2004; Khandekar *et al.*, 2011) e é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do ADE (Lagergren, 2011; Kant & Hull, 2011; Alemán *et al.*, 2014). Já é descrito, também, que dentre todos os tumores que apresentam a obesidade como fator de risco para o seu desenvolvimento, o ADE é o tumor que apresenta um dos maiores riscos relativos (Calle & Kaaks, 2004; Khandekar *et al.*, 2011). Dessa forma, a observação de um aumento na marcação para ADRP já no esôfago normal de indivíduos obesos é bastante interessante e representa uma conexão entre a obesidade e uma alteração celular no esôfago que poderia predispor essas células a outras alterações associadas ao desenvolvimento do ADE, já que, o aumento na marcação para ADRP é progressivo e ainda maior nas amostras de EB e ADE avaliadas. Considerando que o aumento na marcação para ADRP, e conseqüentemente a presença de CL, é observado já no esôfago normal de obesos, podemos sugerir que a alteração do número de CL ocorra já em estágios iniciais da evolução natural do ADE. Além disso, observamos uma associação positiva entre a marcação de ADRP e a presença de displasia na amostras de EB, corroborando ainda mais a hipótese de que o aumento observado na presença de CL ocorra nas fases iniciais do desenvolvimento do ADE.

Outro aspecto importante desse trabalho foi a diferença observada no número de CL entre os dois principais tipos histológicos de câncer de esôfago. Enquanto as amostras de ADE

apresentaram aumento na presença de CL em relação ao esôfago normal, as amostras de CEE não apresentaram. Além disso, a presença de CL foi maior em ADE do que em CEE. Em um trabalho onde foi avaliada a presença de CL, através da marcação para ADRP, em adenocarcinoma de pulmão e carcinoma escamoso de pulmão não foi observada diferença na marcação para ADRP entre os dois tipos histológicos deste tumor (Straub *et al.*, 2013), sugerindo, então, que a diferença na presença de CL observada entre ADE e CEE não deve estar associada à diferença histológica entre esses dois tipos de tumores de esôfago. A maior presença de CL observada nas amostras de pacientes com ADE do que em amostras de esôfago de indivíduos saudáveis e do que em pacientes com CEE foi corroborada pelos resultados da avaliação de quantidade de CL *in vitro*, feito em nosso estudo. A avaliação da presença de CLs em linhagens celulares de câncer de esôfago, realizada pela marcação de lipídeos neutros com ORO, revelou um maior número dessas organelas na linhagem celular de ADE (OE33), quando comparada à linhagem celular normal de esôfago (Het1a), e à linhagem celular de CEE (OE21). Juntos esses resultados indicam que há uma maior quantidade de CL em ADE, quando comparado ao CEE.

As alterações observadas na presença de CL não foram correlacionadas às taxas da proliferação celular, nem nas amostras de pacientes com ADE e CEE avaliadas, nem nas linhagens de células utilizadas em nosso estudo. Apesar de em outros trabalhos a associação entre a quantidade de CL e o ciclo celular já ter sido observada, tanto em linhagem celular de fibroblasto, onde foi observada uma alteração no número de CL nas diferentes fases do ciclo celular, e também em trabalho realizado com leveduras, onde foi visto uma diminuição do número de CL no final da fase G₁ do ciclo celular, devido a um aumento da lipólise (Kurat *et.at.*, 2009; Souza-Cruz, 2014), em nosso trabalho essa associação não foi observada. Um resultado interessante foi a maior taxa de proliferação celular observada nas amostras de ADE, em comparação com as amostras de CEE. Não há relatos na literatura dessa diferença.

Conforme discutido anteriormente, a diferença quantitativa observada na presença de CL entre ADE e CEE, provavelmente não pode ser explicada pela diferença histológica entre esses dois tipos de câncer de esôfago. Além disso, como essas alterações na presença de CL são detectadas desde estágios iniciais do desenvolvimento do ADE, nós hipotetizamos que as diferenças observadas poderiam estar associadas à exposição do tecido esofágico aos diferentes fatores de risco associados ao ADE.

As análises de associação realizadas entre a marcação para ADRP nas amostras humanas de esôfago avaliadas e a exposição dos pacientes aos fatores de risco tabagismo e etilismo não revelaram nenhuma associação estatisticamente significativa. De forma semelhante, também não houve associação significativa entre a marcação para ADRP e histórico de refluxo nos pacientes com EB (dados não mostrados). Infelizmente não foi possível obter informações a respeito da exposição a outros fatores de risco de interesse para todos os grupos de amostra analisados, como obesidade e histórico de refluxo, e, sendo assim, as análises de associação dessas características com a marcação para ADRP não puderam ser realizadas. A falta de associação entre a marcação para ADRP e os dados clínico-patológicos dos pacientes incluídos no nosso estudo pode ser explicada, pelo menos parcialmente, pela falta de informação acerca dos dados clínico-patológicos dos pacientes e, também, pelo pequeno número de amostras analisadas.

Entretanto, os resultados obtidos com nosso modelo *in vitro* para a simulação da exposição do epitélio esofágico saudável aos fatores de risco associados ao desenvolvimento do ADE corroboraram a nossa hipótese. Simulando o fator de risco obesidade, a linhagem celular de esôfago normal, Het1a, foi incubada com ácido oléico (AO) ou leptina. O AO foi capaz de induzir um aumento no número de CL nas células Het1a, de forma dose dependente, entretanto, a leptina não foi. O AO é um ácido graxo livre mono-insaturado, naturalmente encontrado na nossa alimentação, e representa o mais abundante ácido graxo livre presente na dieta, no sangue e no tecido adiposo amarelo (Kien, 2009). Além disso, já foi descrito um aumento nos níveis de AO no sangue de indivíduos obesos (Zhao *et al.*, 2016). A leptina é um hormônio liberado pelo tecido adiposo, em quantidades diretamente proporcionais à sua presença no corpo do indivíduo, e também tem seus níveis aumentados no plasma de indivíduos obesos (Yildiz *et al.*, 2004).

Já é sabido que ácidos graxos insaturados são potentes indutores de CL e que o AO é capaz de induzir aumento no número de CL em diversos tipos celulares, como macrófagos, leucócitos e células epiteliais (Weller *et al.*, 1991; Moreira *et al.*, 2009). Além de induzir aumento no número de CL, o AO é capaz de induzir a expressão de ADRP em adipócitos e já é descrito que esse aumento na expressão de ADRP está diretamente relacionado ao aumento da capacidade de armazenar lipídeos neutros (Larigauderie *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2011). Logo, os resultados obtidos com aumento do número de CL após estímulo com AO na

linhagem celular Het1a corroboram aqueles observados para outros tipos celulares. Vale destacar, no entanto, que a concentração de AO utilizada para induzir aumento no número de CL na linhagem de células epiteliais no trabalho citado acima foi seis vezes maior que a utilizada para estimular a linhagem celular Het1a, sugerindo uma maior sensibilidade da linhagem celular de esôfago normal ao AO (Moreira *et al.*, 2009).

Embora em nosso modelo a leptina não tenha sido capaz de induzir um aumento no número de CL nas células Het1a, já é descrito que a leptina é capaz de induzir aumento do número CL e aumento da expressão de ADRP em macrófagos (Maya-Monteiro *et al.*, 2008). Além disso, já foi observado um aumento nos níveis de leptina no sangue de pacientes com ADE e aumento na expressão do receptor de leptina já em casos de EB (Kendal *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2010; Duggan *et al.*, 2013; Mokrowiecka *et al.*, 2013). Logo, a leptina parece ser capaz de induzir aumento no número de CL e parece exercer um papel importante na carcinogênese do ADE. A não indução do número de CL após a incubação com leptina observada em nosso modelo pode ser explicada pelo fato dos receptores de leptina apresentarem níveis de expressão de RNAm muito baixos na linhagem Het1a (resultados não mostrados).

A simulação de alguns dos fatores presentes no refluxo gastro-esofágico no nosso modelo *in vitro*, realizada através da administração de pulsos do ácido biliar DCA e/ou pH ácido (pH 5,0) na linhagem celular Het1a, resultou no aumento do número de CL, tanto com os estímulos dados isoladamente quanto de forma combinada. O modelo de pulsos utilizado se baseou em uma revisão sistemática onde foi avaliado o efeito do refluxo simulado *in vitro* em diversas linhagens celulares, inclusive a Het1a, e concluiu que a utilização do DCA e do meio com pH 5,0, em esquema de pulsos curtos, apresentava a maior semelhança em relação as alterações celulares e moleculares, quando comparado ao que ocorria *in vivo* (Bus *et al.*, 2012). O DCA pareceu ser mais eficiente em induzir a formação de CL na linhagem Het1a do que o meio com pH ácido, já que, com menor número de pulsos de incubação, o DCA foi capaz de levar à formação de um número maior de CL, em relação ao controle. Em trabalho com modelo murino de refluxo, foi demonstrado que os ácidos biliares, e não o suco gástrico ácido, eram suficientes para induzir esofagite e metaplasia intestinal (Sun *et al.*, 2015). No entanto, já se sabe que a combinação da acidez do suco gástrico com os ácidos biliares no refluxo tem um potencial muito maior de induzir o desenvolvimento do EB e ADE (Wild &

Hardie, 2003; Barbera & Fitzgerald, 2009; Falk, 2009). Nossos resultados combinando os dois estímulos vão de encontro ao reportado nesse trabalho, uma vez que, potencializou o aumento no número de CL, quando comparado ao efeito dos estímulos isoladamente, sugerindo que a combinação desses estímulos parece exercer um papel mais pronunciado nas alterações celulares do epitélio esofágico.

Embora o tabagismo não apresente um alto risco relativo para o desenvolvimento do ADE (Anderson *et al.*, 2007; Whiteman *et al.*, 2008), esse fator de risco também foi avaliado no nosso modelo *in vitro* de exposição do epitélio esofágico saudável aos fatores de risco associados ao ADE. De forma interessante, a incubação da linhagem celular Het1a com nicotina, um dos principais componentes do tabaco, induziu um aumento no número de CL. Esse resultado além de interessante é inédito, uma vez que, nenhum outro trabalho, até então, demonstrou que a nicotina, ou qualquer nitrosamina derivada do tabaco, é capaz de induzir aumento no número de CL em linhagens celulares.

Além de induzir um aumento no número de CL, o AO, o DCA e/ou meio ácido e a nicotina foram capazes, também, de alterar as taxas de proliferação e/ou o perfil do ciclo celular. Mais especificamente, o AO induziu um leve aumento da proliferação, entretanto, não alterou o perfil do ciclo celular da linhagem Het1. Embora sejam poucos os trabalhos que avaliam o papel do AO na regulação da proliferação celular, já foi descrito que ele atuaria como um fator protetor, diminuindo o crescimento celular e a migração de linhagens celulares de ADE (Moon *et al.*, 2014), ao contrário do que observamos. No entanto, a dose utilizada nesse estudo foi cem vezes maior do que a do nosso modelo. De forma semelhante ao observado após o tratamento com AO, os estímulos com DCA e/ou pH ácido foram capazes de aumentar as taxas de proliferação das células Het1a. O papel dos ácidos biliares e pH ácido na proliferação e ciclo celular já foi investigado e não há consenso em relação a resposta, que parece depender do tempo de exposição e concentração de DCA utilizada (Jiang *et al.*, 2006; Looby *et al.*, 2009; Burnat *et al.*, 2010). Além disso, os estudos investigaram mais profundamente o perfil do ciclo celular do que a proliferação isoladamente e, por limitações metodológicas, não conseguimos valer o perfil do ciclo celular da linhagem Het1a após o nosso modelo de pulsos simulando o refluxo gastro-esofágico. Por fim, a nicotina não foi capaz de alterar as taxas de proliferação das células Het1a, mas induziu um aumento de células na fase S do ciclo celular. Esse resultado é corroborado por outros trabalhos que

reportaram aumento na proliferação e na entrada de células na fase S do ciclo celular, através da ativação de ciclina D1, em linhagens celulares de mama e pulmão tratadas com nicotina (Guo *et al.*, 2008; Schaal & Chellappan, 2014).

Por fim, observamos que os fatores de risco associados ao desenvolvimento do ADE avaliados - AO, DCA e meio com pH ácido e nicotina – foram capazes, também, de modular a expressão de genes associados ao desenvolvimento do ADE na linhagem celular Het1a. Os resultados do nosso modelo *in vitro* revelaram que tanto o AO como a combinação de DCA e meio com pH ácido foram capazes de induzir um aumento significativo na expressão de *CDX2*, *COX-2* e *IL-8* na linhagem celular Het1a. Além do aumento na expressão desses genes, esses fatores de risco também induziram um aumento significativo na produção de PGE_2 e *IL-8* na linhagem celular de esôfago normal, sugerindo que não só houve um aumento na expressão, como, também, na ativação dos genes *COX-2* e *IL-8*, respectivamente.

Como já mencionado, *CDX2* é um fator de transcrição que dirige e mantém a diferenciação de células intestinais e não é expresso no epitélio escamoso esofágico normal, no entanto, sua expressão é aumentada em metaplasias intestinais, como o EB. Ou seja, o gene *CDX2* é um dos primeiros genes alterados na evolução para o ADE, pois sua expressão já se encontra aumentada em amostras de EB sem displasia (Souza *et al.*, 2008; Delinger & Thompson, 2012). Além disso, já foi demonstrado que a expressão ectópica de *CDX2* no esôfago de camundongos é suficiente para que sejam observadas alterações associadas ao fenótipo intestinal no epitélio escamoso esofágico (Kong *et al.*, 2011). A indução da expressão de *CDX2* pelos ácidos biliares e meio com pH ácido em células esofágicas, já foi bem estabelecida em diversos modelos de refluxo, tanto em murinos como em modelos *in vitro* com linhagens celulares de epitélio esofágico (Marchetti *et al.*, 2003; Kazumori *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2007; Avissar *et al.*, 2009). No entanto, a indução de aumento na expressão de *CDX2* por AO nunca havia sido demonstrada em nenhum tipo celular. Esse resultado demonstra uma possível alteração molecular induzida por fatores associados à obesidade, que levariam ao desenvolvimento de um fenótipo pré-neoplásico e intestinal, o EB.

O processo inflamatório possui um papel importante e já bem estabelecido para a carcinogênese esofágica (Anderson *et al.*, 2006; Abel-Latif *et al.*, 2009; Rousseau *et al.*, 2013; Abdel-Latif *et al.*, 2016). *COX-2* é a enzima chave na biossíntese de prostaglandinas, como a PGE_2 , que atuam como mediadores centrais da inflamação. O aumento da expressão de *COX-*

2 na carcinogênese esofágica já está bem estabelecido, tanto para ADE quanto para CEE (Morris *et al.*, 2001; Bhandari *et al.*, 2006; Mehta *et al.*, 2006). Além disso, em modelo *in vitro* utilizando células epiteliais esofágicas, foi demonstrado que a exposição aos ácidos biliares resultou em aumento da expressão de *COX-2* (Shirvani *et al.*, 2000; Looby *et al.*, 2009). Juntos, esses dados corroboram nossos resultados de aumento da expressão de *COX-2*, e consequente produção de PGE_2 , após a incubação das células Het1a com AO e DCA em combinação com meio com pH ácido. IL-8 é uma citocina pró-inflamatória capaz de induzir angiogênese, proliferação e migração de células tumorais e, também, levar à infiltração de neutrófilos na área tumoral (Waugh & Wilson, 2008). Em câncer de esôfago, já foi observado níveis elevados de IL-8, e outras citosinas pró-inflamatórias, no soro de paciente com EB e ADE (O’Riordan *et al.*, 2005; Verbeke *et al.*, 2012). Além disso, diversos modelos *in vitro* com linhagens celulares de epitélio escamoso normal demonstraram que o ácido biliar DCA era capaz de induzir aumento na expressão de *IL-8* (Jenkins *et al.*, 2004; McQuaid *et al.*, 2011; Huo *et al.*, 2014), corroborando nossos resultados. Poucos trabalhos avaliaram a indução da expressão de *IL-8* em linhagens celulares, após tratamento com AO. Em um modelo *in vitro* de esteatose hepática, foi visto que o AO na concentração de 40 μ M era capaz de induzir tanto aumento no número de CL como aumento na produção de IL-8 (Zhang *et al.*, 2015), indo de encontro aos resultados obtidos em nosso estudo. Juntos, os resultados obtidos com o aumento da expressão e/ou ativação de *CDX2*, *COX-2* e *IL-8* na linhagem celular Het1a estimulada com AO e DCA em combinação com meio com pH ácido dão suporte para nosso modelo *in vitro*.

O outro fator de risco associado ao desenvolvimento do ADE avaliado, a nicotina, não foi capaz de alterar a expressão de *CDX2* nem a expressão e produção de IL-8. O tratamento de nicotina induziu um aumento na expressão gênica de *COX-2*, mas que não se traduziu em aumento dos níveis de PGE_2 nas células Het1a. Já é sabido que a nicotina não é um fator de risco tão importante para o desenvolvimento do ADE, como é para o do CEE (Castellsangue *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2007; Whiteman *et al.*, 2008; Kamangar *et al.*, 2009). Além disso, já é bem estabelecido que a nicotina não atua como um indutor, mas sim como um promotor tumoral (Russo *et al.*, 2012; Ambrosio e Becchetti, 2013; Schaal & Chellappan, 2014; Sanner & Grimsrud, 2015; Zhao, 2016) o que pode explicar o fato desse composto não ser capaz de induzir uma alteração molecular associada aos estágios iniciais do

desenvolvimento de um tumor, como é o caso da indução da expressão do gene *CDX2*. Em relação à expressão de *COX-2*, foi detectado um aumento nos seus níveis de RNAm após o tratamento das células com nicotina, no entanto, não observamos alteração na produção de *PGE₂*. Já foi descrito que a nicotina é capaz de induzir a expressão de *COX-2* em linhagens celulares gástricas e também a ativação de *NFκB*, fator de transcrição capaz de transativar a expressão de *COX-2*, em células esofágicas (Arredondo *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2014). Logo, o aumento da expressão de *COX-2* induzido pela nicotina na linhagem Het1a embasa nosso modelo *in vitro*. Por fim, a nicotina não foi capaz de alterar a expressão nem a produção de *IL-8* na linhagem celular Het1a, sugerindo, mais uma vez, que esse fator de risco não desempenha um papel muito importante para o desenvolvimento do ADE.

Juntos, esses resultados demonstram que os fatores de risco associados ao desenvolvimento do ADE avaliados são capazes de induzir um aumento no número de CL em linhagem celular normal de esôfago, com exceção da leptina, corroborando a nossa hipótese inicial de que o aumento do número de CL observado na evolução do ADE nas amostras humanas de tecido esofágico poderia ser explicado pela exposição do epitélio esofágico normal aos fatores de risco associados ao ADE. E ainda, explica a razão pela qual esse aumento não é observado nas amostras humanas e linhagem celular de CEE, já que os fatores de risco associados ao desenvolvimento desse tipo de câncer de esôfago são diferentes. Além disso, os resultados obtidos com a avaliação da proliferação e ciclo celular e da expressão dos genes associados ao desenvolvimento do ADE após a exposição das células de esôfago normal aos fatores de risco associados ao desenvolvimento do ADE avaliados embasam nosso modelo *in vitro* e confirmam a associação entre esses estímulos (obesidade e refluxo) e a indução de um ambiente pró-inflamatório (*COX-2*, *PGE₂* e *IL-8*), o que poderia favorecer a formação de CL observada nas amostras humanas de esôfago avaliadas e também nas linhagens celulares de ADE. No entanto, a nicotina não parece ser capaz de alterar a expressão de todos os genes avaliados, apesar de induzir aumento de CL na linhagem celular Het1a. Esses resultados talvez possam ser explicados devido ao fato do consumo de tabaco não apresentar um risco muito alto para o desenvolvimento do ADE, e, dessa forma, talvez não estar envolvido nas etapas iniciais de desenvolvimento desse tumor.

A hipótese levantada em nosso estudo de que o aumento do número de CL observado na evolução do ADE é devido à exposição do epitélio esofágico normal aos fatores de risco

associados ao ADE e, por conseguinte, um evento específico da gênese e/ou progressão deste tipo histológico de câncer de esôfago, foi também corroborada pela avaliação do número de CL em linhagens celulares de ADE e CEE expostas ao AO, DCA e/ou meio com pH ácido e nicotina. Nossos resultados mostraram que somente a linhagem celular de ADE (OE33) apresentou aumento no número de CL após incubação com os estímulos citados acima. Além disso, foi observado que o tratamento com AO induziu aumento da expressão gênica de *COX-2* e *IL-8* somente na linhagem celular de ADE. Entretanto, a expressão gênica de *CDX2* não teve sua expressão alterada de forma significativa nem na linhagem celular de ADE, nem na de CEE pela incubação com AO. A exposição das linhagens OE21 e OE33 à combinação de DCA com meio com pH ácido, assim como à nicotina, não alterou a expressão desses genes. Além disto, o gene *CDX2* não teve sua expressão alterada de forma significativa por nenhum dos estímulos utilizados na linhagem celular OE33. Uma possível explicação para esse resultado é o fato de os níveis de expressão de *CDX2* na linhagem celular OE33 já serem relativamente altos. Dessa forma, os estímulos utilizados podem não ter sido capazes de induzir um aumento ainda maior. Além disso, *CDX2* é um dos primeiros genes a serem alterados na evolução do ADE e alguns trabalhos já relataram que *CDX2* parece não ter um papel importante na célula que já tenha adquirido seu fenótipo maligno (Vaninette *et al.*, 2009; Hayes *et al.*, 2011;). Em alguns trabalhos foi demonstrada, inclusive, uma redução na expressão de *CDX2* em amostras de ADE, quando comparadas às amostras de EB (Hayes *et al.*, 2010).

Levando em consideração que o processo inflamatório está envolvido no desenvolvimento tanto do ADE quanto do CEE e que os CLs são caracteristicamente mais abundantes em células associadas a reações inflamatórias e representam organelas envolvidas na produção de mediadores inflamatórios, a diferença na presença de CL observada entre ADE e CEE foi surpreendente (Bozza *et al.*, 1996; Pacheco *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2006; Bozza *et al.*, 2009; Abel-Latif *et al.*, 2009; Rousseau *et al.*, 2013; Abdel-Latif *et al.*, 2016). Uma possível explicação para tal fato poderia ser uma diferença entre as vias inflamatórias envolvidas no desenvolvimento de cada um dos tipos histológicos de câncer de esôfago.

Em nosso estudo foi investigada a expressão proteica de COX-2 em esôfago de indivíduos não-obesos, de indivíduos obesos, pacientes com EB, ADE e CEE. Observamos uma marcação fraca no epitélio escamoso esofágico de indivíduos não-obesos e de obesos.

Além disso, não detectamos diferenças nem na intensidade de marcação nem no percentual de células marcadas para COX-2 entre as amostras de ADE e CEE e também entre as amostras de EB e ADE. A proteína COX-2 está alterada tanto em ADE quanto em CEE (Shamma *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2007). Entretanto nenhum trabalho, até então, havia comparado a expressão de COX-2 entre amostras de ADE e CEE. Porém, vários trabalhos já haviam avaliado a expressão de COX-2 na seqüência de desenvolvimento do ADE (normal-EB-ADE), com resultados controversos. Enquanto alguns trabalhos não observaram diferença na marcação para COX-2 entre os grupos de EB e ADE (Lagorce *et al.*, 2003; Villanacci *et al.*, 2007; Abdalla *et al.*, 2007), outros demonstram esse aumento (Shirvani *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 2001; Ling *et al.*, 2007). Independente se ocorre ou não esse aumento na seqüência de desenvolvimento do ADE, o que é um consenso nos dados da literatura e nos nossos resultados, é que o aumento na expressão de COX-2 já ocorre nos estágios iniciais do desenvolvimento do ADE, assim como ocorreu para ADRP.

Apesar de não ter sido observado uma diferença na marcação de COX-2 entre os grupos de ADE e CEE, vimos uma correlação positiva entre a marcação para ADRP e a marcação para COX-2 somente nas amostras de ADE. Além disso, a marcação para COX-2 em ADE e CEE foi encontrada majoritariamente no citoplasma, refletindo os resultados de outros trabalhos, mas também perinuclear, que é pouco descrito em outros trabalhos em câncer de esôfago (Lagorce *et al.*, 2003; Bandhari *et al.*, 2006; Takatori *et al.*, 2007; Villanacci *et al.*, 2007; Akutsu *et al.*, 2011; Yoon *et al.*, 2011). Essa marcação perinuclear foi encontrada com maior freqüência nas amostras de CEE do que nas de ADE. Sabendo que em outros tipos celulares, como linhagens de câncer de cólon e de câncer de mama, a enzima COX-2 e seu produto, a PGE₂, foram encontrados co-localizando com os CLs (Accioly *et al.*, 2008; Goswami & Walia, 2016), a correlação positiva detectada entre a marcação de ADRP e de COX-2 nas amostras de ADE, e sua localização subcelular, nos permite sugerir que COX-2 poderia estar localizada dentro dos CLs nas amostras de ADE, enquanto que, nas amostras de CEE a enzima COX-2 estaria localizada no citoplasma ou região perinuclear.

Diferente do que foi encontrado na análise de expressão proteica de COX-2 nas amostras de ADE e CEE, a avaliação da expressão gênica de COX-2 e produção de PGE₂ nas linhagens celulares demonstrou que as células OE33 (de ADE) expressam mais COX-2 e produzem mais PGE₂ do que as linhagens celulares OE21 (de CEE) e Het1a (de epitélio

esofágico normal). Considerando essas informações, apesar de não termos observado diferenças quantitativas na expressão de COX-2 entre as amostras de ADE e CEE, podemos sugerir que há uma diferença nessa via inflamatória entre os dois subtipos histopatológicos de câncer de esôfago no que diz respeito a sua ativação e consequente função.

Tendo observado os resultados obtidos com COX-2 nas amostras humanas de ADE e CEE e com intuito de avaliar melhor a diferença entre os processos inflamatórios que participam do desenvolvimento dessas neoplasias de esôfago, e que poderiam estar envolvidos na formação dos CL, seguimos para análise da expressão dos receptores TLR. Esses receptores já vem sendo estudado no contexto de câncer há bastante tempo. O aumento na expressão de vários membros dessa família de receptores já foi descrito em diversos tipos de câncer, inclusive em CE (Dajon *et al.*, 2016; Huhta *et al.*, 2016). A ativação desses receptores leva à ativação de NFκB e consequente transativação de genes que desempenham papéis importantes no processo inflamatório e carcinogênico, como *COX-2* e *IL-8* (O'Neill & Bowie, 2007; Abdel-Latif *et al.*, 2009). No nosso estudo, selecionamos para avaliação os membros da família TLR que conhecidamente induzem a formação de CL, quando ativados (Pacheco *et al.*, 2002; D'Avila *et al.*, 2006; D'Avila *et al.*, 2008).

Nas nossas análises de expressão gênica nas linhagens celulares observamos uma maior expressão de *TLR4* em ADE, quando comparado ao CEE. Nenhum trabalho na literatura comparou a expressão de membros da família TLR entre as amostras de ADE e CEE, no entanto, diversos trabalhos avaliaram a expressão proteica desses receptores, comparando tecido normal com tumoral de CEE e ADE. Já foi descrito aumento dos TLR3, 4 e 7 em amostras de CEE, comparadas ao tecido normal (Sheyhidin *et al.*, 2011; Kauppila & Selander, 2014). Já em amostras de ADE, foi demonstrado aumento da expressão gênica e proteica de TLR4 e TLR5, quando comparado ao epitélio normal (Verbeeck *et al.*, 2013; Helminen *et al.*, 2014; Huhta *et al.*, 2016). Logo, a expressão aumentada de alguns membros da família de TLRs parece ter papel importante nas neoplasias de esôfago.

Apesar de não termos observado diferença na expressão proteica de TLR4 entre as amostras de pacientes com ADE e CEE avaliadas, a expressão aumentada e a diferença na resposta após ativação de TLR4 em ADE, quando comparada ao CEE, foi observada nas linhagens celulares (Verbeeck *et al.*, 2013; Huhta *et al.*, 2016). Além disso, as amostras de ADE e CEE atreladas no trabalho são de tumores em estágio avançado, momento em que a

expressão desse receptor provavelmente já se encontra alterada em ambos os tipos de CE. Ademais, apesar de a expressão proteica de TLR4 nas amostras de ADE não ter sido detectada aumentada em relação à expressão observada nas amostras de pacientes com CEE, nossos resultados confirmaram que TLR4 está superexpresso nas amostras de pacientes com ADE, quando comparado a sua expressão no tecido esofágico saudável. E o mesmo foi observado nas amostras de CEE avaliadas (dados não mostrados). Esses resultados são corroborados por outros estudos que já haviam reportado a superexpressão desses receptores em CE (Sheyhidin *et al.*, 2011; Verbeeck *et al.*, 2013; Kauppila & Selander, 2014; Helminen *et al.*, 2014; Huhta *et al.*, 2016).

Apesar da proteína TLR4 ter sido detectada superexpressa tanto em ADE quanto em CEE, nossos dados mostraram que a ativação de TLR4 com LPS foi capaz de induzir aumento significativo do número de CL na linhagem celular de ADE, mas não na linhagem celular de CEE. E ainda, a ASA foi capaz de reverter esse aumento, sugerindo que COX-2 está, possivelmente, participando desse processo. A avaliação de outros parâmetros já descritos induzidos pela ativação de TLR4, como proliferação celular, expressão e produção de IL-8 e expressão de COX-2 e produção de PGE₂ (Wang & Dubois, 2006 ; Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2009; Abdel-Latif *et al.*, 2009; Verbeek *et al.*, 2013), foi realizada e revelou que a ativação desse receptor por LPS resultou em igual aumento da proliferação nas linhagens celulares de ADE e CEE, demonstrando que apesar de não induzir aumento do número de CL, o TLR4 presente na linhagem celular OE21 é funcional. Entretanto, a ativação de TLR4 levou a aumento significativo da produção de IL-8 e PGE₂ somente na linhagem celular de ADE e, novamente, a ASA foi capaz de reverter esse aumento. Esses resultados demonstram que além do receptor TLR4 se apresentar superexpresso em ADE, as vias abaixo a ele estão ativadas nesse tumor, o que não é observado em CEE.

Um dos principais fatores de transcrição induzidos pela ativação de TLR4 é o NFκB, que tem como genes alvos, entre outros, COX-2 e IL-8 (Lu *et al.*, 2008; Abdel-Latif *et al.*, 2009; Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2009; Verbeek *et al.*, 2013). O incremento da ativação NFκB já foi reportada em CEE, ADE e EB, quando comparado ao tecido esofágico normal (Konturek *et al.*, 2004; Izzo *et al.*, 2006; Hatata *et al.*, 2012; Abdel-Latif *et al.*, 2015; McAdam *et al.*, 2015), demonstrando que a ativação desse fator de transcrição participa de eventos envolvidos na carcinogênese esofágica. No entanto, nenhum trabalho havia

comparado a presença e translocação de p65, indicativo da ativação de NFkB, entre amostras de ADE e CEE. Em nosso trabalho, foi observada a translocação nuclear de p65 após ativação de TLR4 com LPS de forma muito mais expressiva na linhagem celular de ADE do que na linhagem celular de CEE, demonstrando, juntamente com os outros resultados, que a via TLR4-NFkB-COX-2/IL-8 está diferencialmente ativada entre ADE e CEE.

Nas amostras de pacientes com CEE e ADE avaliadas em nosso trabalho, não observamos diferença na expressão nem na localização subcelular de p65 entre os dois subtipos histopatológicos de CE. Entretanto, esse resultado pode ser explicado pelo fato de nossas amostras serem, na sua grande maioria, de tumores em estádios avançados, momento no qual esse fator de transcrição desempenha um papel importante em ambas as neoplasias, explicando o fato de se apresentar com a expressão aumentada tanto em ADE quanto em CEE.

Apesar de não termos observado uma grande diferença na expressão dos mediadores inflamatórios avaliados entre os dois subtipos histopatológicos de CE, demonstramos no nosso trabalho que a via de NFkB-COX-2/IL-8 está diferencialmente ativada em ADE, quando comparado com CEE, e o aumento da expressão de TLR4 pode ser responsável pela ativação dessa via em ADE. Assim, o aumento da expressão de TLR4 já foi observado em vários outros tipos de tumores, como o gástrico, pancreático, de ovário, de pulmão, de cólon, e também em ADE (Fukata *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2013; Verbeeck *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2016). Em câncer de cólon, foi demonstrado que TLR4 era responsável pela ativação de COX-2 e consequente produção de PGE₂ (Fukata *et al.*, 2007). Em câncer gástrico, além do aumento da expressão, foi demonstrado que a ativação desse receptor induzia aumento da proliferação e translocação nuclear de p65 (Yuan *et al.*, 2013). Verbeek e colaboradores, 2013, demonstraram aumento de expressão gênica e proteica de TLR4 em amostras de ADE, EB e esofagite de refluxo, em comparação às amostras de esôfago normal, e ainda que a estimulação de linhagem celular de EB e cultura primária de amostras de EB com LPS eram capazes de induzir a ativação de NFkB e produção de IL-8. Esses trabalhos demonstram, então, que a ativação de TLR4 é importante para ativação de NFkB-COX-2/IL-8 em células tumorais, inclusive em ADE, corroborando nossa hipótese. Em nosso trabalho, além da ativação dessa via, demonstramos que TLR4 é capaz de induzir aumento do número de CL em ADE. No trabalho realizado com células primárias de câncer

de pulmão de não pequenas células, foi observado que a ativação de TLR4 induzia crescimento tumoral e metástase, e que isso ocorria via indução da expressão de *FASN* e acúmulo de lipídeos neutros (Ye *et al.*, 2016). Além disso, observaram uma correlação positiva entre a marcação para TLR4 nas amostras humanas de câncer de pulmão de não pequenas células com a expressão de *FASN* e marcação para CL (Ye *et al.*, 2016), demonstrando que a ativação de TLR4 é capaz de induzir formação de CL em outro tipo tumoral e parece ter um papel importante no processo neoplásico. Dessa forma, o aumento da expressão de TLR4 poderia estar ativando a via de NFκB-COX-2/IL-8 em ADE e levando a um conseqüente aumento do número de CL ao longo da evolução dessa neoplasia.

Já foi reportado a expressão aumentada de TLR4 em amostras de EB, indicando que esse receptor participa das etapas iniciais do desenvolvimento do ADE (Verbeeck *et al.*, 2013; Huhta *et al.*, 2016). Nesses trabalhos, foi demonstrado a marcação para TLR4 na camada basal do epitélio esofágico normal, da mesma forma como observamos em nossas amostras de esôfago de indivíduos não-obesos e de indivíduos obesos (dados não mostrados). Já foram levantadas algumas hipóteses de como o receptor TLR4 poderia ser ativado nas camadas basais do epitélio esofágico e participar do desenvolvimento do ADE. O conteúdo ácido-biliar do refluxo gastro-esofágico é capaz de induzir o rompimento da função de barreira do epitélio escamoso esofágico, através da modulação da quantidade de claudina-1 e claudina-4, proteínas envolvidas nas junções aderentes (Chen *et al.*, 2011). A quebra da função de barreira expõe a camada basal do epitélio escamoso e, também, a lâmina própria ao conteúdo ácido-biliar do refluxo e à microbiota esofágica (Yang *et al.*, 2012). Diversos trabalhos já demonstraram alteração na microbiota esofágica de pacientes com esofagite de refluxo e EB, comparados a indivíduos normais (Osias *et al.*, 2004; Pei *et al.*, 2005; Macfarlane *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013;). Em trabalho de Yang e colaboradores, 2009, foi demonstrado que a microbiota presente em pacientes com EB é constituída predominantemente de bactérias gram negativas, enquanto que no epitélio escamoso esofágico normal a predominância é de bactérias gram positivas. É importante ressaltar que o LPS, principal ligante ativador de TLR4, é um componente da membrana de bactérias gram negativas (Hoshino *et al.*, 1999). Logo, podemos inferir que a longa exposição ao refluxo ácido-biliar, ao mesmo tempo em que induz o fenótipo da metaplasia intestinal, altera a microbiota esofágica, favorecendo o crescimento de bactérias gram negativas, rompe a

barreira do epitélio escamoso, facilitando o acesso dessa microbiota até a camada basal do epitélio esofágico, que apresenta expressão de TLR4. Além de ser ativado por LPS, o receptor TLR4 pode ser ativado por ligantes endógenos ligados a danos celulares (DAMPs), como HMGB1, hsp60 e hsp50 (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2009). Sabe-se que esses ligantes são liberados por tecidos necróticos, e já foram encontrados aumentados em tecido esofágico tumoral (Ostrowski et al., 2007; Wu *et al.*, 2016). Juntos esses trabalhos indicam que tanto nos estágios iniciais de desenvolvimento, como no próprio ADE, há um microambiente que favorece a ativação de TLR4.

Indo de encontro aos trabalhos acima citados, nossos resultados demonstram que LPS ativa TLR4 e induz o aumento da formação de CL nas células de ADE, indicando que a ativação de TLR4 por LPS é capaz de levar ao aumento do número de CL. A ativação no nosso modelo foi avaliada e comprovada pela reversão do fenômeno após a administração de um inibidor específico desse receptor, o CLI095. Levando em consideração que o conteúdo do refluxo gastro-esofágico é capaz de tornar os receptores TLR4 presentes na camada basal do epitélio esofágico acessíveis e passíveis de serem ativados, devido a quebra da barreira do epitélio (Chen *et al.*, 2011; Verbeeck *et al.*, 2013; Huhta *et al.*, 2016), e que a ativação desse receptor é capaz de levar ao aumento do número de CL em linhagens celulares de ADE e de epitélio esofágico normal, como mostram nossos resultados, levantamos a hipótese de que os fatores de risco associados ao ADE e avaliados no nosso estudo – AO, DCA e/ou meio com pH ácido e nicotina – poderiam estar levando à indução da formação de CL em ADE através do aumento da expressão e/ou ativação de TLR4.

Devido a limitações experimentais, o modelo de pulsos de DCA não pode ser reproduzido nas células de ADE tratadas com inibidor de TLR4, então, foi realizada a incubação das células com ácido biliar por 24h em diferentes doses. Nesse modelo, o número de CL não foi induzido na linhagem de ADE, impossibilitando a avaliação da ativação de TLR4 e formação de CL por DCA. Em relação à modulação da expressão de TLR4, o tratamento anteriormente utilizado com DCA em meio com pH ácido não alterou a expressão de TLR4 nas linhagens celulares de CE, no entanto, induziu uma diminuição na expressão na linhagem celular normal de esôfago. Os ácidos biliares são capazes de induzir a alteração de vários genes envolvidos no processo inflamatório em diferentes tipos celulares, inclusive em ADE (Allen *et al.*, 2011; Verbeeck *et al.*, 2013; McAdam *et al.*, 2015; Abdel-Latif *et al.*,

2016). Em trabalho de Sodhi e colaboradores, 2012, foi demonstrado em células epiteliais de intestino que os ácidos biliares induzem o desenvolvimento das células de goblet no intestino e que TLR4 impede a diferenciação dessas células. Sabemos que as células de goblet estão presentes na metaplasia intestinal do esôfago, inclusive a presença dessas células é um critério para o diagnóstico do EB (Shaheen et al., 2009; Sharma, 2009; Spechler et al., 2010). Juntando esses resultados, podemos dizer que em momentos iniciais do desenvolvimento do ADE, antes do surgimento da metaplasia intestinal no esôfago, os ácidos biliares induzem a inibição da expressão de TLR4, e que isso é importante para o surgimento de células de goblet e, então, o aparecimento da metaplasia intestinal (Sodhi *et al.*, 2012). Uma vez que as células de esôfago tenham adquirido o fenótipo intestinal, os ácidos biliares não são mais capazes de alterar a expressão de TLR4.

De forma semelhante, o tratamento com AO não foi capaz de induzir a expressão de TLR4 nas células de CE e de epitélio esofágico normal avaliadas e nem de ativar esse receptor nas células de ADE. Embora já seja descrito que o AO induz o aumento da expressão e ativa o TLR4 em diferentes tipos celulares (Lager *et al.*, 2012; Mutoh & Ueda, 2013; Song *et al.*, 2014).

Por fim, a nicotina também não levou a um aumento da expressão e nem ativação de TLR4 nas células de CE, no entanto, foi capaz de induzir aumento na expressão de TLR4 na linhagem celular de epitélio esofágico normal. Esse resultado levanta a possibilidade de um novo mecanismo, pelo qual a nicotina poderia estar atuando na indução do número de CL em células esofágicas. Entretanto, discorda de outros trabalhos descritos na literatura e que demonstraram que a nicotina diminui a expressão de TLR4 em monócitos no sangue e em macrófago (Hamano *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2014). Mais experimentos são necessários para avaliar de fato o papel da nicotina no aumento da expressão de TLR4 em células epiteliais esofágicas.

Juntos esses resultados demonstram que os fatores de risco associados ao desenvolvimento do ADE não induzem a formação de CL via ativação do receptor TLR4. Provavelmente a indução da formação de CL induzida pelos fatores de risco avaliados ocorra via ativação dos seus receptores específicos. A nicotina se liga ao receptor nAChR em diversos tipos celulares e é capaz de ativar diferentes vias, como ativação da via Ras-Raf-ERK1, NFκB e da PKA (Schüller, 2009; Zhao, 2016), que poderiam culminar com a indução

da formação de CL. Vale ressaltar que o esôfago normal humano expressa diversos tipos de nAChRs (Chianello *et al.*, 2016). O principal receptor ativado pelos ácidos biliares é o Receptor de Farsenóide X (FXR) que, quando ativado por estes, induz a expressão de diversos genes envolvidos na síntese, transporte e secreção dos mesmos. Além desse receptor, os ácidos biliares são capazes de ativar o Receptor Pregnane X (PXR) e o receptor de vitamina D (Van de Winkel *et al.*, 2011). Alguns trabalhos já demonstraram que a ativação do receptor de vitamina D pela vitamina D3 é capaz de alterar o número de CL em células epiteliais de mama e células de adenocarcinoma de próstata (Esquenet *et al.*, 1997; Mehta *et al.*, 2000). Por sua vez, os ácidos graxos livres possuem uma família de receptores conhecidos como FFAR ou GPR. O AO é capaz de se ligar e ativar o receptor FFAR4 também conhecido como GPR120 (Miyamoto *et al.*, 2016; Moniri, 2016). Além disso, o AO é capaz de induzir aumento na expressão de FASN e SREBP-1c, ambos genes envolvidos na síntese de ácidos graxos e CLs (Patel *et al.*, 2016), e que poderiam explicar como o AO é capaz de induzir aumento de CL nas células esofágicas. Apesar dos fatores de risco estudados não terem induzido a formação de CL via TLR4, a ativação desse receptor com seu ligante específico é capaz de induzir um grande aumento no número de CL, sugerindo que a microbiota alterada no refluxo, rica em bactérias gram negativas que são capazes de ativar TLR4, representa mais um fator de risco associado exclusivamente ao ADE, e que poderia explicar o aumento de CL observada nesse tipo tumoral quando comparado ao CEE.

As limitações que posso descrever desse trabalho são a falta de levantamento acurado das variáveis clínico-patológicas e sócio-demográficas dos pacientes por se tratar de um estudo retrospectivo. A falta dessas informações inviabilizou a realização de uma análise de associação entre a exposição dos fatores de risco associados ao ADE e a presença de CL. Uma outra limitação foi a ausência de uma linhagem celular de EB intermediária entre ADE e a linhagem de epitélio normal de esôfago, Het1a, para melhor representar *in vitro* o fenômeno observado *in vivo*.

Uma vez que os CLs organizam e concentram substratos e mediadores inflamatórios, e apresentam um aumento desde as primeiras etapas do processo de carcinogênese do ADE, podemos propor que os CLs apresentam papel relevante na carcinogênese desse tumor. E que o aumento de CL observado no ADE está relacionado à exposição do epitélio esofágico saudável aos fatores de risco associados ao desenvolvimento desse tumor. Enquanto que em

CEE os CLs são encontrados em número pequeno. Além disso, as diferenças entre ADE e CEE em relação aos CLs, não se referem apenas a quantidade, mas também apresentam diferenças qualitativas. Essa afirmação pode ser corroborada pelo fato de que a via de NFkB-COX-2/IL-8 ter sido observada ativada somente em ADE e também pela associação positiva entre a presença de CL e a expressão de COX-2 detectada exclusivamente em ADE, indicando que, possivelmente, COX-2 estaria atuando de forma diferente entre essas duas neoplasias de esôfago. Por fim, a ativação de TLR4 em ADE induz um aumento de CL, o que não é observado em CEE, o que poderia explicar a diferença de CL observada entre essas duas neoplasias de esôfago.

6. Conclusões

9. A presença de CL aumenta progressivamente ao longo das etapas envolvidas na evolução para o ADE e é mais abundante nesses casos do que em CEE;

10. Não há correlação entre o aumento da presença de CL e as taxas de proliferação celular em nenhum dos grupos de amostras humanas analisado;

11. Assim como foi observado nas amostras humanas, os CLs são mais abundantes na linhagem celular de ADE, quando comparada às linhagens celulares de CEE e de esôfago normal avaliadas;

12. Os fatores de risco associados ao desenvolvimento do ADE avaliados (AO, DCA e/ou meio com pH ácido e nicotina) no nosso modelo *in vitro* foram capazes de induzir o aumento no número de CL, alterar discretamente as taxas de proliferação celular e também a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento do ADE somente nas linhagens celulares de esôfago normal e de ADE;

13. Não houve diferença quantitativa na expressão proteica de COX-2 entre as amostras de pacientes com ADE e CEE, entretanto, foi observada uma diferença na localização subcelular dessa proteína que parece implicar em uma regulação e funcionalidade distintas nos dois subtipos histológicos de câncer de esôfago;

14. Há expressão diferencial de diversos membros de TLR entre as linhagens de ADE e CEE, no entanto, nas amostras humanas isso não foi observado;

15. TLR4 é funcional em ambas as linhagens de CE, no entanto sua ativação induz a formação de CL somente na linhagem celular de ADE;

16. O aumento do número de CL induzido pelos fatores de risco associados ao ADE não ocorre via ativação de TLR4.

7. Referências Bibliográficas

ABDALLA S.I.; LAO-SIRIEIX P.; NOVELLI M.R.; LOVAT L.B.; SANDERSON I.R. & FITZGERALD R.C. Gastrin-induced cyclooxygenase-2 expression in Barrett's carcinogenesis. **Clin Cancer Res.** 10(14):4784-92 (2004).

ABEDI-ARDEKANI B.; DAR N.A.; MIR M.M.; ZAGAR S.A.; LONE M.M.; MATREL-PLANCHE G.; VILLAR S.; MOUNAWAR M.; SAIDI F.; MALEKZADEH R. & HAINAUT P. **Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations and expression in squamous cell carcinoma of the esophagus in central Asia.** BMC Cancer 12:602-610 (2012)

ABDEL-LATIF M.M.; DUGGAN S.; REYNOLDS J.V. & KELLEHER D. **Inflammation and esophageal carcinogenesis.** Curr. Opin. Pharmacol. 9:396-404 (2009).

ABDEL-LATIF M.M.; INOUE H.; KELLEHER D. & REYNOLDS J.V. **Factors regulating nuclear factor-kappa B activation in esophageal cancer cells: Role of bile acids and acid.** J Can Res Ther 12:364-73 (2016).

ABDEL-LATIF M.M.; O'RIORDAN J.; WINDLE H.J.; CARTON E.; RAVI N.; KELLEHER D.; REYNOLDS J.V. **NF-Kb activation in esophageal adenocarcinoma: relationship to Barrett's metaplasia, survival, and response to neoadjuvant chemoradiotherapy.** Ann. Surg. 239:490-500 (2004)

ABDEL-LATIF M.M.; WINDLE H.J.; TERRES A.; EIDHIN D.N.; KELLEHER D.; REYNOLDS J.V. Helicobacter pylori extract induces nuclear factor-kappa B, activator protein-1, and cyclooxygenase-2 in esophageal epithelial cells. **J Gastrointest Surg.** 10(4):551-62 (2006).

ACCIOLY M.T.; PACHECO P.; MAYA-MONTEIRO C.M.; CARROSSINI N.; ROBBS B.K.; OLIVEIRA S.S.; KAUFMAN C.; MORGADO-DIAZ J.A.; BOZZA P.T. & VIOLA J.P.B. **Lipid Bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E₂ synthesis in colon cancer cells.** Cancer Res. 68:1732-1740 (2008).

ALEMÁN J.O.; EUSEBI L.H.; RICCIARDIELLO L.; PADITAR K.; SANYAI A.J. & HOLT P.R. **Mechanisms of obesity-induced gastrointestinal neoplasia.** Gastroenterology 146:357-373 (2014).

ALLEN K.; JAESCHKE H. & COPPLE B.L. **Bile Acids Induce Inflammatory Genes in Hepatocytes: A Novel Mechanism of Inflammation during Obstructive Cholestasis.** The American Journal of Pathology 178(1)175-186 (2011)

ALSOP B.R. & SHARMA P. **Esophageal Cancer**. *Gastroenterol Clin N Am* 45:399–412 (2016)

AMBROSIO P. & BECCHETTI A. **Targeting neuronal nicotinic receptors in cancer: new ligands and potencial side-effects**. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*.8:38-52

AMBROSIO M.R.; PICCALUGA P.P; PONZONI M.; ROCCA B.J.; MALAGNINO V.; ONORATI M.; DE FALCO G.; CALBI V.; OGWANG M., NARESH K.N.; PILERI S.A.; DOGLIONI C.; LEOCINI L. & LAZZI S. **The alteration of lipid metabolism in Burkitt lymphoma identifies a novel marker: Adipophilin**. *PLOS ONE* 7:44315 (2012)

ANDERSON L.A.; JOHNSON B.T.; WATSON R.G.P; MURPHY S.J.; FERGUSON H.R.; COMBER H.; MCGUIGAN J.; REYNOLDS J.V. & MURRAY L.J. **Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the esophageal inflammation-metaplasia-adenocarcinoma sequence**. *Cancer Res*. 66:4975-4982 (2006)

ARBER N.; HIBSHOOSH H.; YASUI W., NEUGUT A.I.; HIBSHOOSH A.; YAO Y.; SGAMBATO A.; YAMAMOTO H.; SHAPIRA I.; ROSENMAN D.; FABIAN I.; WEINSTEIN I.B.; TAHARA E.; HOLT P.R. **Abnormalities in the expression of cell cycle-related proteins in tumors of the small bowel**. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 12:1101-1105 (1999)

ARITA Y.; KIHARA S.; OUCHI N.; TAKAHASHI M.; MAEDA K.; MIGAWA J.; HOTTA K.; SHIMOMURA I.; NAKAMURA T.; MIYAOKA K.; KURIYAMA H.; NISHIDA M.; ET AL. **Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity**. *Biochem. Biophys Res Commun* 257:79-83 (1999).

ARNOLD M.; SOERJOMATARAM I.; FERLAY J. & FORMAN D. **Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012** *Gut* 0:1–7 (2014).

ARREDONDO J.; CHERNYAVSKY A.L.; JOLKOVSKY D.L.; PINKERTON K.E.; GRANADO S.A. **Receptor mediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras-Raf-1-MEK1-ERK and JAK-2-STAT3 pathways downstream of alpha-7 nicotinic receptor in oral keratinocytes**. *FASEB J*. 12:2093-2101 (2006)

ASSIS E.F.; SILVA A.R.; CAIADO L.F.; MARATHE G.K.; ZIMMERMAN G.A., PRESCOTT S.M.; MCLNTYRE T.M.; BOZZA P.T. & CASTRO-FARIA-NETO H.C. **Synergism between platelet-activating-factor-like phospholipids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist generated during low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes**. *J. Immunol*. 171:2090-2098 (2003)

AVISSAR E.N.; TOIA L.; HU Y.; WATSON T.J.; JONES C.; RAYMOND D.P.; MATOUSEK A.; PETERS J.H. **Bile acid alone, or in combination with acid, induces**

CDX2 expression through activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR). J. Gastrointest. Surg. 13:212-222 (2009)

BADRREDDINE R.J. & WANG K.K. Barrett esophagus: an update. Nat Rev Gastroenterol. Hepatol 7:369-378 (2010)

BAEUERLE P.A. & HENKEL T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. Annu Rev Immunol 12:141–79 (1994).

BAGHDADI J.; CHAUDHARY N.; PEI Z. & YANG L.;Microbiome, innate Immunity, and esophageal adenocarcinoma. Clin Lab Med. 34(4): 721–732 (2014).

BALKWILL F. & MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow. Lancet 375:539-545 (2001)

BANDEIRA-MELO C.; PHOOFOLO M. & WELLER P.F. Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 productions in eosinophils and basophils. J. Biol. Chem. 276:22779-22787 (2001)

BANDEIRA-MELO C. & WELLER P.F. Mechanism of eosinophil cytokine release. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 100-supl 1 (2005)

BANI-HANI K. Prospective study of cyclin D1 overexpression in Barrett esophagus : association with increased risk of adenocarcinoma. J. Natl. Cancer Inst. 92:1316-1321 (2000).

BANSAL A.; SINGH M.P. & RAÍ B. Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem. **Int J Appl Basic Med Res. 6(2): 84–89 (2016)**

BARBERA M. & FITZGERALD R.C. Cellular Mechanisms of Barrett’s Esophagus Development. Surg Oncol Clin N Am 18:393–410 (2009)

BARRETT N.R. The oesophagus lined by columnar epithelium. **Gastroenterologia. 86(3):183-6 (1956).**

BEALES I.L.P. & OGUNWOBI O.O. Leptin synergistically enhances the anti-apoptotic and growth-promoting effects of acid in OE33 oesophageal adenocarcinoma cells in culture. Molecular and Cellular Endocrinology 274:60–68 (2007)

BELLINI M.F.; CADAMURO A.C.; SUCCI M.; PROENÇA M.A. & SILVA A.E. Alterations of the TP53 gene in gastric and esophageal carcinogenesis. J Biomed Biotechnol. 2012:891961 (2012).

BERNSTEIN H.; BERNSTEIN C.; PAYNE C.M.; DVORAKOVA K & GAREWAL H. **Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers.** *Mutat Res* 589:47-65 (2005)

BERNSTEIN H. **Activators of the promoters of genes associated with DNA damage, oxidative stress, ER stress and protein mald folding by the bile salt, doxycholate.** *Toxicol Lett* 108:37-46 (1999)

BHANDARI P.; BATEMAN A.C.; MEHTA R.L.; STACEY B.S.F.; JOHNSON P.; CREE I.A.; NICOLANTONIO F.D.; PATEL P. **Prognostic significance of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in patients with surgically resectable adenocarcinoma of the esophagus.** *BMC Cancer* 6:134-143 (2006)

BICKEL P.E.; TANSEY J.T. & WELTE M.A. **PAT proteins, an ancient family of lipid droplet protein that regulate cellular lipid stores.** *Biochim. Bioph. Acta* 1791:419-440 (2009)

BIRAMIJAMAL F.; ALLAMEH P.; MIRBOD P.; GROENE H.J.; KOOMAGI R.; HOLLSTEIN M. **Unusual profile and high prevalence of p53 mutations in esophageal squamous cell carcinomas from northern iran.** *Cancer Res.* 61:3119-3123 (2001).

BLACKETT K.L.; SIDDHI S.S.; CLEARY S.; STEED H.; MILLER M.H.; MACFARLANE S.; MACFARLANE G.T. & DILLON J.F. **Oesophageal bacterial biofilm changes in gastrooesophageal reflux disease, Barrett's and oesophageal carcinoma: association or causality.** *Aliment Pharmacol Ther.* 37:1084–92 (2013).

BOUSSAHMAIN C.; MOCHEL M.C. & HOANG M.P. **Perilipin and adipophilin expression in sebaceous carcinoma and mimics.** *Hum Pathol.* 44(9):1811-6 (2013).

BOSTROM P.; RUTBERG M.; ERICSSON J.; HOLMDAHL P.; ANDERSSON L.; FROHMAN M.A.; BOREN J. & OLOFSSON S.O. **Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1945–1951(2005)

BOLLSCHWEILER E., WOLFGARTEN E., GUTSCHOW C., et al: **Demographic variations in the rising incidence of esophageal adenocarcinoma in white males.** *Cancer* 92:549–555 (2001)

BOTTERMWECK A.A., SCHOUTEN L.J., VOLOVICS A., et al: **Trends in incidence of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in ten European countries.** *Int J Epidemiol* 29:645–654 (2000)

BOZZA P.T., MAGALHÃES K.G. & WELLER P.F. **Leukocyte lipid bodies – biogenesis and functions in inflammation.** *Biochim Biophys Acta* 1791:540-551 (2009).

BOZZA P.T., MELO R.C.N. & BANDEIRA-MELO C. **Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense.** *Pharmacol Ther.* 113:30-49 (2007).

BOZZA P.T.; PACHECO P.; YU W. & WELLER P.F. **NS-398: cyclooxygenase-2 independent inhibition of leukocyte priming for lipid body formation and enhanced leukotriene generation.** Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids 67:237-244 (2002)

BOZZA P.T.; PAYNE J.L.; GOULET J.L.L & WELLER P.F. **Mechanism of platelet-activating-factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids.** J. Exp. Med. 183:1515-1525 (1996)

BOZZA P.T.; PAYNE J.L.; MORHAM S.G.; LANGENBACH R.; SMITHIES O. & WELLER P.F. **Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase independent inhibition by aspirin.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93:11091-11096 (1996b)

BOZZA P.T. & VIOLA J.P.B **Lipid droplets in inflammation and cancer.** Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids (2010).

BOZZA P.T.; YU W.; PENROSE J.F.; MORGAN E.S.; DVORAK A.M. & WELLER P.F. **Eosinophil lipid bodies: specific, inducible, intracellular sites for enhanced eicosanoid formation.** J. Exp. Med. 186:909-920 (1997)

BRAUNSTEIN E.M.; QIAO X.T.; MADISON B. **Villin: a marker for development of the epithelial pyloric border.** Dev. Dyn. 224:90-102 (2002)

BROWN L.M., DEVESSA S.S. & CHOW W.H.: **Incidence of adenocarcinoma of the esophagus among white Americans by sex, stage, and age.** J Natl Cancer Inst 100:1184-1187 (2008)

BULANKINA A.V.; DEGGERICH A.; WENZEL D.; MUTENDA K.; WITTMANN J.G.; **TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets.** J. Cell Biol. 185:641-55 (2009).

BURNAT G.; MAJKA J. & KONTUREK P.C. **Bile Acids are multifunctional modulators of the Barrett's carcinogenesis.** J Physiol Pharmacol 61(2), 185-192 (2010).

BUTTAR S.N.; WANG K.K.; ANDERSON M.A.; DIERKHISING R.A.; PACIFICO R.J.; KRISHNADATH K.K.; LUTZKE L.S. **The effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition in Barrett's esophagus epithelium: an in vitro study.** J. Nat. Cancer Inst. 94:422-428 (2002)

CALLE E.E.; RODRIGUEZ C.; WALKER-THURMOND K. & THUN M.J. **Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults.** N. Engl. J. Med. 348:1625-1638 (2003)

CALLE E.E. & KAAKS R. **Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanism.** Nature Rev Cancer 4:579-591 (2004)

CASTELLSAGUE X.; MUNOZ N.; DE STEFANI **Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America.** *Int. J. Cancer* 8:658-664 (2000)

CASTRO-FARIA-NETO H.C.; BANDEIRA-MELO C. & BOZZA P.T. **Monocyte chemoattractant protein 1 CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B4-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response.** *J. Immunol.* 179:8500-8508 (2007)

CERAMI E.; GAO J.; DOGRUSOZ U.; GROSS B.; SUMER S.O.; AKSOY B.A.; JOCOBSEN A.; BYRNE C.J.; HEUER M.L.; LARSSON E.; ANTIPIN Y.; REVA B.; GOLDBERG A.P.; SANDER C. & SCHULTZ N. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discov.* 2(5):401-4 (2012).

CHANG B.H., LI L., PAUL A., TANIGUCHI S., NANNEGARI V., HEIRD W.C. & CHAN L. **Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein.** *Mol Cell Biol* 26:1063–76 (2006).

CHEN X.; OSHIMA T.; TOMITA T.; FUKUI H.; WATARI J.; MATSUMOTO T. & MIWA H. **Acidic bile salts modulate the squamous epithelial barrier function by modulating tight junction proteins.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301:G203–G209 (2011).

CHIANELLO M.N.; PINTO L.F.R.; NICOLAU-NETO P.; PINHO P.R.A.; ROSSINI A.; SIMAO T.A. & SOARES-LIMA S.C. **Nicotinic cholinergic receptors in esophagus: Early alteration during carcinogenesis and prognostic value.** *World J Gastroenterol* 22(31): 7146-7156 (2016)

CHOW W.H.; BLOT W.J.; VAUGHAN T.L.; RISCH H.A.; GAMMON M.D.; STANFORD J.L.; DUBROW R.; SCHOENBERG J.B.; MAUNE S.T.; FARROW D.C.; AHSAN H.; WEST A.B.; ROTTEDAM H.; NIWA S. & FRAUMENI J.F. Jr. **Body mass index and the risk of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia.** *J. Natl. Cancer Inst.* 2:150-155 (1998)

CHOI S.W.; STICKEL F.; BAIK H.W. **Chronic alcohol consumption induces genomic but not p53-specific DNA hypomethylation in rat colon.** *J Nut* 129:1945-1950 (1999)

COLLEYPRIEST B.J.; WARD S.G. & TOSH D. **How does inflammation cause Barrett's metaplasia.** *Curr. Opin. Pharmacol.* 9:721-726 (2009)

COOK M.B., CHOW W.H. & DEVESSA S.S. **Oesophageal cancer incidence in the United States by race, sex, and histologic type, 1977-2005.** *Br J Cancer* 101:855-9 (2009).

CONDAMINE T. & GABRILOVICH D.I. **Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function.** Trends in Immunology 32 (1) 19-25 (2011).

CONIO M. BLANCHI S. LAPERTOSA G. FERRARIS R. SABLICH R. MARCHI S. D'ONOFRIO V. LACCHIN T. IAQUINTO G. MISSALE G. RAVELLI P. CESTARI R. BENEDETTI G. MACRI G. FIOCCA R. MUNIZI F. FILIBERTI R, **Long-term endoscopic surveillance of patients with Barrett's esophagus. Incidence of dysplasia and adenocarcinoma: a prospective study.** Am. J. Gastroenterol., 98:1931–1939 (2003).

CONNORS S.K. BALUSU R.; KUNDU C.N.; JAISWAI A.S.; GAIROLA C.G. & NARAYAN S. **C/EBPbeta mediated transcriptional regulation of bcl-xl gene expression in human breast epithelial cells in response to cigarette smoke condensate.** Oncogene 28:921-932 (2009).

CONTI-FINE B.M.; NAVANEETHAM D.; LEI S. & MAUS A.D. **Neuronal nicotinic receptors in nonneuronal cells: new mediators of tobacco toxicity?** Eur. J.Pharmacol. 393:279–294 (2000).

CORLEY D.A; KUBO A.; LEVIN T.R.; BLOCK G.; HABEL L.; ZHAO W.; LEIGHTON P.; QUESENBERRY C.; RUMORE G.J. & BUFFLER P.A. **Abdominal obesity and body mass index as risk factors for Barrett's esophagus.** Gastroenterology 133:34-41 (2007)

CORN P.G.; HEATH E.I.; HEIMILLER R.; FOGT F.; FORASTIERE A.A.; HERMAN JG. **Frequent hypermethylation of the 5'CpG island of E-cadherin in esophageal adenocarcinoma.** Clin. Cancer Res 7:2765-2769 (2001)

COUSSENS L. M. & WERB Z. **Inflammation and cancer.** Nature 420:860–867 (2002)

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

DAGUPTA P.; RIZWANI W & PILAI S. **Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines.** Int J Cancer 124:36-45 (2009).

DAJON M.; IRIBARRENA K. & CREMER I. **Toll-like receptor stimulation in cancer: A pro- and anti-tumor double-edged sword.** Immunobiology 2985(16)30096 (2016)

DAS D.; CHILTON A.P. & JANKOWSKI J.A. **Chemoprevention of oesophageal cancer and the AspECT trial.** Recent Results Cancer Res. 181:161–169 (2009).

D'AVILA A.S; MAYA-MONTEIRO C.M. & BOZZA P.T. **Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections.** Int. Immunopharmacol. 8:1308-1315 (2008)

D'AVILA H.; MELO R.C.; PARREIRA G.G.; WERNECK-BARROSO E.; CASTRO-FARIA-NETO H.C. & BOZZA P.T. ***Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo.** J. Immunol. 176:3087-3097 (2006)

DELINGER C.E. & THOMPSON R.K. **Molecular basis of esophageal cancer development and progression.** Surg. Clin. N. Am. 92:1089-1103 (2012)

DENVER R.J.; BONETT R.M.; BOORSE G.C. **Evolution of Leptin Structure and Function.** Neuroendocrinol. 94:21-38 (2011)

DUGGAN C.; ONSTAD L.; HARDIKAR S.; BLOUNT P.L.; REID B.J. & VAUGHAN T.L. **Association Between Markers of Obesity and Progression From Barrett's Esophagus to Esophageal Adenocarcinoma Adenocarcinoma.** Clin Gastroenterol Hepatol. 11(8):934-943 (2013)

DUGGAN S.P.; GALLAGHER W.M.; FOX E.J.; ADBEL-LATIF M.M.; REYNOLDS J.V.; KELLEHER D. **Low pH induces co-ordinate regulation of gene expression in oesophageal cells.** Carcinogenesis 27:319-327 (2006)

DVORAK A.M.; MORGAN E.; SCHLEIMER R.P.; RYEOM S.W.; LICHTENSTEIN L.M. & WELLEW P.F. **Ultrastructural immunogold localization of prostaglandin endoperoxidase synthase (cyclooxygenase) to non-membrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human lung mast cells, alveolar macrophages, type II pneumocytes, and neutrophils.** J. Histochem. Cytochem. 40:759-769 (1992)

DVORAK A.M.; MORGAN E.; TZIZIK D.M. & WELLEW P.F. **Prostaglandin endoperoxidase synthase (cyclooxygenase): Ultrastructural localization to non-membrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human eosinophils and 3T3 fibroblast.** Int. Arch. Allergy Immunol. 105:245-250 (1994)

DEMEESTER S.R. **Epidemiology and biology of esophageal cancer.** Gastroint. Cancer Res. 3:sup1 (2009)

EDELSTEIN Z.R.; FARROW D.C.; BRONNER M.P.; ROSEN S.N. & VAUGHAN T.L. **Central adiposity and risk of Barrett's esophagus.** Gastroenterology 133:403-411 (2007)

ESQUENET M.; SWINNEN J.V.; VANVELDHOVEN P.P.; DENEFF C.; HEYNS W. & VERHOEVEN G. **Retinoid stimulate lipid synthesis and accumulation in LNCaP prostatic adenocarcinoma cells.** Mol. Cell. Endocrinol. 136:37-46 (1997)

EVANS B.B. & FENECH M. **Chronic alcohol exposure induces genome damage measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay and aneuploidy in human B lymphoblastoid cell line.** Mutagenesis 26:421-429 (2011)

FAGUNDES R.B.; ABNET C.C.; STRICKLAND P.T.; KAMANGAR F.; ROTH M.J. TAYLOR P.R. & DAWSEY S.M. **Higher urine 1- hydroxy pyrene glucuronide (1-OHPG)**

is associated with tobacco smoke exposure and drinking mate in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil. BMC Cancer 6(1):139 (2006).

FALK G.W. **Risk factors for esophageal cancer development.** Surg. Oncol. Clin. N. Am. 18:469-485 (2009).

FAN Y.P.; CHAKDER S.; GAO F. & RATTAN S. **Inducible and neuronal nitric oxide synthase involvement in lipopolysaccharide-induced sphincteric dysfunction.** American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. 280:G32–42 (2001).

FEI W.; WANG H.; FU X.; BIELBY C. & YANG H. **Conditions of endoplasmic reticulum stress stimulate lipid droplet formation in Saccharomyces cerevisiae.** Biochem J 424:61-67(2009)

FERLAY J., SHIN H.R., BRAY F., FORMAN D., MATHERS C. and PARKIN D.M. **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.** Int. J. Cancer 127:2893-2917 (2010).

FU X.W.; LINDSTROM J. & SPINDEL E.R. **Nicotine activates and upregulates nicotinic acetylcholine receptors in bronchial epithelial cells.** Am J Respir Cell Mol Biol 41: 93-9 (2009).

FUJIMOTO T.; KOGO H.; ISHIGURO K.; TAUCHI K. & NOMURA R. **Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new "membrane domain" in the cell.** J. Cell. Biol. 152:1079–1085 (2001).

FUJIMOTO T.; OHSAKI Y.; CHENG J.; SUZUKI M. & SHINOHARA Y. **Lipid Droplets: a classic organelle with new outfits.** Histochem. Cell Biol.130:263-279 (2008).

FUKATA M.; CHEN A.; VAMADEVAN A.S.; COHEN J.; BREGLIO K.; KRISHNAREDDY S.; XU R.; HARPAZ N.; DANNENBERG A.J. SUBBARAMAIAH K.; COOPER H.S.; ITZKOWITZ S.H. & ABREU M.T. **Toll-like receptor-4 (TLR4) promotes the development of colitis-associated colorectal tumors.** Gastroenterology. 133(6):1869–1881 (2007).

FREEDMAN N.D.; ABNET C.C.; LEITZMANN M.F.; MOUW T.; SUBAR A.F.; HOLLENBECK A.R. & SCHATZKIN A. **A prospective study of tobacco, alcohol, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes.** Am J Epidemiol 165(12):1424–33 (2007).

GAO J.; AKSOY B.A.; DOGRUSOZ U.; DRESDNER G.; GROSS B.; SUMER S.O.; SUN Y.; JOCOBSEN A.; SINHA R.; LARSSON E.; CERAMI E.; SANDER C. & SCHULTZ N. **Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal.** Sci Signal. 6(269):pl1 (2013)

GAO J.; HONG Y.E. & GINETTE S. Expression in Adipocyte Precursors by Long-Chain Fatty Acids. *J Cell Physiol* **182:297–302 (2000).**

GILBERT E.W.; LUNA R.A.; HARRISON V.L. & HUNTER J.G. **Barrett's Esophagus: A Review of the literature.** *J. Gastrointest. Surg.* 34:546-559 (2011).

GIRI S.; PATHAK R.; ARYAL M.R.; KARMACHARYA P.; BHATT V.J. & MARTIN M.G, **Incidence trend of esophageal squamous cell carcinoma: an analysis of Surveillance Epidemiology, and End Results (SEER) database.** *Cancer Causes Control.* 26(1):159-61 (2015).

GODOY W.; ALBANO R.M.; MORAES E.G.; PINHO P.R.; NUNES R.A.; SAITO E.H.; HIGA C.; FILHO I.M.; CRUEL C.D.; SCHIRMER C.C.; GURSKI R.; LANG M.A. & PINTO L.F. **CYP2A6/2A7 and CYP2E1 expression in human oesophageal mucosa: regional and inter-individual variation in expression and relevance to nitrosamine metabolism.** *Carcinogenesis* 23(4):611-6 (2002)

GONG J.; CHU Y.; XU M.; HUO J. & LV L.Esophageal squamous cell carcinoma cell proliferation induced by exposure to low concentration of cigarette smoke extract is mediated via targeting miR-101-3p/COX-2 pathway. *Oncol Rep.* **35(1):463-71 (2016).**

GONZAGA I.M.; LIMA S.C.; SANTOS P.T.S; BLANCO T.C.M.; REIS B.S.B.; QUINTELLA D.C.; OLIVEIRA I.M.; FARIA P.A.S., KRUEL C.D.P., ANDREOLLO N.A., SIMÃO T.A., PINTO L.F.R. **Alterations in epidermal growth factor receptors 1 and 2 in esophageal squamous cell carcinomas.** *BMC Cancer* 12:569-577 (2012)

GREENBERG A.S.; EGAN J.J.; WEK S.A.; GARTY N.B.; BLANCHETTE-MACKIE E.J. & LONDOS C. **Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets.** *J Biol Chem* 266:11341–6 (1991).

GREENAWALT D.M.; DUONG C.; SMYTH G.K.; CIAVARELLA M.L.; THOMPSON N.J.; TIANG T.; MURRAY W.K.; THOMAS R.J. & PHILLIPS W.A. **Gene expression profiling of esophageal cancer: comparative analysis of Barrett's esophagus, adenocarcinoma, and squamous cell carcinoma.** *Int J Cancer* 120:1914–21 (2007).

GROISMAN G.M.; AMAR M.; MEIR A. **Expression of the intestinal marker CDX2 in the columnar-lined esophagus with and without intestinal (Barrett's) metaplasia and neoplastic disorders.** *Hum. Pathol* 32:1157-1165 (2001)

GROSS D.N.; MIYOSHI H.; HOSAKA T.; ZHANG H.H.; PINO E.C.; SOUZA S.; OBIN M.; GREENBERG A.S. & PILCH P.F. **Dynamics of lipid droplet-associated proteins**

during hormonally stimulated lipolysis in engineered adipocytes: stabilization and lipid droplet binding of adipocyte differentiation-related protein/adipophilin. *Mol Endocrinol* 20:459–466 (2006).

GUO J.; IBARAGU S. & ZHU T. **Nicotine promotes mammary tumor migration via a signaling cascade involving protein kinase C and cdc42.** *Cancer Res* 68:8473-8481 (2008).

HAHN M.A.; HAHN T.; LEE D.H.; ESWORTHY R.S.; KIM B.W.; RIGGS A.D. **Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation.** *Cancer Res.* 68:10280-10289 (2008)

HAINAUT P. & HOLLSTEIN M. **p53 and human cancer: the first ten thousand mutations.** *Adv. Cancer Res.* 77: 81-137 (2000)

HAKUMAKI J.M. & KAUPPINEN R.A. **H-NMR visible lipids in the life and death of cells.** *Trends Biochem Sci* 25:357-362 (2000)

HANAHAHAN D. & WEINBERG R.A. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 144:646-672 (2011)

HARDWICK J.C.; VAN DEN BRICK G.R.; OFFERHAUS G.J. VAN DEVENTER S.J. & PEPPELENBOSCH M.P. **Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells.** *Gastroenterology* 1:79-90 (2001)

HARTMAN I.Z.; LIU P.; ZEHMER J.K.; LUBY-PHELPS K.; JO Y.; ANDERSON R.G. & DEBBOSE-BOYD R.A. **Sterol-induced dislocation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from endoplasmic reticulum membranes into the cytosol through a subcellular compartment resembling lipid droplets.** *J Biol Chem* 285:19288-19298 (2010)

HASHIMOTO N.; INAYAMA M.; FUJISHIMA M. & SHIOZAKI H. **Clinicopathologic significance of expression of cyclooxygenase-2 in human esophageal squamous cell carcinoma.** *Hepatogastroenterology.* 54(75):758-60 (2007)

HAYES S.; AHMED S. & CLARK P. **Immunohistochemical assessment for Cdx2 expression in the Barrett metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence.** *J Clin Pathol* 64:110-113 (2011).

HECHT S.S. **Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer.** *Nat Rev Cancer* 3(10):733–44 (2003)

HEESCHEN C.; WEIS M.; AICHER A.; DIMMELER S. & COOKE J.P. **A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors.** *J Clin Inves* 110:527-536 (2002).

HEID W.R.; MOLL R.; SCHWETLICK I.; RACKWITZ H.R. & KEENAN J. **Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases.** Cell Tissue Res 294: 309-321 (1998).

HELMINEN O.; HUHTA H.; TAKALA H.; LEHENKARI P.P.; SAARNIO J.; KAUPPILA J.H. & KARTTUNEN T.J. **Increased Toll-like receptor 5 expression indicates esophageal columnar dysplasia.** Virchows Arch. 464(1):11-8 (2014).

HERBSTER S, FERRARO C.T.L., KOFF N.K., ROSSINI A., KRUEL C.D.P., ANDREOLLO N.A., RAPOZO D.C.M., BLANCO T.C.M., FARIA P.A.S., SANTOS P.T.S., ALBANO R.M., SIMÃO T.A., PINTO L.F.R. **HPV infection in Brazilian patients with esophageal squamous cell carcinoma: Interpopulational differences, lack of correlation with surrogate markers and clinicopathological parameters.** Cancer Lett. 326:52-58 (2012)

HONGO M.; NAGASAKI Y. & SHOJI T. **Epidemiology of esophageal cancer: orient to occident. Effects of chronology, geography and ethnicity.** J Gastroenterol Hepatol.24: 729-735(2009).

HOSHINO K.; TAKEUCHI O.; KAWAI T.; SANJO H.; OGAWA T.; TAKEDA Y.; TAKEDA K.; AKIRA S. **Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps gene product.** J Immunol. 162:3749-52 (1999).

HOWARD J.M.; BEDDY P.; ENNIS D.; KEOGAN G.P.; PIDGEON G.P. & REYNOLDS J.V. **Associations between leptin and adiponectin receptor upregulation, visceral obesity and tumor stage in esophageal and junctional adenocarcinoma.** Br. J. Sur. 97:1020-1027 (2010)

HU Y.; WILLIAMS V.A.; GELLERSEN O.; JONES C.; WATSON T.J.; PETERS J.H. **The pathogenesis of barrett's esophagus: secondary bile acids upregulate intestinal differentiation factor cdx2 expression in esophageal cells.** J. Gastrointest. Sur. 11:827-834 (2007)

HUSSAIN S.P. & HARRIS C.C. **Inflammation and cáncer: an ancient link with novel potentials.** Int. J. Cancer 121:2373-2380 (2007)

HUO X.; JUERGENS S.; ZHANG X.; REZAEI D.; YU C., STRAUCH E.D. WANG J.Y.; CHENG E.; MEYER F.; WANG D.H.; SPECHLER S.J. & SOUZA R.F. **Deoxycholic acid causes DNA damage while inducing apoptotic resistance through NF- κ B activation in benign Barrett's epithelial cells.** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 301:G278-G286 (2011).

IKEDA H.; SASAKI M.; ISHIKAWA A.; SATO Y.; HARADA K.; ZEN Y.; KAZUMORI H.; NAKANUMA Y. **Interection of Toll-like receptors with bacterial components induces expression of CDX2 and MUC2 in rat billiary epithelium in vivo and in cultura.** Lab. Invest 87:559-571 (2007)

IMAMURA M., INOBUCHI T., IKUYAMA S., TANIGUCHI S., KOBAYASHI K., NAKASHIMA N. & NAWATA H. **ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E775–83 (2002).

INCA. **Incidência de câncer no Brasil** (2015).

ISLAMI F., BOFFETTA P., REN J.S., PEDOEIM L., KHATIB D. & KAMANGAR F. **High-temperature beverages and foods and esophageal cancer risk-a systematic review.** *Int. J. Cancer* 125:491-524 (2009).

JACQUIER N.; CHOUDHARY V.; MARI M.; TOULMAY A.; REGGIORI F.; SCHNEITER R. **Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Cell Sci* 124:2424-2437 (2011)

JANKOWSKI J.A.; HARRISON R.F.; PERRY I.; BALKWILL F. & TSELEPIS C. **Barrett's metaplasia.** *Lancet* 356:2079-2085 (2000)

JANKOWSKI J.A.; WRIGHT N.A.; MELTZER S.J.; TRIADAFILOPOULOS G.; GEBOES K.; CASSON A.G.; KERR D. & YOUNG L.S. **Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia- adenocarcinoma sequence in the esophagus.** *Am J Pathol.* 154:965–73 (1999).

JAKSZYN P. & GONZALEZ C.A. **Nitrosamine and related food intake and gastric and esophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence.** *World J. Gastroenterol.* 12:4296-4303 (2006).

JIANG Z.; GONG J.; ZHANG Z. & QIAO Z. **Influence of acid and bile acid on ERK activity, PPAR γ expression and cell proliferation in normal human esophageal epithelial cells.** *World J Gastroenterol* 12(15):2445-2449 (2006).

JUNG Y.Y.; LEE Y.K. & KOO J.S. Expression of lipid metabolism-related proteins in breast phyllodes tumors. ***Neoplasma.* 63(2):254-62 (2016).**

JUNG Y.Y.; KIM H.M. & KOO J.S. Expression of Lipid Metabolism-Related Proteins in Metastatic Breast Cancer. ***PLoS ONE* 10(9): e0137204 (2015).**

KAMANGAR F.; CHOW W.; ABNET C. & DAWSEY S. **Environmental Causes of Esophageal Cancer.** *Gastroenterol Clin North Am.* 38(1): 27–vii. (2009)

KANT P. & HULL M.A. Excess body weight and obesity: the link with gastrointestinal and hepatobiliary cancer. ***Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 8(4):224-38 (2011).**

KARIN M.; CAO Y.; GRETFENF.R.; LI Z.W. **NF-Kb in cáncer: from innocent bystander to major culprit.** Nat. Rev. Cancer 2:301-310 (2002).

KARPE F.; DICKMANN J.R. & FRAYN K.N. **Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation.** Diabetes 60: 2441–2449 (2011).

KAS A.M. & GRADY W.M. **Epigenetic biomarkers in esophageal cáncer.** Cancer Lett 7:563-571 (2012)

KAZUMORI H.; ISHIHARA S.; RUMI M.A.; KADOWAKI Y.; KINOSHITA Y. **Bile acids directly augment caudal related homeobox gene CDX2 expression in oesophageal keratinocytes in Barrrt's epithelium.** Gut 55:16-25 (2006)

KELESIDIS I.; KELESIDIS T. & MANTZOROS C.S. **Adiponectina and cancer: a systematic review.** Br. J. Cancer 94:1221-1225 (2006)

KENDALL B.J.; MACDONALD G.A.; HAYWARD N.K.; PRINS J.B.; BROWN I.; WALKER N.; PANDEYA N.; GREEN A.C.; WEBB P.M.; WHITEMAN D.C. **Leptin and the risk of Barrett's Oesophagus.** Gut 57:448-454 (2008).

KHANDELAR M.J.; COHEN P. & SPIEGELMAN B.M. **Molecular mechanisms of cancer development in obesity.** Nat Rev Cancer 11:886-895 (2011)

KIEN C.L. **Dietary interventions for metabolic syndrome: role of modifying dietary fats.** Curr Diab Rep 9: 43–50 (2009).

KOH J.S.; LEE S.S.; BAEK H.J. & KIM Y.I. **No association of high-risk human papillomavirus with esophageal squamous cell carcinomas among Koreans, as determined by polymerase chain reaction.** Dis Esophagus 21(2):114–7 (2008).

KONG J.; CRISSEY M.A.; FUNAKOSHI S.; KREINDLER J.L.; LYNCH J.P. **Ectopic CDX2 expression in murine esophagus models an intermediate stage in the emergence of Barrett's esophagus.** PLOS ONE 6:18280 (2011)

KOSAKA T.; MIYATA A.; IHARA H.; HARA S.; SUGIMOTO S.; TAKEDA T.; TAGAHASHI E.; TANABE T. **Characterization of the human gene (PSTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2.** Eur. J. Biochem. 221:88-897 (1994)

KONTUREK P.C.; BURNAT G.; RAU T.; HAHN E.G.; KONTUREK S. **Effect of adiponectin and ghrelin on apoptosis of Barrett adenocarcinoma cell line.** Dig Dis Sci 53:597-605 (2008)

KONTUREK P.C.; NIKIFORUK A.; KANIA J.; RAITHEL M.; HAHN E.G. & MUHLDOERFER S. **Activation of NFkappaB represents the central event in the neoplastic progression associated with Barrett's esophagus: a possible link to the inflammation and**

overexpression of COX-2, PPARgamma and growth factors. *Dig Dis Sci* 49(7-8):1075-83 (2004).

KUBO A. & CORLEY D. A. **Body mass index and adenocarcinomas of the esophagus or gastric cardia: a systematic review and meta-analysis.** *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15:872–878 (2006).

KRAHMER N.; HILGER M.; KORY N.; WILFLING F.; STOEHR G.; MANN M.; FARESE R.V. & WALTHER T.C. **Protein correlation profiles identify lipid droplet proteins with high confidence.** *Mol Cell Proteomics* 12:1115-1126 (2013)

KURAT C.F.; WOLINSKI H.; PETSCHNIGG J.; KALUARACHCHI S.; ANDREWS B.; NATTER K. & KOHLWEIN S.D. **Cdk1/Cdc28-Dependent Activation of the Major Triacylglycerol Lipase Tgl4 in Yeast Links Lipolysis to Cell-Cycle Progression.** *Molecular Cell* 33, 53–63 (2009).

KUESTER D.; EL-RIFAI W.; PENG D.; RUEMMELE P.; KROECKEL I.; PETERS B. **Silencing of MGMT expression by promoter hypermethylation in the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence of Barrett's esophagus.** *Cancer Lett.* 275:117-126 (2009).

LAGER S.; GACCIOLI F.; RAMIREZ V.I.; JONES H.N. & POWEL T.L. **Oleic acid stimulates system A amino acid transport in primary human trophoblast cells mediated by toll-like receptor 4.** *Journal of Lipid Research* 54:725-733 (2013)

LAGERGREN J. **Influence of obesity on the risk of esophageal disorders.** *Nat. Rev Gastroenterol. Hepatol.* 8:340-347 (2011)

LAGERGREN J.; BERGSTROM R.; LINDGREN A. & NYREN O. **Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma.** *N. Engl. J. Med.* 340:825–831 (1999).

LAGERGREN J.; BERGSTROM R. & NYREN O. **Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia.** *Ann. Intern. Med.* 130:883-890 (1999)

LAGERGREN J. & LAGERGREN P. **Oesophageal cancer.** *BMJ* 341:1207-1211 (2010)

LAGORCE C.; PARAF F.; VIDAUD D., COUVELARD A., WENDUM D., MARTIN A., FLEJOU J.F. **Cyclooxygenase-2 is expressed frequently and early in Barrett's oesophagus and associated adenocarcinoma.** *Histopathology* 42:457-465 (2003).

LAM D.C.; GIRARD L.; RAMIREZ R.; CHAU W.S.; SUEN W.S.; SHERIDAN S.; TIN V.P.; CHUNG L.P.; WONG M.P.; SHAY J.W.; GAZDAR A.F., LAM W.K. & MINNA J.D. **Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in non-small-cell lung cancer reveals differences between smokers and nonsmokers.** *Cancer Res.* 67(10):4638-47 (2007).

LARIGAUDERIE G.; FURMAN C.; JAYE M.; LASSELIN C.; COPIN C.; FRUCHART J.C.; CASTRO G. & ROUIS M. **Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:504–510 (2004).

LEE J.Y.; SOHN K.H.; RHEE S.H. & HWANG D. **Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor-4.** *J. Biol. Chem.* 276:16683-16689 (2001)

LEON-BUITIMEA A.; RODRIGUEZ-FRAGOSO L.; LAUER F.T.; BOWLES H.; THOMPSON T.A. & BURCHIEL S.W. **Ethanol-induced oxidative stress is associated with EGF receptor phosphorylation in MCF-10A cells overexpressing CYP2E1.** *Toxicol Lett* 209:161-165 (2012)

LIANG Y.Y.; ESTEVE A.; MARTEL-PLANCHE G.; TAKAHASHI S.; LU S.H.; MONTESANTO R.; HOLLSTEIN M. **p53 mutations in esophageal tumors from high incidence areas of china.** *Int. J. Cancer* 61:611-614 (1995)

LI B. & DEWEY C.N. **RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome.** *BMC Bioinformatics* 12:323 (2011)

LI M. **Leptin and Beyond: An odyssey to the central control of Body Weight.** *Yale J Biol Med.* 84:1-7 (2011)

LIMA S.C.; HERNANDEZ-VARGAS H.; SIMÃO T.; DURAND G.; KRUEL C.D.; LE CAVEZ-KELM F.; RIBEIRO PINTO L.F.; HERCERG Z. **Identification of a DNA methylome signature of esophageal squamous cell carcinoma and potential epigenetic biomarkers.** *Epigenetics* 6 (2011)

LINDBLAD M.; RODRIGUES L.A. & LAGERGREN J. **Body mass, tobacco and alcohol and risk of esophageal, gastric cardia, and gastric non-cardia adenocarcinoma among men and women in a nested case-control study.** *Cancer Causes Control* 3:285-294 (2005)

LISTENBERGER L.L., OSTERMEYER-FAY A.G., GOLDBERG E.B., BROWN W.J. & BROWN D.A. **Adipocyte differentiation-related protein reduces lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover.** *J Lipid Res* 48:2751–2761 (2007).

LIU N.; ANDO T.; ISHIGURO K.; MAEDA O.; WATANABE O.; FUNASAKA K.; NAKAMURA M.; MIYAHARA R.; OHMIYA N. & GOTO H. **Characterization of bacterial biota in the distal esophagus of Japanese patients with reflux esophagitis and Barrett's esophagus.** *BMC infectious diseases.* 13:130-136 (2013).

- LI Z.; BLOCK M.S.; VIERKANT R.A.; FOGARTY Z.C.; WINHAM S.J.; VISSCHER D.W.; KALLI K.R.; WANG C. & GOODE E.L. **The inflammatory microenvironment in epithelial ovarian cancer: a role for TLR4 and MyD88 and related proteins.** Tumor Biol. (2016)
- LOOBY E.; ABDEL-LATIF M.M.; ATHIE-MORALES V.; DUGGANI S.; LONG A. & KELLEHER D. **Deoxycholate induces COX-2 expression via Erk1/2-, p38-MAPK and AP-1-dependent mechanisms in esophageal cancer cells.** BMC Cancer 9:190-195 (2009).
- LONDOS C.; SZTALRYD C.; TANSEY J.T. & KIMMEL A.R. **Role of PAT proteins in lipid metabolism.** Biochimie 87:45–49 (2005)
- LONG A.P.; MANNESCHMIDT A.K.; VERBRUGGE B.; DORTCH M.R.; MINKIN S.C.; PRATER K.E.; BIGGERSTAFF J.P.; DUNLAP J.R. & DALHAIMER P. **Lipid droplet de novo formation and fission are linked to the cell cycle in fission yeast.** Traffic 13:705-714 (2012)
- LUDMIR E.B.; STEPHENS S.J.; PALTA M.; WILLETT C.G. & CZITO B.G. **Human papillomavirus tumor infection in esophageal squamous cell carcinoma.** J Gastrointest Oncol 6(3):287-295 (2015)
- LU Y.C.; YE H.W.C. & OHASHI P.S. **LPS/TLR4 signal transduction pathway.** Cytokine 42:145–151 (2008)
- MADANI K., ZHAO R., LIM H.J., CASSON A.G. **Prognostic value of p53 mutations in oesophageal adenocarcinoma: final results of a 15-year prospective study.** Eur. J. Car.Thorac. Sur 37:1427-1432 (2010).
- MANDARD A.M.; HAINAUT P. & HOLLSTEIN M. **Genetic steps in the development of squamous cell carcinoma of the esophagus.** Mutation Res. 462:335-342 (2000)
- MARCHETTI M.; CALLIOT E.; PRINGAULT E. **Chronic acid exposure leads to activation of the cdx2 intestinal homeobox gene in a long-term culture of mouse esophageal keratinocyte.** J. Cell Sci. 116:1429-1436 (2003)
- MARESCH J.; SCHOPPMANN S.F.; THALLINGER C.M.R.; ZIELINSKI C.C.; HEJNA M. **HER-2 NEU gene amplification and over-expression in stomach and esophageal adenocarcinoma: from pathology to treatment.** Critical Rev Oncol. 32:147-159 (2011)
- MARTIN S. & PARTON R.G. **Caveolin, cholesterol, and lipid bodies.** Semin Cell Dev Biol 16:163–174 (2005)
- MATTOS K.A., D'AVILA H., RODRIGUES L.S., OLIVEIRA V.G.C., SARNO E.N., ATELLA G.C., PEREIRA G.M., BOZZA P.T. & PESSOLANI M.C.V. **Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis.** J. Leukoc. Biol. 87:1-14 (2010).

MARTINEZ-BOTAS J.; ANDERSON J.B.; TESSIER D.; LAPILLONNE A.; CHANG B.H.;QUAST M.J.; GORENSTEIN D.; CHEN K.H. & CHAN L. **Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in Lepr(db/db) mice.** Nat Genet 26:474–479 (2000).

MAYA-MONTEIRO C.M.; ALMEIDA P.E.; D'AVILA A.S.; MARTINS A.S.; REZENDE H.; CASTRO-FARIA-NETO H.C. & BOZZA P.T. **Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism.** J. Biol. Chem. 283:2203-2210 (2008).

MAYA-MONTEIRO C.M. & BOZZA P.T. **Leptin and mTOR: partners in metabolism and inflammation.** Cell Cycle 7:1713-1717 (2008b)

MENG X.Z.; ZHU S.T.; ZHOU Q.Z.; LI P.; WANG Y.J. & ZHANG S.T. **Promoter methylation regulates cigarette smoke-stimulated cyclooxygenase-2 expression in esophageal squamous cell carcinoma.** J. Dig Dis 4:208-213 (2012)

MEHTA R.R.; BRATESCU L.; GRAVES J.M.; GREEN A. & MEHTA R.G. **Differentiation of human breast carcinoma cells by a novel vitamin D analog: 1-alpha-hydroxyvitamin D5.** Int J Oncol 16(1):65-73 (2000)

MEHTA S.; BODDY A.; JOHNSON I.T. & RHODES M. **Systematic review: cyclooxygenase-2 in human oesophageal adenocarcinogenesis.** Aliment. Pharmacol. Ther.24:1321-1331 (2006)

MIYAMOTO J.; KASUBUCHI M.; ICHIMURA A.; NAKAJIMA A. & KIMURA I. **Nutritional Signaling via Free Fatty Acid Receptors.** Int. J. Mol. Sci. 17 (450)1-12 (2016)

MOESSINGER C.; KUERSCHNER L.; SPANDL J.; SHEVCHENKO A. & THIELE C. **Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine.** J. Biol. Chem. 286:21330–39 (2011).

MOKROWIECKA A.; SOKOLOWSKA M.; LUCZAK E.; DUDOJC M.; WIECZFINSKA J.; KACPRZAK D.; WIERZCHNIEWSKA-LAWSKA A.; PAWLICZAK R.; & MALECKA-PANAS E. **Adiponectinand leptin receptors expression in Barrett's esophagus and normal squamous epithelium in relation to central obesity status.** J Physiol Pharmacol. 64(2):193-9 (2013).

MONIRI N.H. **Free-fatty acid receptor-4 (GPR120): Cellular and molecular function and its role in metabolic disorders.** Biochemical Pharmacology 110:1–15 (2016)

MONTESANO R.; HOLLSTEIN M. & HAINAUT P. **Genetic alterations in esophageal cancerand their relevance to etiology and pathogenesis: a review.** Int. J. Cancer, 5225-235 (1996).

MONTESANO R. & HAINAUT P. **Molecular precursor lesions in oesophageal cancer.** *Cancer Surveys* 32:53-68 (1998).

MOON H.S.; BATIREL S. & MANTZOROS C.S. **Alpha linolenic acid and oleic acid additively down-regulate malignant potential and positively cross-regulate AMPK/S6 axis in OE19 and OE33 esophageal cancer cells.** *Metabolism*. 63(11):1447-54 (2014).

MOREIRA L.S.; PIVA B.; GENTILE L.B.; MESQUITA-SANTOS F.P.; D'AVILA H.; MAYA-MONTEIRO C.M.; BOZZA P.T.; BANDEIRA-MELO C. & DIAZ B.L. **Cytosolic phospholipase A2-driven PGE2 synthesis within unsaturated fatty acids-induced lipid bodies of epithelial cells.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1791:156–165 (2009).

MORRIS C.D.; ARMSTRONG G.R.; BIGLEY G.; GREEN H. & ATTWOOD S.E. **Cyclooxygenase-2 expression in the Barrett's metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence.** *Am. J. Gastroenterol.* 96:990-996 (2001)

MOTOMURA W.; INOUE M.; OHTAKE T.; TAKAHASHI N.; NAGAMINE M.; TANNO S.; KOHGO Y. & OKUMURA T. **Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340:1111–1118 (2006).

MULDER J.D.; LOBO D.; MAK N. & JUSTINICH C.J. **Expression of Toll-Like Receptors 2 and 3 on Esophageal Epithelial Cell Lines and on Eosinophils During Esophagitis.** *Dig. Dis. Sci.* 24:122-127 (2011).

MUTHUSAMY K., HALBERT G & ROBERTS F. **Immunohistochemical staining for adipophilin, perilipin and TIP47.** *Journal of Clinical Pathology* 59:1166–1170 (2006).

MUTOH A. & UEDA S. **Peroxidized unsaturated fatty acids stimulate Toll-like receptor 4 signaling in endothelial cells.** *Life Sciences* 92:984–992 (2013)

NAGLE C.A.; KLETT E.L. & COLEMAN R.A. **Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance.** *J. Lipid Res.* 50:74–79 (2009).

NAVARINI D.; GURSKI R.R.; MADALOSSO C.A.; AITA L.; MEURER L. & FORNARI F. **Epidermal growth factor receptor expression in esophageal adenocarcinoma: relationship with tumor stage and survival after esophagectomy.** *Gastroenterol. Res. Pract.* 94:941-954 (2012).

NARIKIYO M.; TANABE C.; YAMADA Y.; IGAKI H.; TACHIMORI Y.; KATO M.; MONTESANO R.; SAKAMOTO H.; NAKAJIMA Y. & SASAKI H. **Frequent and preferential infection of *Treponema denticola*, *Streptococcus mitis*, and *Streptococcus anginosus* in esophageal cancers.** *Cancer Sci.* 95:569–74 (2004).

NASROLLAHZADEH D., KAMANGAR F., AGHCHELI K., SOTOUDEH M., ISLAMI F., ABNET C.C., SHAKERI, R., SEMMANI, S., YE W., BOFFETTA, P., DAWSEY, S.M. and

MALEKZADEH R. Opium, tobacco, and alcohol use in relation to oesophageal squamous cell carcinoma in a high-risk area of Iran. Br. J. Cancer 98:1857-1863 (2008).

NEHRA D.; HOWELL P.; WILLIAMS C.P.; PUE J.K. & BEYNON J. Toxic bile acids in gastro-oesophageal reflux disease: influence of gastric acidity. Gut 44:598-602 (1999)

NZEAKO U.C.; GUICCIARDI M.E.; YOON J.H.; BRONK S.F.& GORES G.J. COX-2 inhibits Fas-mediate apoptosis in cholangiocarcinoma cells. Hepatology. 35:552-9 (2002)

OGDEN C.L.; CARROLL M.D. KIT B.K.; FLEGAL K.M. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2010. JAMA 307:483-490 (2012)

OGUNWOBI O.; MUTUNGI G. & BEALES I.L.P. Leptin Stimulates Proliferation and Inhibits Apoptosis in Barrett's Esophageal Adenocarcinoma Cells by Cyclooxygenase 2-Dependent, Prostaglandin-E2- Mediated Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor and c-Jun NH2-Terminal Kinase Activation. Endocrinology 4:4505-4516 (2006)

OHASHI Y.; ISHIBASHI S., SUZUKI T.; SHINEHA R.; MORIYA T.; SATOMI S. & SASANO H. Significance of tumor associated tissue eosinophilia and other inflammatory cell infiltrate in early esophageal squamous cell carcinoma. Anticancer Res. 5A:3025-30 (2000).

OHSAKI Y.; CHENG J.; SUZUKI M.; FUJITA A. & FUJIMOTO T. Lipid droplets are arrested in the ER membrane by tight binding of lipidated apolipoprotein B-100. J. Cell Sci. 121:2415-22 (2008).

OLORIS S.C.; FRAZER-ABEL A.A.; JUBALA C.M.; FOSMIRE S.P.; HELM K.M.; ROBINSON S.R.; KORPELA D.M.; DUCKETT M.M.; BAKSH S.; MODIANO J.F. Nicotine-mediated signal modulate cell death and survival of T lymphocytes. Toxicol Appl Pharmacol. 242:299-309 (2010)

OLZMANN J.A.; RICHTER C.M. & KOPITO R.R. Spatial regulation of UBXD8 and p97/VCP controls ATGL-mediated lipid droplet turnover. Proc Natl Acad Sci USA 110:1345-1350 (2013)

O'NEILL L.A.; BOWIE A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. Nat. Rev. Immunol. 7:353-364 (2007)

O'RIORDAN J.M.; ABDEL-LATIF M.M.; RAVI N.; MCNAMARA D.; BYRNE P.J.; MCDONALD G.S.; KEELING P.W.; KELLEHER D.; REYNOLDS J.V. Proinflammatory cytokine and nuclear factor κ -B expression along the inflammation-metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. Am. J. Gastroenterol. 100:1257-1264 (2005).

OSIAS G.L.; BROMER M.Q.; THOMAS R.M.; FRIEDEL D.; MILLER L.S.; SUH B.; LORBER B.; PARKMAN H.P. & FISHER R.S. **Esophageal bacteria and Barrett's esophagus: a preliminary report.** *Dig Dis Sci.* 49:228–36 (2004).

OSTROWSKI J.; MIKULA M.; KARZMARSKI J.; RUBEL T.; WYRWICZ L.S.; BRAGOSZEWSKI P.; GAI P.; DADLEZ M.; BUTRUK E. & REGULA J. **Molecular defense mechanisms of Barrett's metaplasia estimated by an integrative genomics.** *J Mol Med (Berl.)*. 85:733–43(2007)

OVREVIK J.; REFSNES M.; LAG M.; HOLME J.A. & SCHWARZE P.E. **Activation of Proinflammatory Responses in Cells of the Airway Mucosa by Particulate Matter: Oxidant- and Non-Oxidant-Mediated Triggering Mechanisms.** *Biomolecules* 5(3):1399-1440 (2015)

OYAMA K.; FUJIMURA T.; NINOMIYA I.; MIYASHITA T.; KINAMI S.; FUSHIDA S. **A COX-2 inhibitor prevents the esophageal inflammation-metaplasia-adenocarcinoma sequence in rats.** *Carcinogenesis* 26:565-570 (2005)

PACHECO P.; BOZZA F.A.; GOMES R.N.; BOZZA M.; WELLER P.F.; CASTRO-FARIANETO H.C. & BOZZA P.T. **Lipopolysaccharide-induced leucocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism.** *J. Immunol.* 162:6498-6506 (2002)

PACHECO P.; VIERA-DE-ABREU A.; GOMES R.N.; BARBOSA-LIMA G.; WERMELINGER L.B.; MAYA-MONTEIRO C.M.; SILVA A.R.; BOZZA M.T.; PARKIN D.M., PISANE P. & FERLAY J. **Global cancer statistic.** *CA Cancer J. Clin.*49:33-64 (1999).

PANDILLA R.; KOTAPALLI V.; GOWRISCHANKAR S.; CHIGURUPATI M.V.; PATNAIK S.; UPPIN S.; RAO S.; KALIDINDI N.; REGULAGADDA S.; SUNDARAM C.; SRINIVASULU M.; VASALA A. & BASHYAM M.D. **Distinct genetic aberrations in oesophageal adeno and squamous carcinoma.** *Eur J Clin Invest* 43(12):1233-9 (2013)

PAYNE C.M. **Mitochondrial perturbation attenuates bile acid-induced cytotoxicity.** *Cell Biol. Toxicol.* 21:215-231 (2005)

PEI Z.; YANG L.; PEEK R.M. Jr.; LEVINE S.M.; PRIDE D.T. & BLASER M.J. **Bacterial biota in reflux esophagitis and Barrett's esophagus.** *World journal of gastroenterology* 11:7277–83 (2005).

PERA M.; PERA M.; DE BOLOS C.; BRITOS M.J.; PALACIN A.; GRANDE L.; CARDESA A.; POULSOM R. **Duodenal-content reflux into the esophagus leads to expression of CDX2 and MUC2 in áreas os squamous epithelium in rats.** *Gastrointest. Surg.* 11:869-874 (2007)

PHILLIPS R.W.; FRIEDSON H.F.; MOSKALUK C.A. **CDX2 as a marker of epithelial intestinal differentiation in the esophagus.** *Am. J. Surg. Pathol.* 27:1442-1447 (2003)

PINTO L.F.R.; ROSSINI A.M.T.; ALBANO R.M.; FELZENSZWALB I.; GALLO C.V.M.; NUNES R.A. & ANDREOLLO N.A. **Mechanism of esophageal cancer development in Brazilians.** *Mut Reaserc* 544:365-373 (2003).

PERRIER S. & JARDE T. **Adiponectin, an anti-carcinogenic hormone: a systematic review on breast, colorectal, liver and prostate cancer.** *Curr. Med. Chem.* 32:5501-5512 (2012)

PERSSON J., DEGERMAN E., NILSSON J. & LINDHOLIN M.W. **Perilipin and adipophilin expression in lipid loaded macrophages.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 363:1020–1026 (2007).

REICHELT U.; DUESEDAU P.; TSOURLAKIS M.C.; QUAAS A.; LINK B.C.; SCHURR P.G.; KAIFI J.T.; SAUTER G. **Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus.** *Mod. Pathol.* 20:120-129 (2007)

PATEL T.P.; RAWAL K.; SONI S. & GUPTA S. **Swertiamarin ameliorates oleic acid induced lipid accumulation and oxidative stress by attenuating gluconeogenesis and lipogenesis in hepatic steatosis.** *Biomed. Pharmacother.* 83:785-791 (2016)

PLOEGH H.L. **A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum.** *Nature* 448:435–38 (2007).

PLOTKOWSKI M.C.; BRANDAO B.A.; DE ASSIS M.C.; FELICIANO L.F.; RAYMOND B.; FREITAS C.; SALIBA A.M.; ZAHM J.M.; TOUQUI L. & BOZZA P.T. **Lipid body mobilization in the ExoU-induced release of inflammatory mediators by airway epithelial cells.** *Microb. Pathog.* 45:30-37 (2008)

POEHLMANN A.; KUESTER D.; MALFERTHEINER P.; GUENTHER T. & ROESSNER A. **Inflammation and Barrett's carcinogenesis.** *Pathol. Res. Pract.* 208:269-280

POL A.; LUETTERFORST R.; LINDSAY M.; HEINO S.; Ikonen E. & Parton R.G.. **A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance.** *J. Cell. Biol.* 152:1057–1070(2001).

PRETTO G.; GURKI R.R.; BINATO M.; NAVARINI D.; AGUIAR W.W. & MEURER L **Increase of epidermal growth factor receptor expression in progression of GERD, Barrett, and adenocarcinoma of esophagus.** *Dig. Dis. Sci.* 58:115-122 (2013)

PUISIEUX A.; LIM S.; GROOPMAN J. & OZTURK M. **Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens.** *Cancer Res.* 51: 6185 – 6189 (1991).

PUTZ A.; HARTMANN A.A.; FONTES P.R.O.; ALEXANDRE C.O.P.; SILVEIRA P.A.; KLUG S.J.; RABES H.M. **TP53 mutation pattern of esophageal squamous cell**

carcinomas in high risk areas (Southern Brazil): role of life style factors. *Int. J. Cancer* 98:99-105 (2002)

RAPOZO D.C.M. **Efeito da lesão térmica na carcinogênese esofágica.** Tese Doutorado em Biologia- Programa Biociências Nucleares-UERJ/CNPQ (2009)

RAKOFF-NAHOUM S. & MEDZHITOV R. **Toll-like receptors and cancer.** *Nat Rev Cancer* 9:57-63 (2009)

RENEHAN A.G.; TYSON M.; EGGER M.; HELLER R.F. & ZWAHLEN M. **Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies.** *Lancet* 371:569-578 (2008)

RICE T.W.; RUSCH V.W.; APPERSON-HANSEN C.; ALLEN M.S.; CHEN L.Q.; HUNTER J.G.; KESLER K.A.; LAW S.; LERUT T.E.; REED C.E.; SALO J.A.; SCOTT W.J.; SWISHER S.G.; WATSON T.J. & BLACKSTONE E.H. **Worldwide esophageal cancer collaboration.** *Dis Esophag.* 22:1-8 (2009)

ROSHANDEL G.; SEMNANI S.; MALEKZADEH R. & DAWSEY S.M. **Polycyclic aromatic hydrocarbons and esophageal squamous cell carcinoma.** *Arch IranMed.* 15(11): 713 – 722 (2012).

ROSSINI A.; SIMÃO T.A.; MARQUES C.B.; LIMA S.C.; HERBSTER S.; RAPOZO D.V.; ANDREOLLO N.A.; FERREIRA M.A.; EL-JAICK K.B.; TEIXEIRA R.; GUIMARÃES D.P.; ALBANO R.M.; PINTO L.F.R.P. **TP53 mutation profile of esophageal squamous cell carcinoma of patients from Southern Brazil.** *Mut. Rev.* 696:10-15 (2010)

ROUSSEAU M.C.; HSU R.Y.C.; SPICER J.D.; MCDONALD B.; CHAN C.H.F.; PERERA R.M.; GIANNIAS B.; CHOW S.C.; ROUSSEAU S.; LAW S. & FERRI L.E. **Lipopolysaccharide-induced toll-like receptor 4 signaling enhances the migratory ability of human esophageal cancer cells in a selectin-dependent manner.** *Surgery.* 154(1):69-77 (2013).

ROKKAS T.; PISTOLAS D.; SECHOPOULO P.;ROBOTIS I.;MARGANTINIS G. **Relationship between Helicobacter pylori infection and esophageal neoplasia: a meta-analysis.** *Clin. Gastroenterol. Hepathol* 5:1413-1417

RUBENSTEIN J.H.; DAHLKEMPER A.; KAO J.Y.; ZHANG M.; MORGENSTEIN H.; MCMAHON L. & INADOMI J.M. **A Pilot study of the association of low plasma adiponectin and Barrett's Esophagus.** *Am. J. Gastroenterol.* 103:1358-1364 (2008)

RUSSO P.; CARDINALE A.; MARGARITORA S.; CESARIO A. **Nicotinic receptor and tobacco-related cancer.** *Life Sci.* 91:1087-1092 (2012)

RUTEGARD M.; NORDENSTEDT H.; LU Y.; LAGERGREN J & LAGERGREN P. **Sex-specific exposure prevalence of established risk factors for oesophageal adenocarcinoma.** *Br. J. Cancer* 103:735-740 (2010)

- SAADI A. & FITZGERALD R.C. **Mechanisms underlying the progression of Barrett's oesophagus.** *Drug Disc. Today* 3:447-456 (2006)
- SCARFO L.M.; WELLER P.F. & FARBER H.W. **Induction of endothelial cell cytoplasmic lipid bodies during hypoxia.** *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280:294-301 (2001)
- SCHAAL C. & CHELLAPPAN S.P. **Nicotine-Mediated Cell Proliferation and Tumor Progression in Smoking-Related Cancers.** *Mol Cancer Res* 12:14-23 (2014).
- SCHAFFER J.E. **Lipotoxicity: when tissues overeat.** *Curr Opin Lipidol* 14:281–287 (2003).
- SCHLEMITZ S. & PFANNHAUSER W. **Supercritical fluid extraction of mononitrated polycyclic aromatic hydrocarbons from tea - correlation with PAH concentration.** *Z Lebensm Unters Forsch* 205(4):305–10 (1997).
- SCHOPPMANN S.F.; JESCH B.; FRIEDRICH J.; WRBA F.; SCHULTHEIS A.; PLUSCHNIG U.; MARESCH J.; ZACHERL J.; HEJNA M.; BIRNER P. **Expression of HER-2 in carcinomas of the esophagus.** *Am. J. Surg Pathol.* 34:1868-1873 (2010)
- SCHULLER H.M. **Is cancer triggered by altered signaling of nicotinic acetylcholine receptors?** *Nat. Rev Cancer* 9(3):195-205 (2009)
- SEPEHR A.; TNIERE P.; MARTEL-PLANCHE., ZIA A.A.; SAIDI F.; HAINAUT P. **Distinct pattern of TP53 mutations in squamous cell carcinoma of the esophagus in Iran.** *Oncogene* 20:7368-7374 (2001)
- SEQUIST L.V.; JOSHI V.A.; JANNE P.A.; BELL D.W.; FIDIAS P.; LINDEMAN N.I.; LOUIS D.N.; LEE J.C.; MARK E.J.; LONGTINE J.; VERLANDER P.; KUCHERLAPTI R.; MEYERSON M.; HARBER D.A.; JOHNSON B.E. & LYNCH T.J. **Epidermal growth factor receptor mutation testing in the care of lung cancer patient.** *Clin Cancer Res* 12:4403–4408 (2006).
- SERGINA N.V. & MOASSER M.M. **The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets.** *Trends Mol Med* 13:527–534 (2007).
- SHAHEEN N,J, & RICHTER J.E. **Barrett's oesophagus.** *Lancet* 373:850-861 (2009)
- SHAMMA A.; YAMAMOTO H.; DOKI Y.; OKAMI J.; KONDO M.; FUJIWARA Y =.; YANO M.; INOUE M.; MATSUURA N.; SHIOZAKI H. & MONDEN M. **Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus.** *Clin Cancer Res.* 6(4):1229-38 (2000)

SHARMA S.; STOLINA M.; YANG S.C.; BARATELLI F.; LIN J.F.; ATIANZAR K.; LUO J.; ZHU L.; LIN Y.; HUANG M.; DOHADWALA M.; BATRA R.K. & DUBINETT S.M. **Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function.** Clin Cancer Res. 9:961–8. 9 (2003).

SHARMA P. **Barrett's oesophagus.** N. Engl. J. Med. 361: 2548-2556 (2009)

SHARMA P., FALK G. W., WESTON A. P., REKER D., JOHNSTON M. & SAMPLINER R. E. **Dysplasia and cancer in a large multicenter cohort of patients with Barrett's esophagus.** Clin. Gastroenterol. Hepatol. 4:566–572 (2006).

SHEYHIDIN I.; NABI G.; HASIM A.; ZHANG R.P.; ANIWAER J.; MA H. & WANG H. **Overexpression of TLR3, TLR4, TLR7 and TLR9 in esophageal squamous cell carcinoma.** World J. Gastroenterol. 17:3745-3751 (2011)

SHI V.Y.; WU W.K. & CHU K.M. **Nicotine induces cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor receptor-2 in association with tumor associated invasion and angiogenesis in gastric cancer.** Mol Cancer Res 3:607-615 (2005).

SHIN V.Y.; WU W.K.K.; YE Y.N.; SO W.H.L.; KOO M.W.L.; LIU E.S.L.; LUO J.C. & CHO C.H. **Nicotine promotes gastric tumor growth and neovascularization by activating extracellular signal-regulated kinase and cyclooxygenase-2.** Carcinogenesis 25 (12):2487-2495 (2004)

SHIMADA Y.; IMAMURA M.; SHIBAGAKI I.; TANAKA H.; MIYAHARA T.; KATO M. & ISHIZAKI K. **Genetic alterations in patients with esophageal cancer with short- and long-term survival rates after curative esophagectomy.** Annals of Surgery 226:162-168 (1997) .

SHINOZAKI A., NAGAO T., ENDO H., KATO N., HIROKAWA M., MIZOBUCHI K., KOMATSU M., IGARASHI T., YOKOYAMA M., MASUDA S., SANO K., IZUMI M., FUKAYAMA M. & MUKAI K. **Sebaceous epithelial-myoeepithelial carcinoma of the salivary gland: Clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 6 cases of a new histologic variant.** American Journal of Surgical Pathology 32A:913–923 (2008).

SHIRVANI V.N.; OUATU-LASCAR R.; KAUR B.S.; OMARY M.B.; TRIADAFILOPOULOS G. **Cyclooxygenase 2 expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma: ex vivo induction by bile salts and acid exposure.** Gastroenterol 118:487-496 (2000)

SIMÃO T.A.; SIMOES G.L.; RIBEIRO F.S.; CIDADE D.A.; ANDREOLLO N.A.; LOPES L.R.; MACEDO J.M.; ACATAUASSU R.; TEIXEIRA A.M.; FELZENSZWALB I.; PINTO L.F.; ALBANO R.M. **Lower expression of p14ARF and p16 INK4 correlates with higher DNMT3B expression in human oesophageal squamous cell carcinomas.** Hum. Exp Toxicol 25:515-522 (2006)

SMITH W.L.; DEWITT D.L. & GARAVITO R.M. **Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology.** *Annu Rev Biochem.* 69:145–82 (2000)

SODHI C.P.; NEAL M.D.; SIGGERS R.; SHO S.; MA C.; BRANCA M.F.; PRINDLE T.; RUSSO A.M.; AFRAZI A.; GOOD M.; BROWER–SINNING R.; FIREK B.; MOROWITZ M.J.; OZOLEK J.A.; GITTES G.K.; BILLIAR T.R. & HACKAM D.J. **Intestinal Epithelial Toll-Like Receptor 4 Regulates Goblet Cell Development and Is Required for Necrotizing Enterocolitis in Mice.** *Gastroenterology* 143:708–718 (2012)

SOMA T.; KAGANOI J.; KAWABE Q.; KONDO K.; IMAMURA M. & SHIMADA Y. **Nicotine induces the fragile histidine triad methylation in human esophageal squamous epithelial cells.** *Int. J. Cancer* 119:1023-1027 (2006)

SONG S.; GUHA S.; LIU K.; BUTTAR N.S. & BRESALIER R.S. **COX-2 induction by unconjugated bile acids involves reactive oxygen species-mediated signalling pathways in Barrett’s oesophagus and oesophageal adenocarcinoma.** *Gut* 56:1512-1521 (2007)

SONG C.; ZENG X.; WANG Y.; SHI J.; QIAN H.; ZHANG Y.; FANG J.; SHENG X.; ZHENG J. & CHEN Y. **Sophocarpine Attenuates Toll-like Receptor 1 4 in Steatotic Hepatocytes to Suppress Pro-inflammatory Cytokines Synthesis.** *J. Gastroenterol Hepatol* 30(2)405-412 (2015)

SOUZA-CRUZ A.L. **Papel dos Corpúsculos Lipídicos Na Proliferação e Transformação Celular** 2004. 152 f. Tese (Doutorado) – Instituto Nacional do Câncer (2004).

SOUZA R.F.; KRISHNAN K. & SPECHLER S.T. **Acid, Bile, and CDX: the ABCs of making Barrett’s metaplasia.** *AM. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295:211-218 (2008)

SPECHLER S.J.; FITZGERALD R.C.; PRASAD G.A. & WANG K.K. **History, molecular mechanism, and endoscopic treatment of Barrett’s oesophagus.** *Gastroenterology* 198:854-869 (2010).

STEININGER H.; PFOFE D.A.; MULLER H. **Expression of CDX2 and MUC2 in Barrett’s mucosa.** *Pathol Res Pract* 2018:381-391 (2005)

STRAUB B.K.; GYOENGYOESI B.; KOENIG M.; HASHANI M.; PAWELLA L.M.; HERPEL E.; MUELLER W.; MACHER-GOEPFINGER S.; HEID H. & SCHIRMACHER P. **Adipophilin/perilipin-2 as a lipid droplet-specific marker for metabolically active cells and diseases associated with metabolic dysregulation.** *Histopathology* 62, 617–631 (2013)

STRAUB B.K.; STOEFFEL P.; HEID H.; ZIMBELMANN R. & SCHIRMACHER P. **Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and *De Novo* Perilipin expression in hepatocyte steatogenesis.** *Hepatology* 47:1936-1946 (2008).

SUN D.; WANG X.; GAI Z.; SONG X.; JIA X. & TIAN H. **Bile acids but not acidic acids induce Barrett’s esophagus.** *Int J Clin Exp Pathol* 8(2):1384-1392 (2015)

SUN Y.; WU C.; MAB J.; YANG Y.; MANC X.; WU H. & LI S. **Toll-likereceptor4 promotes angiogenesis in pancreatic cancer via PI3K/AKTsignaling.** *Experimental Cell Research* 347:274–282 (2016).

SYRJANEN K.J. **HPV infections and oesophageal cancer.** *J Clin Pathol* 55(10):721–8 (2002).

TAGHAVI N.; BIRAMIJAMAL F.. SOTOUDEH M., KHADEMI H.; MALEKZADEH R.; MOAVEN O.; MEMAR B.; ARABI A.; REZA M.; ABBASZADEGAN R. **p16 ink4 hypermethylation and p53, p16 and MDM2 protein expression in Esophageal Squamous Cell Carcinoma.** *BMC CANCER* 10:138-145 (2010)

TANSEY J.T.; SZTALRYD C.; GRUIA-GRAY J.; ROUSH D.L.; ZEE J.V.; GAVRILOVA O.; REITMAN M.L.; DENG C.X.; LI C., KIMMEL A.R. & LONDOS C. **Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6494–9 (2001).

TATSUTA T.; MUKAISHO K.; SUGIHARA H.; MIKA K.; TANI T.; TAKEDO M.M. **Expression of CDX2 in early GRCL of Barrett's esophagus induced in rats by duodenal reflux.** *Dig. Dis. Sci* 50:425-431 (2005)

TAKATORI H.; NATSUGOE S.; OKUMURA H.; MATSUMOTO M.; UCHIKADO Y.; SETOYAMA T.; SASAKI K.; TAMOTSY K.; OWAKI T.; ISHIGAMI S. & AIKOU T. **Cyclooxygenase-2 expression is related to prognosis in patients withesophageal squamous cell carcinoma.** *Eur. J. Surg. Oncol.* 4:397-402 (2008).

THOMPSON O.M.; BERESFORD S.A.A.; KIRKL E.A.; BRONNER M.P. & VAUGHAN T.L. **Serum Leptin and Adiponectin Levels and Risk of Barrett's Esophagus and Intestinal Metaplasia of the Gastroesophageal Junction.** *Obesity* 18, 2204–2211 (2010).

TRAN G.D., SUN X.D., ABNET C.C., FAN J.H., DAWSEY S.M., DONG Z.W., MARK S.D., QIAO Y.L. & TAYLOR P.R. **Prospective study of risk factors for esophageal and gastric cancers in the Linxian general population trial cohort in China.** *Int. J. Cancer* 113:456-463 (2005).

TROMBINO S.; CESARIO A.; MARGARITORA S.; GRANONE P.; MOTTA G.; FALUGI C. & RUSSO P. **Alpha-7-Nicotinic acetylcholine receptors affect growth regulation of human mesothelioma cells: role of mitogenactivated protein kinase pathway.** *Cancer Res.* 64, 135–145 (2004).

TSUJII M.; KAWANO S.; TSUJI S.; SAEAOKA H.; HORI M. & DUBOIS R.N. **Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells.** *Cell.* 93:705–16 (1998)

TSUJII M. & DUBOIS R.N. **Alterations in cellular adhesions and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxidase synthase 2.** *Cell.* 83:493–501 (1995)

VALLBOHMER D.; DEMEESTER S.R.; PETERS J.H.; OH D.S.; KURAMOCHI H.; SHIMIZU D.; HAGEN J.A.; ADANENBERG K.D.; DANENBERG P.V.; DEMEESTER T.R. & CHANDRASOMA P.T. **CDX2 expression in squamous and metaplastic columnar epithelia of the esophagus.** *Dis. Esophagus* 19:260-266 (2006)

VAN DE WINKEL A.; MENKE V.; CAPELLO A.; MOONS L.M.; POT R.G.; VAN DEKKEN H.; SIERSEMA P.D.; KUSTERS J.G.; VAN DER LAAN L.J.; KULPERS E.J. **Expression, localization and polymorphisms of the nuclear receptor PXR in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma.** *BMC Gastroenterol* 11:108-118 (2011)

VANINETTI N.; WILLIAMS L.; GELDENHUYS L.; PORTER G.A.; GUERNSEY D.L. & CASSON A.G. **Regulation of CDX2 Expression in Esophageal Adenocarcinoma.** *Mol Carcinog* 48:965-974 (2009)

VERBEKE H.; GEBOES K.; VAN DAMME J. & STRUYF S. **The role of CXC chemokines in the transition of chronic inflammation to esophageal and gastric cancer.** *Biochim Biophys Acta.* 1825(1):117-29 (2012).

VIZCAINO A.P., MORENO V., LAMBERT R. & PARKIN D.M. **Time trends incidence of both major histologic types of esophageal carcinomas in selected countries, 1973-1995.** *Int. J. Cancer* 99:860-868 (2002).

WALTER T.C. & FARESE R.V. **Lipid Droplets and Cellular Lipid Metabolism.** *Annu. Rev. Biochem.* 81:687-714 (2012)

WANG D. & DUBOIS R.N. **Prostaglandins and cancer.** *Gut* 55:115-122 (2006).

WANG J.; JIA Y.; WANG N.; ZHANG X.; TAN B.; ZHANG G. & CHEG Y. The clinical significance of tumor-infiltrating neutrophils and neutrophil-to-CD8+ lymphocyte ratio in patients with resectable esophageal squamous cell carcinoma. ***J Transl Med.* 7:12-7 (2014)**

WANG J.S.; GUO M.; MONTGOMERY E.A.; THOMPSON R.E.; COSBY H.; HICKS L. **DNA promoter hypermethylation of p16 and APC predicts neoplastic progression in Barrett's esophagus.** *Am. J. Gastroenterol* 104:2153-2160 (2009).

WANG K.K. & SAMPLINER R.E. **Update guidelines 2008 for the diagnosis, surveillance and therapy of barrett's esophagus.** *Am. J. Gastroenterol.* 103:788-797 (2008)

WANG W.; NAG S.A. & ZHANG R. **Targeting the NFκB signaling pathways for breast cancer prevention and therapy.** *Curr Med Chem.* 22(2):264-89 (2015)

WAUGH D.J. & WILSON C. **The Interleukin-8 Pathway in Cancer.** *Clin Cancer Res* 14:6735-6741 (2008).

WELLER P.F.; RYEOM S.W.; PICARD S.T.; ACKERMAN S.J. & DVORAK A.M. **Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C.** *J Cell Biol* 113:137–146 (1991).

WESSLER I. & KIRKPATRICK C.J. **Acetylcholine beyond neurons: The nonneuronal cholinergic system in humans.** *Br J Pharmacol* 154:1558-71 (2008).

WIJNHOVEN B.P.L.; TILANUS H.W.; DINJENS W.N.M. **Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma.** *Ann. Sur.* 3:322-337 (2000)

WILD C.P. & HARDIE L.J. **Reflux, Barrett's oesophagus and adenocarcinoma: burning questions.** *Nat Rev Cancer* 3:676-684 (2003).

WINKEL A.; MENKE V.; CAPELLO A.; MOONS L.M.G; POT R.G.J; DEKKEN H.; SIERSEMA P.D.; KUSTERS J.G.; LAAN L.J.W. & KUIPERS E.J. **Expression, localization and polymorphisms of the nuclear receptor PXR in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma.** *BMC Gastroenterol.* 11:108-115 (2011)

WHITEMAN D.C; SADEGHI S.; PANDEYA N.; SMITHERS B.M.; GOTLEY D.C.; BAIN C.J.; WEBB P.M.; GREEN A.C.; AUSTRALIAN CANCER STUDY. **Combined effects of obesity, acid reflux and smoking on the risk of adenocarcinomas of the esophagus.** *Gut* 2:173-180 (2008)

WOLINS N.E.; BRASAEMLE D.L. & BICKEL P.E. **A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins.** *FEBS Lett* 580:5484–91 (2006).

WU A.H.; WAN P. & BERNSTEIN L. **A multiethnic population-based study of smoking, alcohol and body size and risk of adenocarcinomas of the stomach and esophagus (United States).** *Cancer Causes Control* 12(8):721–32 (2001).

WU J.; GONG J.; GENG J.; SONG Y. **Deoxycholic acid induces the overexpression of intestinal mucin, MUC2, via NF- κ B signaling pathway in human esophageal adenocarcinoma cells.** *BMC Cancer* 8:333 (2008)

WU T.; ZHANG W.; YANG G.; LI H.; CHEN Q.; SONG R. & ZHAO L. **HMGB1 overexpression as a prognostic factor for survival in cancer: a meta-analysis and systematic review.** *Oncotarget* 7(31) 50417- 50427 (2016)

WU W.K.K.; SUNG J.J.Y.; LEE C.W.; YU J. & CHO C.H. **Cyclooxygenase-2 in tumorigenesis of gastrointestinal cancers: An update on the molecular mechanisms.** *Cancer Letters* 295:7–16 (2010)

YANG L.; CHAUDHARY N.; BAGHDADI J. & PEI Z. **Microbiome in Reflux Disorders and Esophageal Adenocarcinoma.** *Cancer J.* 20(3): 207–210 (2014).

YE M.; GU X.; HAN Y.; JIN M. & REN T. Gram-negative bacteria facilitate tumor outgrowth and metastasis by promoting lipid synthesis in lung cancer patients. **J Thorac Dis 8(8):1943-1955 (2016)**

YILDIZ B.O.; SUCHARD M.A.; WONG M.L.; MCCANN S.M. & LICINIO J.Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. Proc Natl Acad Sci U S A. 28:10434-10439 (2004)

YOUSEF F.; CARDWELL C.; CANTWELL M.M.; GALWAY K.; JOHNSTON B.T. & MURRAY L. The incidence of esophageal cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: A systematic review and meta-analysis. Am. J. Epidemiol. 168: 237–249 (2008).

YUAN X.; ZHOU Y.; WANG W.; LI J.; XIEL G.; ZHAO Y.; XU D. & SHEN L. Activation of TLR4 signaling promotes gastric cancer progression by inducing mitochondrial ROS production. Cell Death and Disease 4:1-10 (2013).

YU W.; BOZZA P.T.; TZIZIK D.M.; GRAY J.P.; CASSARA J.; DVORAK A.M. & WELLER P.F. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A₂ at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. Am. J. Pathol. 152:759-769 (1998)

YU W.; CASSARA J. & WELLER P.F. Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. Blood 95:1078–1085 (2000).

XU G., SZTALRYD C., LU X., TANSEY J.T., GAN J., DORWARD H., KIMMEL A.R. & LONDOS C. Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway. J Biol Chem 280:42841–7 (2005).

XU W.; LIU Z.; BAO Q. & QIAN Z. Viruses, Other Pathogenic Microorganisms and Esophageal Cancer. Gastrointest Tumors 2:2–13 (2015)

ZHANG D.D.; ZHANG J.G.; WU X.; LIU Y.; GU S.Y.; ZHU G.H.; WANG Y.Z.; LIU G.L. & LI X.Y. Nuciferine downregulates Per-Arnt-Sim kinase expression during its alleviation of lipogenesis and inflammation on oleic acid-induced hepatic steatosis in HepG2 cells. Front Pharmacol. 21(6) 238 (2015).

ZHAO F.C.V.; SAYEGH C.E.; WANG I.M.; YANG X. & ZHANG B. Molecular and genetic inflammation networks in major human diseases. Mol Biosyst. 12(8):2318-41 (2016).

ZHAO L.; NIL Y.; MA X.; ZHAO A.; BAO Y.; LIU J.; CHEN T.; XIE G.; PANEE J.; SU M.; YU H.; WANG C.; HU C.; JIAL W. & JIAL W. A panel of free fatty acid ratios to

predict the development of metabolic abnormalities in healthy obese individuals. Scientific Reports 6:28418 (2016)

ZHONG Y.; ZHANG S.T. & ZHU S.T. **Nicotine enhances migration and invasion of human esophageal squamous carcinoma cells which is inhibited by nimesulide.** World J. Gastroenterol 20:2500-2505 (2009)

ZIMMERMANN K.C.; SARBIA M.; WEBER A.A.; BORCHARD F.; GABBERT H.E. & SCHOR K. **Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma.** Cancer Res. 59:198-204 (1999)