



REVISTA DE MEDICINA



Departamento Científico do Centro Acadêmico Oswaldo Cruz - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Rev Med (São Paulo) 2000 abr./dez.;79(2-4):36-94

<http://www.revistademedicina.com.br>

ISSN 0034-8554

XVIII/XIX COMU

Avaliação da ocorrência de apoptose em células foliculares da tiróide de rato após estimulação seguida de supressão do hormônio tireotrófico endógeno

Genética do câncer colorretal

Estudo dos efeitos da poluição atmosférica na mortalidade neonatal e fetal na Cidade de São Paulo

Comparação entre as pressões portal e da veia hepática ocluída no transplante de fígado

Manifestação intestinal rara em paciente com imunodeficiência comum variável e estrogiloidíase

REVISTA DE MEDICINA

Departamento Científico do Centro Acadêmico Oswaldo Cruz
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<http://www.revistademedicina.com.br>
e-mail: revistademedicina@caoc.org.br

ISSN 0034-8554

Fundada em 1916

A Revista de Medicina é indexada na Base de Dados LILACS.

Faculdade de Medicina (desde 1912)

Diretor: Prof. Dr. Giovanni Guido Cerri
Vice-Diretor: Prof. Dr. Yassuhiko Okay

Universidade de São Paulo (desde 1934)

Reitor: Adolpho Jose Melfi
Vice-Reitor: Hélio Nogueira da Cruz

Conselho Consultivo

Prof. Dr. Aldo Junqueira R. Junior
Prof. Dr. Antonio Atilio Laudanna
Prof. Dr. César Timo-laria
Prof. Dr. Dario Birolini
Prof. Dr. Gabriel Wolf Oselka
Prof. Dr. Joaquim José Gama Rodrigues

Prof. Dr. Luiz Carlos da C. Gayotto
Prof. Dr. Paulo Hilario N. Saldiva
Prof. Dr. Raul Marino Junior
Prof. Dr. Ricardo Nitrini
Prof. Dr. Fulvio Pilleggi
Prof. Dr. Gerhard Malnic
Prof. Dr. Guilherme Rodrigues da Silva

Prof. Dr. György Miklós Böhm
Prof. Dr. Luiz Venére Décourt
Prof. Dr. Mario Ramos de Oliveira
Prof. Dr. Noedir A. G. Stolf
Prof. Dr. Vicente Amato Neto
Prof. Dr. Wilson Cossermelli

Corpo Editorial

André Luiz Simião
Daniela Lima de Jesus
Flávio Cabral de F. Amaral
Giordano Ribeiro da Silva
Alberto Dela Vega
Carlos A. Batagello
Syro Maiuri Teixeira da Silva
André Fernandes Pires
Erika Mendonça de Moraes
Rodrigo Bono Fukushima

Diretoria do Departamento Científico - Gestão 2003 (Fundado em 1931)

Presidente: Fabrício Lopes da Fonseca
Vice-Presidente: Caio Lamunier de Abreu Camargo
1º Tesoureiro: Henrique Faria Braga
2º Tesoureiro: Giordano Ribeiro da Silva

Diretoria de Cursos: Aparecido Nakano Martins, André Luiz Simião, Conrado Eduardo Foelker, Daniela Lima de Jesus, Edna Harumi Goto, João Paulo de Santanna Pinto, Lívia Delgado

Diretoria de Informática: Rodrigo Bono Fukushima, Giordano Ribeiro da Silva

Diretoria de Revista: André Luiz Simião, Daniela Lima de Jesus, Flávio Cabral de F. Amaral, Giordano Ribeiro da Silva, Alberto Dela Vega, Carlos A. Batagello, Syro Maiuri Teixeira da Silva

Diretoria de Extensão Universitária: Adriana Coracini Tonacio, Aparecido Nakano Martins, Conrado Eduardo Foelker, Ivam Pereira Mendes Neto, Lívia Delgado

Normalização, editoração e indexação: Serviço de Biblioteca e Documentação da FMUSP - Seção de Preparo e Divulgação de Publicações (Suely Campos Cardoso, Fabíola Rizzo Sanchez e Eliane Ap. Souza Cruz), Serviço de Documentação e Divulgação Técnico-Científicas (Maria Aparecida de L. Castro Santos)

Distribuição: para Bibliotecas e Centros de Documentação em caráter de Doação e Permuta através do Serviço de Biblioteca e Documentação da FMUSP - Seção de Preparo e Divulgação de Publicações (e-mail: publish@biblioteca.fm.usp.br).

Tiragem: 2.000 exemplares.

Professores Titulares da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Giovanni Guido Cerri Diretor
Prof. Dr. Yassuhiko Okay Vice-Diretor
Prof. Dr. Alberto Rosseti Ferraz Titular da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço
Prof. Dr. Aldo Junqueira Rodrigues Junior - Chefe do Depto. de Cirurgia
Prof. Dr. Aroldo Miniti Chefe do Depto. de Oftalmologia e Otorrinolaringologia
Prof. Dr. Dalton de Alencar Fischer Chamone Chefe do Depto. de Clínica Médica
Prof. Dr. Dário Birólini Titular da Disciplina de Cirurgia Geral e do Trauma
Prof. Dr. Eder Carlos Rocha Quentão Titular da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia
Prof. Dr. Eduardo Massad Titular da Disciplina de Informática Médica
Profa. Dra. Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfá Titular do Depto. de Reumatologia
Prof. Dr. Erasmo Magalhães Castro de Tolosa Titular da Disciplina de Técnica Cirúrgica
Prof. Dr. Euclides Ayres de Castilho – Chefe do Depto. de Medicina Preventiva
Prof. Dr. Evandro Ararigbóia Rivitti Chefe do Depto. de Dermatologia
Prof. Dr. Flávio Adolfo Costa Vaz Chefe do Depto. de Pediatria
Prof. Dr. Francisco Vargas Suso Titular do Depto. de Cárdio-Pneumologia
Profa. Dra. Gilka J. F. Gattás - Chefe do Depto. de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho
Prof. Dr. György Miklós Böhm Titular do Depto. de Patologia
Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco Chefe da Disciplina de Emergências Clínicas
Prof. Dr. João Gilberto Maksoud Titular da Disciplina de Cirurgia Pediátrica
Prof. Dr. Joaquim José Gama-Rodrigues Titular do Depto. de Gastroenterologia
Prof. Dr. Jorge Elias Kalil Filho - Titular da Disciplina de Imunologia Clínica
Prof. Dr. José Antônio Franchini Ramires Titular do Depto. de Cárdio-Pneumologia
Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti Titular da Disciplina de Ginecologia
Prof. Dr. José Eluf Neto Titular do Depto. de Medicina Preventiva
Prof. Dr. Jose Otávio Costa Auler Junior Titular da Disciplina de Anestesiologia
Prof. Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado Titular do Depto. de Cirurgia
Prof. Dr. Marcello Marcondes Machado - Titular da Disciplina de Nefrologia
Prof. Dr. Marcelo Zugaib Chefe do Depto. de Obstetrícia e Ginecologia
Prof. Dr. Marco Martins Amatuzzi Chefe do Depto. de Ortopedia e Traumatologia
Prof. Dr. Marco Segre Titular do Depto. de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho
Prof. Dr. Marcos Boulos Titular da Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias
Prof. Dr. Marcus Castro Ferreira Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica e Queimaduras
Profa. Dra. Maria Aparecida Shikanai Yasuda Titular da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Profa. Dra. Maria Irma Seixas Duarte Titular do Depto. de Patologia
Prof. Dr. Maurício Rocha e Silva Titular do Depto. de Cárdio-Pneumologia
Prof. Dr. Milberto Scaff - Chefe do Depto. de Neurologia
Prof. Dr. Milton de Arruda Martins - Titular da Disciplina de Clínica Geral
Prof. Dr. Newton Kara José Titular do Depto. de Oftalmologia e Otorrinolaringologia
Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva Titular do Depto. de Patologia
Prof. Dr. Pedro Puech Leão Titular da Disciplina de Cirurgia Vasculare Periférica
Prof. Dr. Raul Marino Junior - Chefe do Depto. de Cirurgia
Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani Titular do Depto. de Radiologia
Prof. Dr. Sami Arap – Titular da Disciplina de Urologia
Prof. Dr. Sérgio Almeida de Oliveira - Titular da Disciplina de Cirurgia Cárdio-Torácica
Prof. Dr. Silvino Alves de Carvalho Chefe do Depto. de Moléstias Infecciosas e Parasitárias
Prof. Dr. Valentim Gentil Filho Titular do Depto. de Psiquiatria
Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz Titular do Depto. de Psiquiatria
Prof. Dr. Yassuhiko Okay - Titular do Depto. de Pediatria
Prof. Dr. Zacaria Borge Ali Ramadam Chefe do Depto. de Psiquiatria

Editorial	i
Avaliação da ocorrência de apoptose em células foliculares da tiróide de rato após estimulação seguida de supressão do hormônio tireotrófico endógeno Dani Ejzenberg, Edna Teruko Kimura.....	36
Genética do Câncer Colorretal Guilherme Cutait de Castro Cotti, Fábio Pires de Souza Santos, Fernando Moreno Sebastianes, Angelita Habr-Gama, Victor Edmund Seid, Rodrigo Bronze de Martino.....	45
Comparação entre as pressões portal e da veia hepática ocluída no transplante de fígado Marília D'Elboux Guimarães Brescia, Paulo Celso Bosco Massarollo.....	65
Manifestação intestinal rara em paciente com imunodeficiência comum variável e estrogiloidíase Cristina Helena Prado Kobata, Murilo Catafesta das Neves, Francisco Salles Collet e Silva, Pedro Francisco G. Bianchi Jr, Simone Elisa Dutenhefner, Elza Hissako Kanashiro.....	73
Estudo dos efeitos da poluição atmosférica na mortalidade neonatal e fetal na cidade de São Paulo, Brasil Daniel Cuba Nishioka, Fernando Luiz Barbério Coura, Gleice Margarete de Souza Conceição.....	81
Índice de Autor	90
Índice de Assunto	91
Orientação aos colaboradores	

Editorial.....i

Evaluation of apoptosis occurrence in the thyroid follicular cells of rat after stimulation followed by suppression of endogenous thyrotrophic hormone
Dani Ejzenberg, Edna Teruko Kimura..... 36

Genetics of colorectal cancer
Guilherme Cutait de Castro Cotti, Fábio Pires de Souza Santos, Fernando Moreno Sebastianes, Angelita Habr-Gama, Victor Edmund Seid, Rodrigo Bronze de Martino..... 45

Confrontation between portal pressure and wedged hepatic venous pressure after liver transplantation
Marília D'Elboux Guimarães Brescia, Paulo Celso Bosco Massarollo..... 65

Uncommon gastrointestinal manifestation in immunodeficient patient's report case
Cristina Helena Prado Kobata, Murilo Catafesta das Neves, Francisco Salles Collet e Silva, Pedro Francisco G. Bianchi Jr, Simone Elisa Dutenhefner, Elza Hissako Kanashiro..... 73

Study of the effects of air pollution in both neonatal mortality and late fetal losses in the city of São Paulo, Brazil
Daniel Cuba Nishioka, Fernando Luiz Barbério Coura, Gleice Margarete de Souza Conceição..... 81

Author Index..... 90

Keywords Index..... 93

Instructions to authors

Editorial

Rev Med (São Paulo) 2000 abr./dez.;79(2/4)i.

A presente edição vem confirmar o estreito laço que se formou entre a Revista de Medicina e o Congresso Médico Universitário. No entanto, este número difere de exemplares passados quanto ao conteúdo de artigos médico-acadêmicos. O incêndio ocorrido no subsolo da Faculdade de Medicina da USP, em meados de 1999, acarretou na perda de significativos artigos vencedores dos Prêmios Oswaldo Cruz e Monografias. O Departamento Científico esforçou-se ao máximo para reaver estes artigos, mas apenas dois destes foram recuperados, o vencedor do Prêmio Monografias e o vencedor da Área básica do Prêmio Oswaldo Cruz.

Os artigos vencedores de 2000 passaram por um processo de seleção, tendo em vista o formato especial desta edição, que engloba trabalhos tanto do COMU de 1999 quanto de 2000. Os demais artigos vencedores e os de menção-honrosa serão publicados em edições posteriores da Revista de Medicina.

A publicação destes artigos, que versam sobre os mais variados temas da Medicina, é de importância inestimável, visto que a pesquisa científica exerce papel fundamental na formação acadêmica.

Agradecemos àqueles que tornaram possível a publicação desta edição, em especial aos Professores Doutores Carlos Augusto Pasqualucci, Geraldo Lorenzi, Antônio Carlos Seguro, Alfredo Mansur, Yassuhiko Okay, Paulo Hilário Nascimento Saldiva e Marcello Marcondes Machado, a todo Departamento de Patologia e à Biblioteca da Faculdade de Medicina da USP. Ao valorizar os trabalhos científicos desenvolvidos pelos estudantes de medicina, esses colaboradores tornam a Revista de Medicina uma publicação de destaque na área médico-acadêmica.

Daniela Lima de Jesus

André Luiz Simião

Editores-chefes da Revista de Medicina

Avaliação da ocorrência de apoptose em células foliculares da tiróide de rato após estimulação seguida de supressão do hormônio tireotrófico endógeno*

Evaluation of apoptosis occurrence in the thyroid follicular cells of rat after stimulation followed by suppression of endogen thyreotropic hormone*

Dani Ejzenberg** Edna Teruko Kimura***

Ejzenberg D, Kimura ET. Avaliação da ocorrência de apoptose em células foliculares da tiróide de rato após estimulação seguida de supressão do hormônio tireotrófico endógeno. Rev Med (São Paulo) 2000 abr./dez.;79(2/4):36-44.

RESUMO: Objetivo. Neste estudo foram modulados os níveis de TSH hipofisário de ratos por tratamento farmacológico in vivo, para avaliação da possível perda celular por apoptose durante a involução da glândula tiróide por supressão de TSH. **Métodos.** Ratos Wistar machos (~220g peso corporal pc) foram tratados com metimazol (MTZ) 0,03% na água de beber por três semanas. Após este período receberam tiroxina (T4) 20 mg/100 g pc/dia intraperitonealmente por 1(T4-1d), 2 (T4-2d), 3 (T4-3d) e 5 (T4-5d) dias e o grupo controle (MTZ) sem tratamento com T4. Foi realizada a quantificação de DNA para verificação da perda celular e o valor obtido na A595 no espectrofotômetro foi comparada à curva padrão de DNA de esperma de salmão. **Resultados.** O peso da tiróide (T)/100g de pc do animal e os valores de DNA calculados em mg/100 g de pc, Média \pm SE, e a variação da quantidade de DNA (%) em comparação ao grupo MTZ. Na análise morfológica do tecido à microscopia óptica e eletrônica (MO e ME), os folículos dos ratos tratados com MTZ apresentam tirócitos altos com lúmens fechados e se observam reaparecimento gradativo dos lúmens e redução variada da altura das células nos tecidos com tratamento com T4. Em alguns lúmens, dos grupos tratados com T4 nota-se a presença de estruturas eletrondensas contendo resíduos de organelas, sendo mais frequente nos tratamentos prolongados. Na região basal dos folículos aparecem esporadicamente células envolvendo fragmentos densos contendo cromatina intensamente condensada e resíduos de organelas (corpos apoptóticos) ou ainda células com cromatina condensada em meia-lua (células apoptóticas) nos grupos que receberam tratamento com T4. **Conclusão.** Nas tiróides dos animais tratados com T4 ocorre redução de DNA e observam-se estruturas morfológicas de apoptose à MO e ME. A perda celular por processo de apoptose contribui juntamente com a hipoplasia das células foliculares na involução da glândula tiróide de ratos submetidos a supressão de TSH.

DESCRITORES: Ratos Wistar; Estudos de avaliação; Apoptose/efeitos de drogas; Tirotropina/análise; Supressão; Hormônios tireoidianos/análise.

INTRODUÇÃO

A apoptose é um processo de deleção celular, com caracterização morfológica típica, que pode ocorrer fisiologicamente e em algumas condições patológicas^{10,13,22,32,41}. Atualmente seu estudo tem

ganhado importância na medida em que este processo está envolvido na etiopatogenia das doenças auto-imunes tireoidianas (Doença de Graves e Tireoidite de Hashimoto), nos tumores tireoidianos, na gênese

* Prêmio Oswaldo Cruz (Área Básica) - COMU, 1999.

** Acadêmico da FMUSP.

*** Prof^a Dra. do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Depto. de Histologia e Embriologia (orientadora).

do diabetes mellitus, na Doença de Alzheimer e na morfogênese dos animais e do homem^{5,6,11,16,17,21,24,25,33,36-38,45,52,57,58}. À microscopia óptica e eletrônica o núcleo da célula em apoptose pode ter aspecto inicial em meia-lua, falciforme, navicular ou de corpo arredondado e denso. Já o citoplasma apresenta-se diminuído de volume e igualmente condensado. Na evolução do processo o núcleo pode sofrer ruptura com confinamento dos fragmentos nucleares picnóticos ("budding phenomenon"), ou ainda apresentar-se extremamente compactado e reduzido de tamanho. A apoptose termina com a perda das junções intercelulares sendo então a célula fagocitada por macrófagos ou englobada pelas células adjacentes^{39,47,55}. Sob aspecto bioquímico a apoptose decorre da ação de endonucleases, que determinam a fragmentação do DNA, de proteases que rompem o citoesqueleto e provocam a redução do volume celular; e de transglutaminases que originam o "cross-linking" de proteínas citoplasmáticas^{2,3,4,14,15,23,29,30,35,48,56,60}.

Nos últimos anos houve grande interesse na comprovação da presença e caracterização de células apoptóticas nos tecidos de órgãos humanos e de animais, empregando diferentes métodos^{9,27,43,53,55}. Em glândulas dependentes de estímulo hormonal tais como córtex-adrenal, ovário, útero, mama e próstata foram observadas células apoptóticas na supressão de seus respectivos hormônios tróficos^{9,27,43,53,55}. Na glândula tireóide os conhecimentos sobre a ocorrência de apoptose em humanos e animais são muito limitados. Foi constatada a ocorrência do processo apenas em culturas celulares tireoidianas *in vitro* porém há evidências indiretas de que o evento apoptótico possa ocorrer nesta glândula^{7,8,12,18,19,24,26,28,31,34,42,44,46,49,50,51,54,59}. Em humanos e animais há redução volumétrica e ponderal do órgão na supressão do hormônio tireotrófico (TSH) endógeno, não acompanhada de sinais do outro tipo de deleção celular, a necrose.

No presente estudo utilizamos um modelo experimental em que se promoveu inicialmente um crescimento da glândula tireóide por ação do TSH endógeno com emprego de metimazol (MTZ). Na sequência do experimento provocou-se uma redução ponderal e volumétrica da glândula por supressão do TSH, utilizando-se tiroxina (T_4). O objetivo do presente estudo foi verificar a ocorrência de apoptose na tireóide de ratos *in vivo*, nestas circunstâncias.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado um modelo experimental em tecido tireoidiano de ratos. Inicialmente procurou-se obter um aumento do volume/peso da tireóide através da

administração de MTZ por via oral. Esta droga provoca um aumento secundário do TSH produzido pela hipófise do animal por bloqueio da síntese de T_3 e T_4 . Secundariamente há incremento do TSH, reconhecido fator trófico da tireóide. Numa segunda etapa do protocolo foi induzida a supressão do TSH endógeno por administração intraperitoneal de T_4 , sendo que esta condição origina a hipotrofia da glândula. Neste experimento procurou-se comprovar esta hipotrofia evolutiva da tireóide através da dosagem de DNA. A avaliação da presença de células foliculares tireoidianas apoptóticas foi feita através da caracterização morfológica utilizando as microscopias óptica e eletrônica de transmissão.

I Animais e tratamento

Utilizamos 40 ratos machos da raça Wistar, criados no Biotério do Departamento de Histologia e Embriologia com peso de cerca de 220 g os quais foram tratados com água contendo 0,03% de Metimazol, *ad libidum*, por 3 semanas. Após este período 8 ratos não receberam nova medicação constituindo o grupo controle (GrMTZ). Os outros 32 receberam tiroxina (T_4) aplicada intraperitonealmente na dosagem de 20 mg/100g de peso corporal/24h por um período de 1, 2, 3 ou 5 dias constituindo os grupos T_4 -1d, T_4 -2d, T_4 -3d e T_4 -5d (com 8 ratos cada). Os 8 animais de cada grupo foram sacrificados para extração cirúrgica de suas tireóides no dia subsequente ao término do tratamento com T_4 , sendo que os 8 animais controle foram sacrificados após o tratamento com Metimazol. Os ratos foram previamente anestesiados com hidrato de cloral a 33% (0,1 ml/100 g de peso corpóreo) e perfundidos com 500 ml de solução salina a 0,9% por 10 minutos. Dez animais (2 de cada grupo T_4 e 2 do grupo MTZ) tiveram a tireóide analisada à microscopia eletrônica. Estes ratos foram previamente submetidos à perfusão adicional com glutaraldeído a 3% para fixação do tecido.

II - Dosagem de DNA

O tecido tireoidiano foi homogeneizado após adição de 1 ml de ácido perclórico 0,3 N, sendo então centrifugado a 3000 g por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi suspenso em ácido perclórico 1,5 N. Estas amostras foram incubadas em banho-maria a 80°C por 30 min. Após nova centrifugação coletou-se 0,9 ml de sobrenadante ao qual acrescentou-se sucessivamente 0,9 ml de ácido perclórico 1,5 N, 2 ml de solução de difenilamina 4% diluído em ácido acético glacial e 100 ml de solução de acetaldeído 0,2% gelado. Esta amostra foi incubada em banho-maria a 80°C por 2 horas. Concomitantemente foram preparadas amostras contendo DNA de esperma de salmão que serviram

para a elaboração da curva padrão. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro em A_{595} e a quantidade de DNA foi calculada baseando-se na curva-padrão. Para efeito de comparação foram dosados os conteúdos de DNA dos testículos dos ratos sacrificados.

Análise estatística

Foram realizadas análises de variância com um fator (tratamento) seguidas por comparações múltiplas pelo método de Tukey, sendo o nível de significância adotado $p < 0,05$. A suposição de homocedasticidade dos grupos foi satisfeita com transformação logarítmica dos dados. Foram construídas e comparadas as retas de regressão dos pesos das glândulas e do conteúdo de material nuclear dos diferentes grupos de tratamento.

III. Análise morfológica à microscopia óptica e eletrônica de transmissão

Microscopia óptica - Para os estudos histológicos empregando esta técnica os tecidos tireoidianos foram cortados e coletados em lâmina de vidro, previamente tratada com polilissina. Foi retirada a parafina por imersão em xilol, e reidratado em soluções de álcool 100%, 95%, 70% e lavagem em água corrente. A seguir os tecidos foram corados em soluções de hematoxilina de Harris por 5 minutos, seguida de coloração por eosina de Erlich por 2 min. Após rápida desidratação em soluções de álcool seguida de banhos em xilol os materiais foram cobertos com lamínula utilizando resina Enthellan. Os tecidos foram observados e analisados à microscopia de luz e documentados em fotos.

Microscopia eletrônica de transmissão

Para esta técnica os tecidos tireoidianos foram cortados e fixados em solução de Karnovsky, contendo 2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído em solução de cacodilato 0,1 M, seguida de pós-fixação em solução de ósmio 1%. Posteriormente o material foi desidratado por banhos sucessivos em soluções de álcool 50%, 70%, 90%, 95%, 100% e imersão em solução de óxido de propileno 100%. Os tecidos foram infiltrados em solução contendo resina e óxido de propileno na mesma proporção, e na sequência imersos em solução de resina onde foram incluídos em resina. O tecido fixado foi analisado em cortes semi-finos corados com solução de azul de metileno 2% e levado para observação à microscopia óptica quando foram delimitadas as áreas para a realização dos cortes finos. Após nova trimagem dos blocos os tecidos foram cortados em porções de 60

a 90 nm de espessura apoiadas em telas de cobre. Foram corados sucessivamente com soluções de acetato de uracila 5% e citrato de chumbo. Após a secagem, o material foi armazenado a 4°C até ser levado à observação em microscópio eletrônico de transmissão. Foram empregados os microscópios do Setor de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas e as imagens mais características foram documentadas em fotos.

RESULTADOS

1 - Amostra

Para efeito de resultados e análise estatística foram considerados 26 ratos do total de 30, pois 4 ratos morreram durante o experimento (2 dos grupos T_4 -2d e T_4 -5d e 2 do grupo T_4 -3d).

2 - Indução de hipotrofia tireoidiana

Os resultados relativos ao peso da tiróide em relação à massa corpórea de cada rato dos grupos controle e tratados com tiroxina estão colocados na Tabela 1. Foi observada uma relação decrescente nos pesos relativos da tiróide com o tratamento com tiroxina sendo a diferença significativa ($p < 0,05$) apenas entre o grupo T_4 -5d e os demais grupos.

Tabela 1 - Resultados das massas das tiróides em relação aos pesos corpóreos dos ratos dos grupos MTZ e T_4 (na unidade mg de tecido/100g de peso de rato).

Grupos	Gr MTZ n = 6	T4-1d n = 6	T4-2d n = 5	T4-3d n = 4	T4-5d n = 5
Massa tiróide/peso de rato	12,3 ± 4,0	12,1 ± 0,8	10,7 ± 0,3	8,7 ± 0,4	3,5 ± 0,3

3 - Dosagem de DNA

Os resultados relativos ao conteúdo total de DNA de cada tiróide em relação ao peso do animal estão colocados na Tabela 2. Foi observada uma redução na quantidade de DNA a partir do início do tratamento com tiroxina, porém a variação só foi significativa ($p < 0,05$) entre os grupos T_4 -5d e o grupo controle (Grupo MTZ). Os resultados comparativos entre a redução ponderal e do conteúdo de DNA podem ser encontrados no Gráfico 1. No Gráfico 2 podemos observar a relação do conteúdo de DNA da tiróide frente ao conteúdo de DNA do testículo do rato submetido aos mesmos estímulos porém sem resposta frente ao hormônio tireoidiano administrado.

Tabela 2 Resultados dos conteúdos totais de DNA das tiróides dos ratos dos grupos MTZ e T₄ (na unidade mg de DNA tiroidiano/100g de peso do rato) e variação percentual dos grupos T₄ em relação ao grupo MTZ.

Grupos	Gr MTZ (n = 6)	T4-1d (n = 6)	T4-2d (n = 5)	T4-3d (n = 4)	T4-5d (n = 5)
Massa					
Tiróide/peso de rato	36,0 ± 4,0	30,9 ± 1,9	29,5 ± 2,1	27,6 ± 2,4	22,9 ± 2,5
%Variação DNA		-14,2	-18,1	-23,4	-36,4

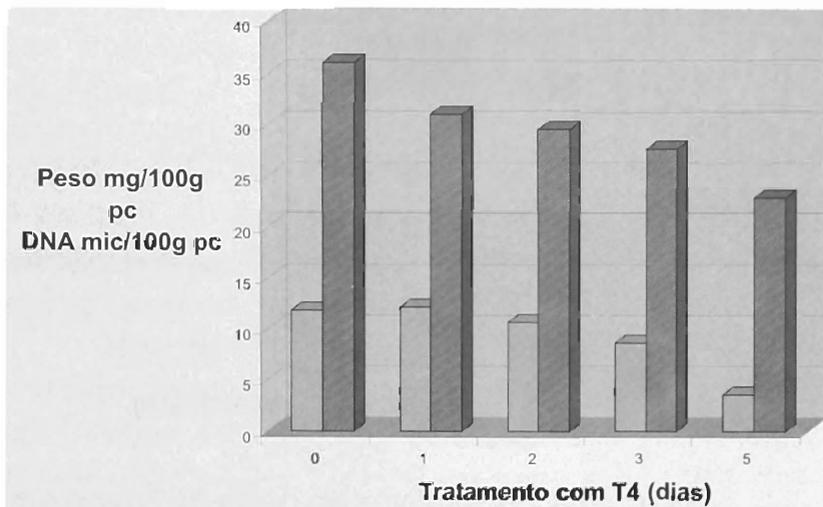


Gráfico 1 Evolução comparativa entre o peso e o conteúdo de DNA das glândulas tiróides.

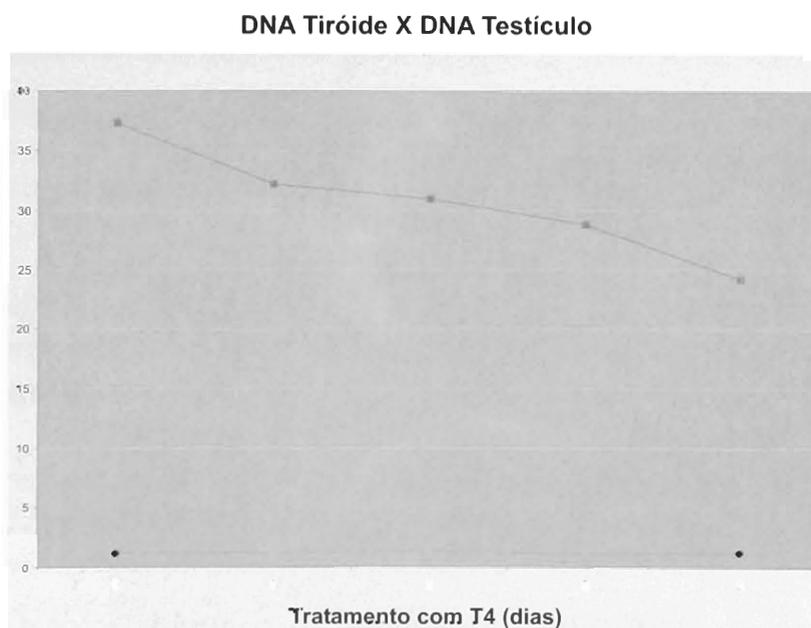


Gráfico 2 - Relação entre o conteúdo de DNA da tiróide e do DNA do testículo do rato.

4 - Análise morfológica dos tecidos tiroidianos à microscopia óptica e eletrônica de transmissão

Nos cortes histológicos do grupo MTZ observamos folículos com aumento na altura das células foliculares e lúmen reduzido em relação ao tecido tiroidiano não tratado (Figuras 1 e 2). Em

contraposição nos cortes dos grupos T₄ observamos uma abertura gradativa do lúmen folicular acompanhando a administração de tiroxina além da redução na altura dos tirócitos. Estes aspectos são mais visíveis em imagens dos grupos T₄-3d e T₄-5d (Figuras 3, 4 e 5). Nos cortes dos grupos tratados com tiroxina foram visualizadas células com núcleo condensado (inclusive em meia-lua), além da presença de massas contendo fragmentos nucleares e organelas citoplasmáticas (corpos apoptóticos) (Figuras 6 a 11). Estes aspectos característicos de apoptose foram observados na base dos folículos junto ao endotélio (corpos apoptóticos e células alteradas) e no lúmen (corpos apoptóticos). No grupo T₄-1d foram observados pequeno número de células com condensação nuclear, localizadas na base do folículo; nos grupos T₄-2d e T₄-3d temos o aparecimento de um maior número de células com morfologia semelhante às descritas no grupo anterior porém passamos a observar também massas de restos nucleares e citoplasmáticos nos lúmens foliculares e na base do folículo. No grupo T₄-5d não foram detectados alterações morfológicas características de apoptose. Não observamos nos cortes a presença de macrófagos, neutrófilos ou linfócitos.

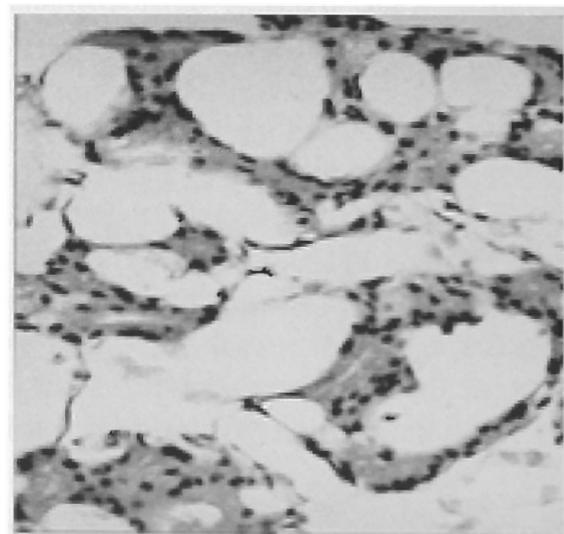


Figura 1 - Micrografia óptica de tiróide de rato normal. Aumento original: 20X.

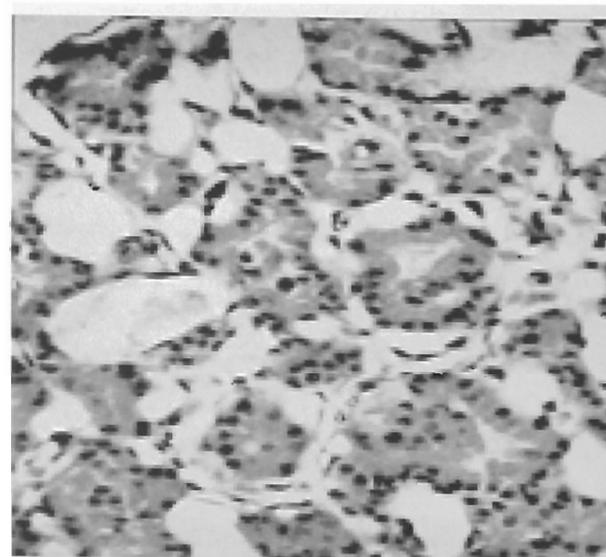


Figura 2 - Micrografia óptica de tiróide de rato tratado com MTZ. Aumento original: 20X.

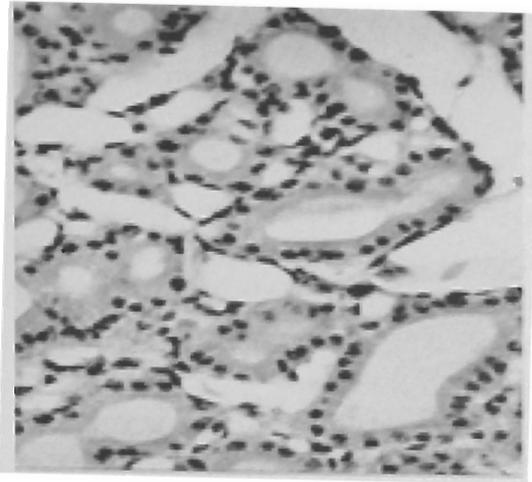


Figura 3 Micrografia óptica de tiróide de rato do grupo T4-1dia. Aumento original: 20X.

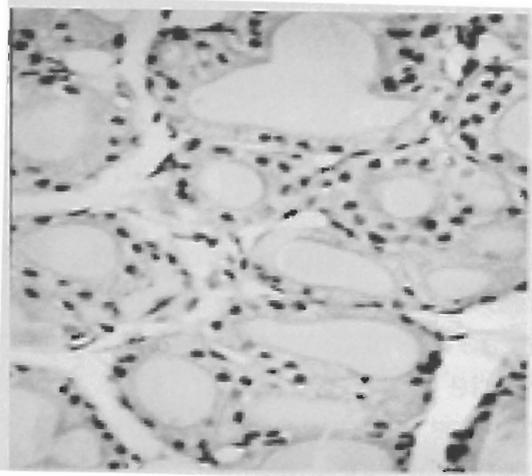


Figura 4 Micrografia óptica de tiróide de rato do grupo T4- 2 dias. Aumento original: 20X.

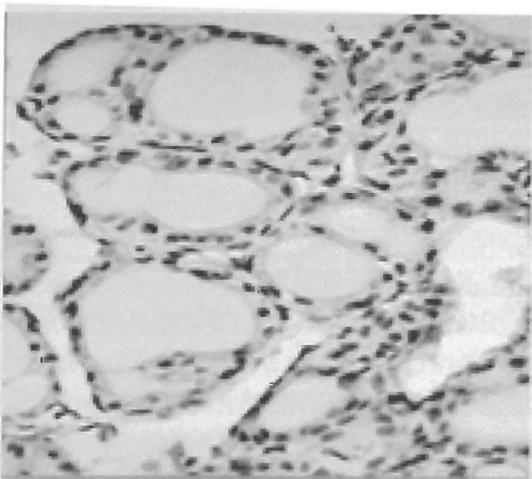


Figura 5 Micrografia óptica de tiróide de rato do grupo T4-3 dias. Aumento original: 20X.

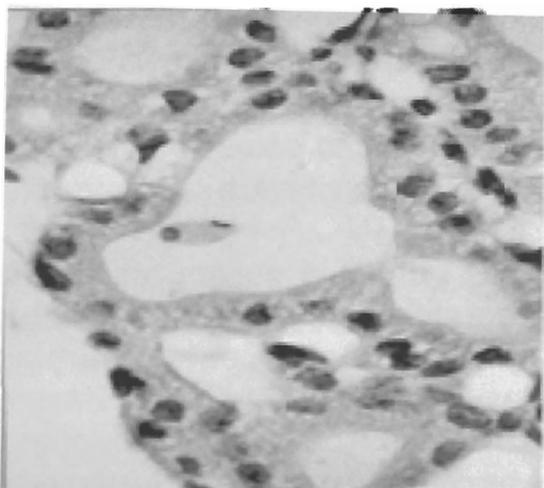


Figura 6 Micrografia óptica de tiróide de rato do grupo T4-1dia. Pode-se observar fragmentos nucleares condensados no lúmen envolvidos por membrana citoplasmática. Aumento original: 40X.

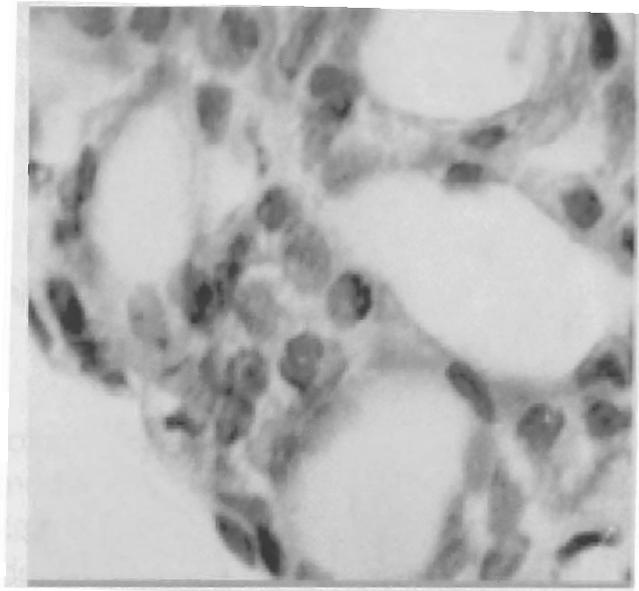


Figura 7 Micrografia óptica de tiróide de rato do grupo T4-3 dias. Nesta imagem tem-se célula folicular com núcleo condensado em meia-lua característico do evento apoptótico. Aumento original: 40X.

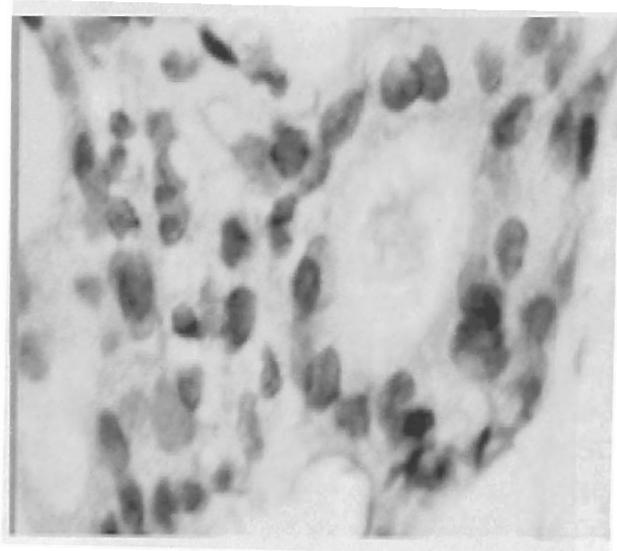


Figura 8 Micrografia óptica de tiróide de rato do grupo com T4-3 dias. Podemos visualizar célula folicular com condensação nuclear, evento inicial no processo apoptótico. Aumento original: 40X.

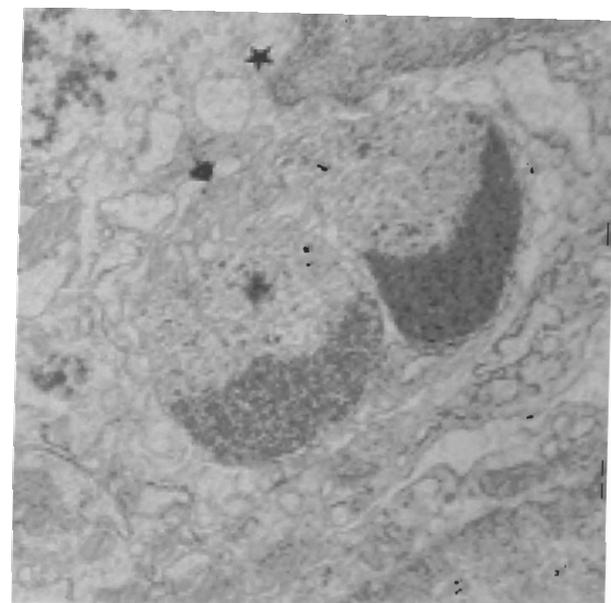


Figura 9 Elétron-micrografia de tiróide de rato do grupo T4-2 dias. Observa-se núcleo condensado em meia-lua característico do evento apoptótico. Aumento original: 9460X.

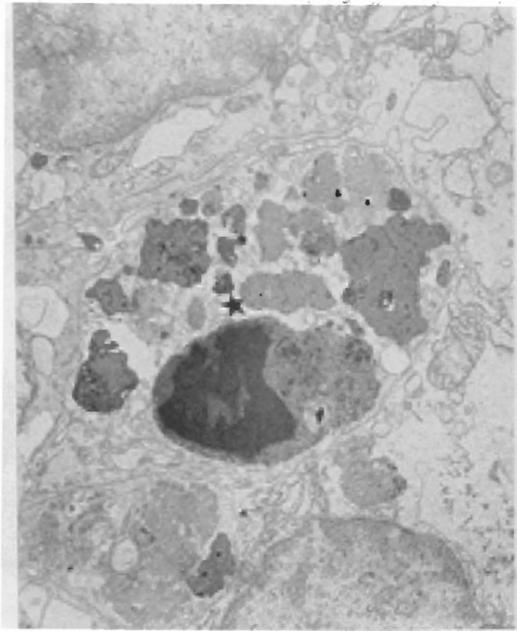


Figura 10 Elétron-micrografia de tiróide de rato do grupo T4-2 dias. Nesta foto pode-se observar um corpo apoptótico com integridade de membranas e núcleo condensado e fragmentado. Aumento original: 40X.

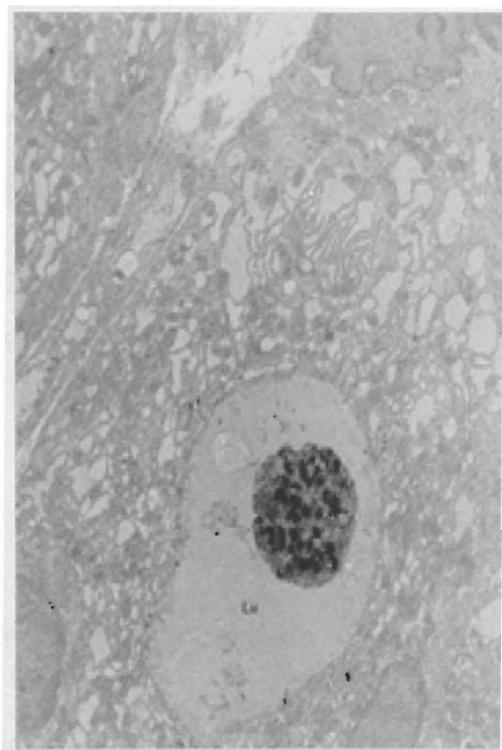


Figura 11 Elétron-micrografia de tiróide de rato do grupo T4-3 dias. Nesta imagem observa-se um aglomerado de material nuclear condensado juntamente com algumas organelas no lúmen. Aumento original: 40X.

DISCUSSÃO

A descrição inicial da apoptose tem mais de um século, porém sua implicação nos processos fisiológicos e patológicos assim como a natureza íntima deste processo de deleção celular não estão completamente esclarecidas.

Em nosso estudo um primeiro dado a ser analisado é a efetividade do modelo experimental na indução de hipotrofia tiroideana de ratos *in vivo*. Isto pôde ser comprovado no grupo tratado com T₄ por 5

dias, embora a tendência à hipotrofia seja manifesta nos grupos T₄-1d, T₄-2d e T₄-3d. A máxima redução da massa tiroideana que verificamos foi de 71% para o grupo T₄-5d.

A quantidade de DNA total da tiróide foi menor nos grupos T₄, em relação ao grupo MTZ, sendo significativa nos ratos do grupo T₄-5d onde a tiroxina foi utilizada por um período maior. Portanto, neste último grupo a diminuição da quantidade de material nuclear da glândula tiroide que verificamos- 36,4% é sinalizadora da ocorrência de um processo de deleção celular. Também a forte correlação constatada entre a redução do peso tiroideano e da quantidade de DNA total da glândula, na análise das retas de regressão, sugere a ocorrência de morte celular.

Recentemente foi comunicada a caracterização da apoptose na tiróide em um modelo *in vitro* utilizando células de cachorro. O presente estudo utilizou um modelo *in vivo* mais próximo do processo biológico normal e também encontrou à microscopia eletrônica células de morfologia apoptótica com redução do volume celular, condensação do material nuclear junto à carioteca, formação de corpos com restos nucleares e citoplasmáticos (corpos apoptóticos) e manutenção do sistema de membranas, sem sinais inflamatórios (os quais caracterizariam células necróticas).

Portanto constatamos uma regressão ponderal tiroideana em ratos vivos por deleção celular associada a características morfológicas apoptóticas na ausência de sinais inflamatórios. Estes dados indicam na direção de uma involução glandular determinada por apoptose, porém diversos outros fatores devem ser analisados conjuntamente.

Uma vez caracterizada a ocorrência de apoptose na tiróide dos ratos utilizados neste experimento devem ser consideradas três possibilidades: termos detectado um evento fisiológico, um processo induzido pelo modelo experimental ou uma associação dos dois anteriores. Acreditamos que frente à lenta renovação do tecido tiroideano e à grande velocidade do processo apoptótico (30 a 40 min) os achados de nosso estudo não refletem apenas um processo fisiológico casual e independente do modelo experimental desenvolvido⁵⁰ Em outros tecidos com alta taxa de renovação como o epitélio intestinal a apoptose pode ser constatada sem a necessidade de indução.

Outros pontos a serem abordados são a localização e o destino das células apoptóticas. À microscopia eletrônica estas células foram visualizadas na base de folículos íntegros ou no lúmen dos mesmos. A partir destas posições podemos inferir que as células próximas ao lúmen podem estar sendo englobadas por células vizinhas e as adjacentes à base do folículo estariam sendo fagocitadas por macrófagos da corrente sanguínea. Esta última via

poderia estar facilitada no modelo animal desenvolvido pela neovascularização que foi promovida na tiróide durante a estimulação com TSH endógeno. Porém não visualizamos a fagocitose nos cortes histológicos observados.

Por fim a análise conjunta dos achados à microscopia e do conteúdo total de DNA nos grupos de ratos tratados com tiroxina permitem uma avaliação da evolução do processo apoptótico na glândula tiróide frente ao modelo experimental utilizado. Observamos a seguinte evolução: do primeiro ao terceiro dia após a supressão do TSH endógeno com tiroxina são observadas células apoptóticas, progressivo aparecimento de restos celulares e concomitante redução do DNA total da glândula. No quinto dia de supressão (grupo T₄-5d) não foram detectadas alterações morfológicas características de apoptose porém a significativa redução de 36,4% no DNA total da glândula em relação ao grupo controle traduz uma

deleção celular significativa anterior. Estes fatos são indicadores indiretos da ocorrência do processo apoptótico num tempo inferior a 5 dias no modelo experimental adotado.

CONCLUSÃO

Os autores neste estudo caracterizaram morfológica e apoptose na glândula tiróide em um modelo animal *in vivo* através das microscopias óptica e eletrônica, e obtiveram como prova indireta a redução do material nuclear total da glândula na ausência de necrose celular. O modelo desenvolvido para o estudo do processo apoptótico nesta glândula foi adequado e poderá eventualmente ser utilizado para confirmação dos resultados verificados e aprimorado para outros estudos relacionados ao tema⁴⁰

Ejzenberg D, Kimura ET. Evaluation of apoptosis occurrence in the thyroid follicular cells of rat after stimulation followed by suppression of endogen thyrotrophic hormone. Rev Med (São Paulo) 2000 abr./dez.;79(2/4):36-44.

ABSTRACT: Objective. In this study, the levels of pituitary TSH in rats were modulated by pharmacological treatment *in vivo* to evaluate the possible cell loss through apoptosis during TSH suppression of thyroid gland. **Methods.** Male Wistar rats (~220gr body weight-bw) were given methimazole (MTZ) 0.03% in drinking water for three weeks. Then the animals received thyroxine (T₄) 20mg/100g bw/day ip for one (T₄-1d), two (T₄-2d), three (T₄-3d) or five (T₄-5d) days while the control group (MTZ) was not treated with T₄. After perfusion of the rats with physiologic serum (0.09%), the thyroids were surgically dissected and weighed. DNA were quantified to verify cell loss and the DNA value measured the spectrophotometer set at A₅₉₅ was compared to the normal curve of salmon sperm DNA. **Results.** The table show the thyroid weight (T) and the DNA concentration of T₄ treatment groups and the control group (MTZ). Mean ±SD. On the morphological analysis of the tissue by optical and electron microscopy (OM, EM), the follicles of the rats treated with MTZ present high tyrocytes with closed lumens with gradual reappearance of lumens and reduction of cell height were observed in the tissue of the groups treated with T₄. In some of their lumens, particularly in those subjected to prolonged treatment, electrondense structures containing cellular residue were seen. The fragments containing intensely condensed chromatin, cell structure residue (apoptotic bodies) or even cells with chromatin condensed in a half-moon shape (apoptotic cells) sporadically appear in the basal follicular region of the T₄ groups. **Conclusion.** In the thyroids of animals treated with T₄, there is a reduction of DNA and the presence of morphological structures suggesting apoptosis. In addition with the hypoplasia of the follicular cells, the cell loss by apoptotic process could be contributing to the shrinkage in the rat thyroid gland submitted to TSH suppression.

KEYWORDS: Rats, Wistar; Evaluation studies; Apoptosis/drugs effect; Thyrotropin/analysis; Suppression; Thyroid hormones/analysis

REFERÊNCIAS

1. Arscott PL, Baker JR Jr. Apoptosis and thyroiditis. Clin Immunol Immunopathol 1998;87(3):207-17
2. Arscott PL, Knapp J, Rymaszewski M, Bartron JL, Bretz JD, Thompson NW, et al. Fas (APO-1, CD95) mediated apoptosis in thyroid cells is regulated by a labile protein inhibitor. Endocrinology 1997;138(11):5019-27
3. Basolo F, Pollina L, Fontanini G, Fiore L, Pacini F, Baldanzi A. Apoptosis and proliferation in thyroid carcinoma: correlation with bcl-2 and p53 protein expression. Br J Cancer. 1997;75(4):537-41
4. Blasko I, Schmitt TL, Steiner E, Trieb K, Grubeck-Loebenstein B. Tumor necrosis factor alpha augments amyloid beta protein (25-35) induced apoptosis in human cells. Neurosci Lett 1997;238(1-2):17-20.
5. Branet F, Brousset P, Krajewski S, Schlaifer D, Selves J, Reed JC, et al. Expression of the cell

- a model for the physiological regulation of thyroid growth. *Oncogene* 1998;16(11):1455-65.
8. Di Jeso B, Ulianich L, Racioppi L, D'Armiento F, Feliciello A, Pacifico F, et al. Serum withdrawal induces apoptotic cell death in Ki-ras transformed but not in normal differentiated thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214(3):819-24.
 9. Donnini D, Zambito AM, Perrella G, Ambesi-Ampiombato FS, Curcio F. Glucose may induce cell death through a free radical-mediated mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;219(2):412-7
 10. Flemming W. Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugethiereiern beim Untergang Graaf'scher Follikel. *Arch Anat EntwGesch* 1885;221-44.
 11. Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, et al. Potential involvement of fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis [see comments] *Science* 1997; 275(5302):960-3.
 12. Golstein J, Dumont JE. Cytotoxic effects of iodide on thyroid cells: difference between rat thyroid FRTL-5 cell and primary dog thyrocyte responsiveness. *J Endocrinol Invest* 1996;19(2): 19-26.
 13. Graper L. Eine neue Anschauung über physiologische Zellausschaltung. *Arch Zellforsch* 1914;12:373-94.
 14. Haake AR, Cooklis M. Incomplete differentiation of fetal keratinocytes in the skin equivalent leads to the default pathway of apoptosis. *Exp Cell Res* 1997;231(1):83-95.
 15. Hall Jackson CA, Jones T, Eccles NG, Dawson TP, Bond JA, Gescher A, Wynford-Thomas D. Induction of cell death by stimulation of protein kinase C in human epithelial cells expressing a mutant ras oncogene: a potential therapeutic target. *Br J Cancer* 1998;78(5):641-51.
 16. Hammond LJ, Lowdell MW, Cerrano PG, Goode AW, Bottazzo GF, Mirakian R. Analysis of apoptosis in relation to tissue destruction associated with Hashimoto's autoimmune thyroiditis. *J Pathol* 1997;182(2):138-44.
 17. Kanamori A, Brown DD. The analysis of complex developmental programmes: amphibian metamorphosis. *Genes Cells* 1996;1(5):429-35.
 18. Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, Tsuboi M, Kawabe Y, Ishikawa N, et al. Thyroid-stimulating hormone inhibits Fas antigen-mediated apoptosis of human thyrocytes in vitro. *Endocrinology* 1996;137(8):3163-9.
 19. Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, Tsuboi M, Kawabe Y, Urayama-Tahara K, et al. Modulation of Fas mediated apoptosis of human thyroid epithelial cells by IgG from patients with Graves' disease (GD) and idiopathic myxoedema. *Clin Exp Immunol* 1997;110(3):434-9.
 20. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57
 21. Kerr JFR, Winterford Clay M, Harmon Brian V. Apoptosis - Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73(8):2013-26.
 22. Kerr JFR. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 1971;105:13-20.
 23. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol* 1998;138(5):482-91.
 24. Kikuchi S, Hiraide H, Tamakuma S, Yamamoto M. Expression of wild-type p53 tumor suppressor gene and its possible involvement in the apoptosis of thyroid tumors. *Surg Today* 1997;27(3):226-33.
 25. Koga M, Hiromatsu Y, Jimi A, Inoue Y, Nonaka K. Possible involvement of Fas-mediated apoptosis in eye muscle tissue from patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *Thyroid* 1998;8(4):311-8.
 26. Kotani T, Aratake Y, Hirai K, Fukazawa Y, Sato H, Ohtaki S. Apoptosis in thyroid tissue from patients with Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity* 1995;20(4):231-6.
 27. Landstrom M, Damber JE, Bergh A. Prostatic tumor regrowth after initially successful castration therapy may be related to a decreased apoptotic cell death rate. *Cancer Res* 1994;54(16):4281-4.
 28. Lazzereschi D, Mincione G, Coppa A, Ranieri A, Turco A, Baccheschi G, et al. Oncogenes and antioncogenes involved in human thyroid carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res* 1997;16(3):325-32.
 29. Liu R, Takayama S, Zheng Y, Froesch B, Chen GQ, Zhang X, et al. Interaction of BAG-1 with retinoic acid receptor and its inhibition of retinoic acid-induced apoptosis in cancer cells. *J Biol Chem* 1998;273(27):16985-92.
 30. Llanos S, Caelles C, Azorin I, Renau-Piqueras J, Fernandez-Luna JL, Bosca L, et al. The c-erbA alpha protooncogene induces apoptosis in glial cells via a protein kinase C- and bcl-2-suppressible mechanism. *J Neurochem* 1998;70(6):2315-26.
 31. Ludgate M, Jasani B. Apoptosis in autoimmune and non-autoimmune thyroid disease [editorial]. *J Pathol* 1997;182(2):123-4.
 32. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis-an overview of cell feath. *Am J Pathol* 1995;146(1):3-14.
 33. Manetto V, Lorenzini R, Cordon-Cardo C, Krajewski S, Rosai J, Reed JC, et al. Bcl-2 and Bax expression in thyroid tumours. An immunohistochemical and western blot analysis. *Virchows Arch* 1997;430(2):125-30.
 34. Massart C, Gibassier J, Le Gall F, Raoul ML,

- Beurtin F, Genetet B, et al. Thyroid cell survival in coculture with autologous peripheral or intrathyroidal lymphocytes. *Clin Endocrinol (Oxf.)* 1995;42(4):379-87
35. McConkey DJ, Orrenius S. Signal transduction pathways to apoptosis. *Trends Cell Biol* 1994;4:370-5.
36. Mitsiades N, Poulaki V, Kotoula V, Mastorakos G, Tseleni Balafouta S, Koutras DA, et al. Fas/Fas ligand up-regulation and Bcl-2 down-regulation may be significant in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol* 1998;83(6):2199-203.
37. Moore D, Ohene Fianko D, Garcia B, Chakrabarti S. Apoptosis in thyroid neoplasms: relationship with p53 and bcl-2 expression. *Histopathology* 1998;32(1):35-42.
38. Muller Y, Rocchi E, Lazaro JB, Clos J. Thyroid hormone promotes BCL-2 expression and prevents apoptosis of early differentiating cerebellar granule neurons. *Int J Dev Neurosci* 1995;13(8):871-85.
39. Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat Moleur F. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother* 1998;52(6):252-8.
40. Nishihara E, Nagayama Y, Narimatsu M, Namba H, Watanabe M, Niwa M, et al. Treatment of thyroid carcinoma cells with four different suicide gene/prodrug combinations in vitro. *Anticancer Res* 1998;18(3A):1521-5.
41. Nissen F. Über das Verhalten der Kerne in den Milchdrüsenzellen bei der Absonderung. *Ach Mikroskop Anat* 1886;26:337-42.
42. Pekary AE, Levin SR, Johnson DG, Berg L, Hershman JM. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) inhibit the expression and activity of Na⁺/K⁺-ATPase in FRTL-5 rat thyroid cells. *J Interferon Cytokine Res* 1997;17(4):185-95.
43. Reimers JI. Interleukin-1 beta induced transient diabetes mellitus in rats. A model of the initial events in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus? *Dan Med Bull* 1998;45(2):157-80.
44. Riou C, Remy C, Rabilloud R, Rousset B, Fonlupt P. H₂O₂ induces apoptosis of pig thyrocytes in culture. *J Endocrinol* 1998;156(2):315-22.
45. Shimaoka Y, Hidaka Y, Okumura M, Takeoka K, Tada H, Amino N. Serum concentration of soluble Fas in patients with autoimmune thyroid diseases. *Thyroid* 1998;8(1):43-7
46. Shirai M, Arishima K, Yamamoto M, Eguchi Y. Nonresponsiveness of the thyroid gland to goitrogen in the early period in the rat: Light-and Electron-Microscopic Observations. *Acta Anat* 1992;144:17-22.
47. Shi YB. Cell-cell and cell-ECM interactions in epithelial apoptosis and cell renewal during frog intestinal development. *Cell Biochem Biophys* 1995;27(3):179-202.
48. Stewart BW. Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst* 1994;86(17):1286-95.
49. Su Y, Shi Y, Shi YB. Cyclosporin A but not FK506 inhibits thyroid hormone-induced apoptosis in tadpole intestinal epithelium. *FASEB J* 1997;11(7):559-65.
50. Tamura M, Kimura H, Koji T, Tominaga T, Ashizawa K, Kiriya T, et al. Role of apoptosis of thyrocytes in a rat model of goiter. A possible involvement of Fas system. *Endocrinology* 1998;139(8):3646-53.
51. Tanimoto C, Hirakawa S, Kawasaki H, Hayakawa N, Ota Z. Apoptosis in thyroid diseases: a histochemical study. *Endocr J* 1995;42(2):193-201
52. Tata JR. Metamorphosis: an exquisite model for hormonal regulation of post-embryonic development. *Biochem Soc Symp* 1996;62:123-36.
53. Tonner E, Barber MC, Travers MT, Logan A, Flint DJ. Hormonal control of insulin-like growth factor-binding protein-5 production in the involuting mammary gland of the rat. *Endocrinology* 1997;138(12):5101-7
54. Wallace H, Clarke AR, Harrison DJ, Hooper ML, Bishop JO. Ganciclovir-induced ablation non-proliferating thyrocytes expressing herpesvirus thymidine kinase occurs by p53-independent apoptosis. *Oncogene* 1996;13(1):55-61.
55. Welsh AO. Uterine cell death implantation and early placentation. *Microsc Res Tech* 1995;25:223-45.
56. Williams GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 1993;74:777-9.
57. Woo D. Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *New Engl J Med* 1995;333(1):18-25.
58. Yamashita S. Endocrine disease and apoptosis. *Intern Med* 1998;37(2):194-6.
59. Yang T, Namba H, Hara T, Takamura N, Nagayama Y, Fukata S, et al. p53 induced by ionizing radiation mediates DNA end-jointing activity, but not apoptosis of thyroid cells. *Oncogene* 1997;14(13):1511-9.
60. Yazdanbakhsh K, Choi JW, Li Y, Lau LF, Choi Y. Cyclosporin A blocks apoptosis by inhibiting the DNA binding activity of the transcription factor Nur77. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(2):437-41.



Genética do câncer colorretal*

Genetics of colorectal cancer*

Guilherme Cutait de Castro Cotti Fábio Pires de Souza Santos*** Fernando Moreno
Sebastianes*** Angelita Habr-Gama**** Victor Edmund Seid*****
Rodrigo Bronze de Martino*******

Cotti GCC, Santos FPS, Sebastianes FM, Habr-Gama A, Seid VE, Martino RB. Genética do câncer colorretal. Rev Med (São Paulo) 2000 abr./dez.;79(2/4):45-64.

RESUMO: O câncer colorretal (CCR) é uma das neoplasias de maior importância atualmente, tanto por sua prevalência como por sua incidência, correspondendo a 10% de todas as neoplasias nos EUA. Contudo, nos últimos 50 anos, sua mortalidade permaneceu praticamente inalterada. Desde que Morson, em 1978, descreveu pela primeira vez a seqüência adenoma-carcinoma, a elucidação da genética molecular envolvida na patogênese do CCR passou a ser estudada intensamente e muitos avanços foram obtidos. Vários genes como APC, DCC e p53, entre outros, foram identificados como participantes da seqüência adenoma-carcinoma, estando envolvidos na gênese tumoral baseada na teoria de múltiplos passos, onde o acúmulo de mutações genéticas em células instáveis é o fator principal que acaba por originar o câncer. Há dois tipos básicos de CCR: o esporádico, que corresponde a 85% do total de casos de CCR; e o familiar, com cerca de 15% dos casos e destaque para a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) e o Câncer Colorretal Hereditário não-poliposo (HNPCC). As pesquisas atuais vêm decifrando o mecanismo de ação de tais genes, buscando determinar a importância e valor prognóstico dos mesmos. Espera-se que a elucidação completa de tais mecanismos permita uma diminuição não só da mortalidade do CCR, mas também do impacto social imposto por tal doença. Ademais, a elaboração de tratamentos alternativos à cirurgia parece possível, através da terapia genética. Portanto, familiarizar-se com a Genética do Câncer Colorretal e os avanços nessa área torna-se imperativo para clínicos e cirurgiões da área digestiva.

DESCRITORES: Neoplasias colorretais/genética; Neoplasias colorretais/epidemiologia; Sequências de bases/genética; Polipose adenomatosa do colon/genética; Adenocarcinoma/epidemiologia; Adenocarcinoma/genética; Mutação/genética.

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) representa uma das neoplasias de maior importância no Ocidente, tanto por Ocidente, tanto por sua prevalência como por sua incidência. Estima-se que nos Estados Unidos, o CCR corresponda a 10% do total de todas as neoplasias, sendo responsável por aproximadamente 131.600 novos casos e 55.000 mortes anuais e com uma estimativa de que 5% das pessoas desenvolverão a

doença em algum momento de suas vidas⁶⁷. Atualmente, o CCR corresponde à terceira causa de morte por câncer tanto em homens (atrás somente do câncer de pulmão e próstata) quanto em mulheres (atrás do câncer de pulmão e mama)⁶⁷. No Brasil, estima-se que a incidência de CCR em 1996 foi de 17.000 novos casos, com discreta maior prevalência no sexo feminino. Contudo, a despeito de todos os

* Prêmio Monografias (área cirurgia) - COMU, 1999.

** Acadêmico do 4º ano da FMUSP, membro da Liga de Iniciação em Coloproctologia.

*** Acadêmicos do 3º ano da FMUSP, membros da Liga de Iniciação em Coloproctologia.

**** Profª Titular da Disciplina de Coloproctologia da FMUSP e Chefe do Depto. de Gastroenterologia (orientadora).

***** Médicos Residentes do Departamento de Cirurgia da FMUSP (orientadores).

esforços empregados para melhoria do diagnóstico e tratamento do CCR, sua mortalidade permaneceu praticamente inalterada nos últimos 50 anos, sendo a sobrevida em 5 anos ao redor de 60%.¹⁰⁶

Por se tratar de problema de saúde pública com grande impacto social, a elucidação da patogênese molecular do CCR vem recebendo muita atenção da comunidade de pesquisa científica nos últimos anos. Como resultado de grande investigação, diversas mutações no código genético de células epiteliais colônicas foram identificadas como responsáveis pela perda do crescimento celular normal e diferenciação, resultando na transformação neoplásica de células epiteliais do intestino grosso, em doentes com CCR esporádico.⁷⁶

Vogelstein¹³⁶ a partir dos achados obtidos com experiências em tumores esporádicos, postulou a provável seqüência de mutações genéticas mais freqüentemente identificadas no CCR, bem como correlacionou a ocorrência de tais mutações a lesões amplamente aceitas como precursoras de CCR. Dessa forma, surgiu a possibilidade de identificar os defeitos genéticos associados ao CCR, vislumbrou-se uma nova perspectiva para o rastreamento e tratamento eficaz da doença e gerou-se a possibilidade de melhorar os resultados de sobrevida do CCR, que, como dito, demonstraram pouca ou nenhuma melhora nos últimos 50 anos.

Patologia do CCR

Sir Rupert Willis definiu o termo neoplasia como uma massa de tecido anormal que não responde adequadamente aos sinais envolvidos no crescimento e diferenciação celular e, portanto, cujo crescimento ocorre de maneira não coordenada em comparação com o tecido normal. O termo câncer engloba todas as neoplasias, ou tumores, de caráter maligno, que apresentam capacidade de invadir tecidos adjacentes e espalhar-se para sítios distantes (metástases).¹⁴⁷

O cólon, incluindo o reto, é o sítio mais freqüente de neoplasias primárias do que qualquer outro órgão em todo o corpo humano.¹¹² No intestino grosso, podem ocorrer tanto neoplasias de origem benigna, os adenomas, quanto de origem maligna, os carcinomas. Os adenocarcinomas constituem a quase totalidade dos cânceres colorretais, e representam 70% de todas as neoplasias malignas do trato gastrointestinal. São compostos de células originadas do epitélio das glândulas intestinais que, após acúmulo de mutações em seu material genético, originam o CCR.

Uma associação entre carcinoma e pólipos colorretais foi descrita em 1978 por Morson et al.⁴⁹, baseada em observações clínicas, epidemiológicas

e anátomo-patológicas, sendo conhecida hoje como seqüência "adenoma-carcinoma". Apesar da falta de estudos prospectivos e bem controlados, parece ser verdade que a maioria dos carcinomas do cólon e reto (aproximadamente 95% destes) desenvolvem-se a partir dos adenomas, onde algumas etapas tanto macroscópicas quanto microscópicas vem sendo estabelecidas e, por sua vez, correlacionadas com alterações genéticas, conforme será abordado mais adiante.

Um pólipio representa uma massa tumoral protusa em direção à luz intestinal. Inicia-se como uma pequena massa séssil que, à medida que aumenta de tamanho, pode permanecer como séssil ou adquirir uma haste, tornando-se pediculado.

Há que se ressaltar que nem todo pólipio tem características neoplásicas. Pólipos hiperplásicos, hamartomatosos (pólipos juvenis e das Síndromes de Peutz-Jeghers e Cronkhite-Canada), inflamatórios e linfóides, são todos definidos como não-neoplásicos, pois nesses não há atipia ou displasia e suas histórias naturais não se relacionam com o surgimento de neoplasias, via de regra. Entretanto, pólipos epiteliais que resultam de proliferação anormal numa mucosa displásica são denominados adenomas e representam as verdadeiras lesões neoplásicas pré-malignas do intestino grosso. A prevalência dos adenomas na população geral gira em torno de 20 a 30% abaixo dos 40 anos de idade e entre 40 a 50% após os 60 anos.¹¹² A freqüência é a mesma para ambos os sexos, havendo uma bem definida predisposição familiar para o surgimento de adenomas esporádicos. Os pólipos adenomatosos são divididos em 3 subtipos:

a) *adenomas tubulares*: apresentam mais de 75% de sua arquitetura composta por glândulas tubulares e são a grande maioria dos adenomas;

b) *adenomas vilosos*: apresentam mais que 50% de projeções vilosas, representando apenas 1% do total de adenomas;

c) *adenomas túbulo-vilosos*: constituindo entre 5 a 10% dos adenomas colorretais, são constituídos por um misto de glândulas tubulares e projeções vilosas, onde estas últimas compõe entre 25 e 50% do total da arquitetura da lesão.

O risco de malignidade em um pólipio adenomatoso correlaciona-se com três fatores independentes: tamanho do pólipio, arquitetura histológica e grau de displasia epitelial.³ De fato, é rara a ocorrência de câncer em adenomas menores do que 1cm, os adenomas vilosos apresentam maior risco de malignização e graus de displasia severa são mais freqüentemente encontrados em áreas de arquitetura vilosa. A displasia epitelial refere-se à aparência microscópica das células neoplásicas epiteliais do adenoma, sendo classificada em: leve,

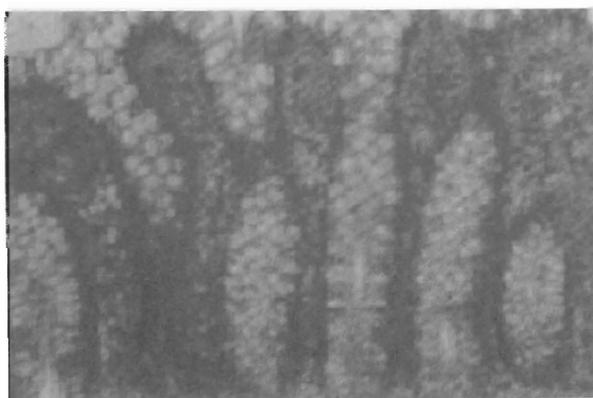
moderada e intensa. Tal classificação baseia-se em características celulares tais como a polaridade celular, o grau de condensação da cromatina, o aspecto e forma dos núcleos, a presença de mitoses atípicas ou mitoses em toda espessura epitelial, entre outras. Este conjunto de alterações reflete a perda do controle do crescimento celular pelo acúmulo de mutações nos genes envolvidos com esta função. Assim, na displasia leve as células são muito semelhantes às células epiteliais normais, sendo este diagnóstico difícil e sua interpretação variando muito entre diferentes patologistas. Na displasia acentuada as células assemelham-se àquelas de um câncer e, de fato, o adenoma com displasia intensa constitui um carcinoma *in situ*.

Conclui-se então que os adenomas, neoplasias benignas pré-existentes, constituem

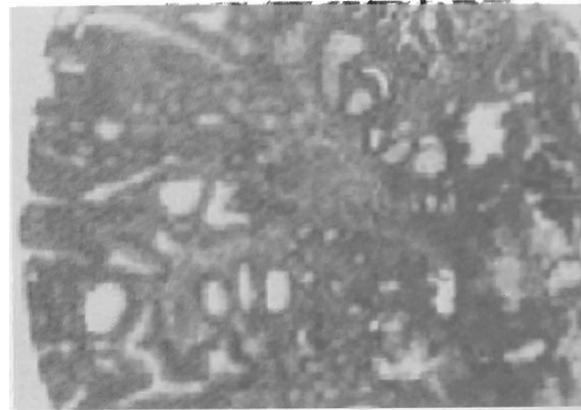
terreno fértil para a transformação maligna sob certas circunstâncias; contudo, na realidade, apenas uma pequena porcentagem destas lesões irá de fato dar origem aos carcinomas colorretais. Conforme veremos adiante, parece certo admitir que a herança, mas sobretudo a ação direta de agentes carcinogênicos sobre a mucosa colorretal, resulta em acúmulo de defeitos genéticos parcialmente identificados e que concorrem para a carcinogênese epitelial no intestino grosso.

Seqüência adeno-carcinoma

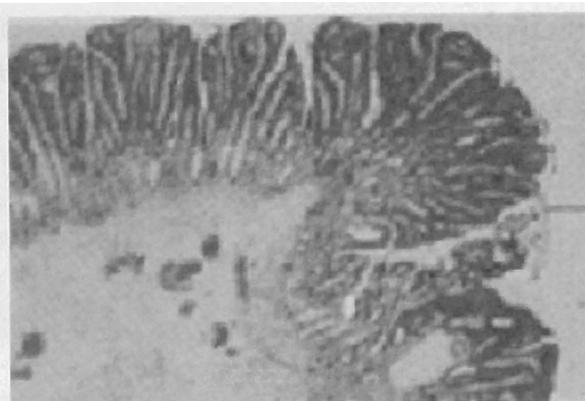
A seqüência adenoma-carcinoma foi descrita pela primeira vez por Morson em 1978⁴⁹ (Figura 1).



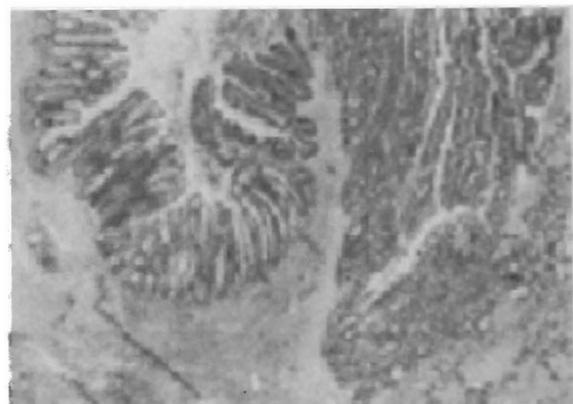
Mucosa colônica normal



Adenoma benigno (precoce)



Adenoma benigno (tardio)



Carcinoma maligno invasivo

Figura 1 - Seqüência adenoma-carcinoma.

(Fonte: <http://bst2.bioscience.drexel.edu/biology/ebe/molcellbiol/colon/project.htm>)

Os carcinomas colorretais raramente provêm da mucosa intestinal quando não pode ser identificada lesão adenomatosa associada. Assim, eles apresentam uma lesão precursora não maligna: o adenoma displásico. As primeiras alterações epiteliais na seqüência adenoma-carcinoma, já descritas em humanos, foram denominadas criptas aberrantes. Estas consistem em algumas criptas que apresentam um lúmen alargado e de forma anormal. A histologia é característica de alterações displásicas e, portanto, podem ser classificadas como

microadenomas. Essas alterações consistem em expansão da zona proliferativa de células na cripta colônica, passando a incluir células localizadas ou próximas da superfície epitelial. Com a continuação do crescimento, o foco de criptas aberrantes e displásicas provavelmente origina uma lesão polipóide visível. Com o decorrer do tempo, as células do adenoma vão sofrendo alterações, tornando-se menos diferenciadas e mais displásicas. Finalmente, elas adquirem o fenótipo de um carcinoma com a capacidade de ultrapassar a

barreira da lâmina própria e atingir a mucosa. Em seguida, novas alterações genéticas permitem-nas, após se distribuir pela mucosa e envolver a parede colônica, adquirir a capacidade de metastatizar a linfonodos locais ou órgãos distantes. Modelos animais de tumorigênese no cólon e estudos clínicos observacionais embasaram a seqüência adenoma-carcinoma. As evidências principais são as seguintes⁴⁹:

- populações que apresentam uma alta prevalência de adenomas apresentam uma alta prevalência de CCR e vice-versa;

- a distribuição do adenoma no cólon e reto é similar à do CCR;

- a ocorrência de pólipos adenomatosos antecede por cerca de 10 a 15 anos a de CCR;

- quando um CCR invasivo é diagnosticado precocemente, tecido adenomatoso ao redor é frequentemente identificado;

- o risco de câncer encontra-se diretamente relacionado ao número de adenomas e, por isso, probabilidade de CCR em pacientes com síndromes de polipose adenomatosa familiar (PAF) é de 100%.

- programas de polipectomias colonoscópicas reduzem a incidência de CCR nos pacientes, funcionando como medida de prevenção secundária ao CCR.

As neoplasias do cólon, incluindo adenomas e carcinomas, são monoclonais por natureza, ou seja, provêm de uma única célula. Assim, uma célula no epitélio normal sofre uma ou mais modificações que conferem uma vantagem de crescimento seletiva em relação às células epiteliais ao redor. A progressão de um microadenoma para um adenoma, e deste para um carcinoma, resulta de uma série de modificações genéticas que se acumulam em uma população clonal, gerando células com crescimento ou características de sobrevivência aumentadas em cada mutação nova gerada. Este processo de carcinogênese com múltiplos passos no desenvolvimento do CCR sugere que vários eventos genéticos sejam necessários antes que uma célula verdadeiramente maligna seja gerada. A possibilidade de identificar alteração genética associada a lesões pré-malignas de CCR, tais como um adenoma viloso com displasia acentuada ou lesões de criptas aberrantes, representam a base metodológica e o objetivo do rastreamento genético do CCR.

Características da ocorrência da CCR

O CCR divide-se basicamente em dois grandes grupos: o CCR esporádico, que corresponde a 85% do total das neoplasias malignas colorretais; e o CCR hereditário, que compreende aproximadamente 15% do total dos CCR¹¹². O CCR

hereditário apresenta duas subdivisões: a Síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) (Figura 2), que corresponde a menos de 1% de todos os casos de CCR; e o câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC), que corresponde a cerca de 10% do total dos casos de CCR. Mesmo contribuindo com apenas uma pequena proporção dos casos de CCR, a Síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) serviu como um paradigma clínico e de pesquisa para o diagnóstico e tratamento do câncer colorretal hereditário⁷⁶. Do mesmo modo, a PAF constituiu um elo crítico na elucidação da genética molecular envolvida na carcinogênese colorretal, pois foi através de estudos desses pacientes portadores de PAF que se postulou o modelo de carcinogênese em múltiplos passos, no qual o acúmulo de mutações genéticas é responsável pela progressão do epitélio colônico normal para adenoma displásico e deste para um carcinoma invasivo¹³⁶. Este trabalho culminou com a identificação e clonagem do gene APC, que será descrito adiante. A PAF apresenta padrão de herança autossômica dominante, e nela observa-se a ocorrência de centenas a milhares de adenomas tubulares (embora lesões tubulovilosas, vilosas ou hiperplásicas possam estar presentes). O tratamento de escolha é a proctocolectomia ou a colectomia subtotal com acompanhamento anual através de retossigmoidoscopia, para exame do segmento intestinal remanescente. A realização de endoscopia digestiva alta com certa periodicidade também é necessária, tendo em vista a possibilidade de ocorrência de adenomas gástricos e duodenais, com risco de malignização. Além disto, tumores desmóides também podem ocorrer⁷⁶.

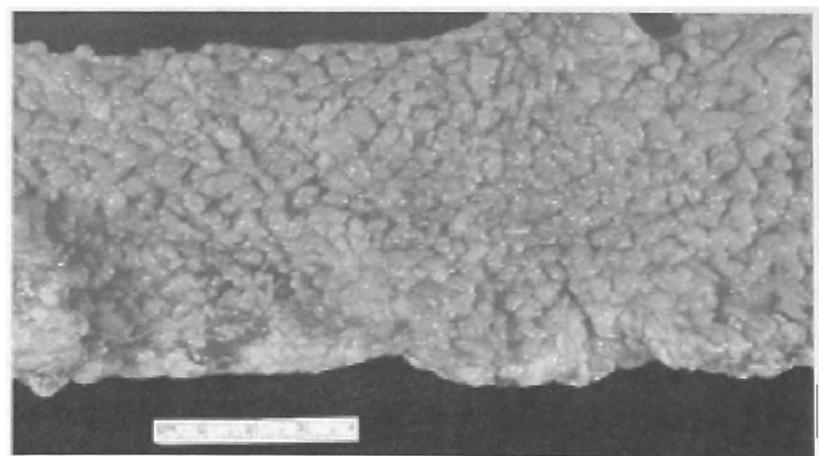


Figura 2 Cólon de paciente com PAF. (Fonte: <http://www-medlib.med.utah.edu/WebPath/GIHTML/GI143.html>)

O câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC) apresenta herança autossômica dominante com penetrância entre 80 e 85%, onde as mutações ocorrem em genes envolvidos no reparo do DNA¹²⁸ tais como hMSH2, hMLH1

hPMS1 e hPMS2. Os eventos mutacionais estão acelerados pelo reparo inadequado do DNA e, assim, a evolução de um adenoma colorretal para carcinoma ocorre em um período mais curto⁵³ em comparação com uma média de 8 a 10 anos na população geral¹⁴⁸. Há maior ocorrência de carcinomas no cólon direito (cerca de 70% dos tumores são proximais à flexura esplênica), maior número de tumores sincrônicos e/ou metacrônicos⁷⁶ e melhor prognóstico do que os CCR esporádicos¹¹⁷ embora os motivos que levem a uma melhor sobrevida ainda não sejam esclarecidos (suspeita-se que a resposta imune no HNPCC tenha um papel central neste ponto). Tumores primários extracolônicos também podem associar-se ao fenótipo do HNPCC, principalmente os localizados no útero, ureter, pelve renal, intestino delgado, estômago, ovário e vias biliares¹⁴². Pacientes com história familiar sugestiva de HNPCC, que preenchem critérios de Amsterdã ou Bethesda (Tabela 1), devem iniciar rastreamento colonoscópico anual ou a cada dois anos, já a partir dos 20 anos, e anualmente a partir dos 40. O tratamento cirúrgico, quando está demonstrada a mutação nos genes reparadores de DNA, é controverso e profilático, envolvendo colectomia subtotal com reavaliação anual do segmento retal⁷⁶.

Tabela 1 – Critérios de Amsterdã II (conforme Vassen et al., 1999)¹³⁴.

Critérios de Amsterdã II (rev. em julho de 1999)

Paciente com CCR deve ter as seguintes características para classificar sua família como portadora da síndrome HNPCC:

1. Pelo menos três parentes com câncer associado ao HNPCC (CCR, endometrial, intestino delgado, ureter e renal).
2. Um deles deve ser parente em primeiro grau dos outros dois.
3. Pelo menos duas gerações sucessivas devem ser afetadas.
4. Pelo menos um caso de câncer tem de ter sido diagnosticado antes dos 50 anos.
5. A síndrome PAF deve ser excluída em casos de CCR.
6. Os tumores devem ter seus diagnósticos confirmados por exame e anátomo-patológico.

Como se pode depreender da análise das características clínicas das síndromes de CCR hereditário expostas na Tabela 2, é de fundamental importância conhecer a possibilidade de herança genética em doentes para os quais o diagnóstico CCR já tenha sido feito, uma vez que este achado resultará em tratamento diferenciado. Da mesma forma, a possibilidade de detectar presença de herança genética antes do diagnóstico de CCR para um determinado indivíduo, resultará em vigilância diferenciada resultando em maior sobrevida.

Tabela 2 Características de PAF e HNPCC.

	PAF	HNPCC
Padrão de herança	Autossômica dominante	Autossômica dominante
Mutação germinativa	gene APC (5q21) hPMS1, hPMS2).	Qualquer um dos genes de reparo do DNA (hMSH2, hMLH1,
Pólipos	Adenomatosos, com início no cólon distal e reto; normalmente > 100. Podem ocorrer adenomas no intestino delgado e pólipos gástricos são comuns.	Os pólipos de cólon ocorrem na mesma frequência que na população geral. Adenomas colônicos são ocasionais, normalmente grandes e vilosos, ocorrendo em faixas etárias precoces.
Câncer	CCR, aproximadamente aos 40 anos; muitos casos em jovens aos 20 anos; câncer de intestino delgado, estômago (principalmente no Japão), tireóide, carcinomaperiampular e outros podem ocorrer.	CCR com tendência proximal, excesso de tumores sincrônicos e metacrônicos. Podem ocorrer também câncer e de endométrio, ovário, intestino delgado, estômago, ureter e pelve renal. Idade média ao diagnóstico é de 44 anos.
Diagnostico/ rastreamento	Retossigmoidoscopia periódica a partir dos 10 anos. Endoscopia digestiva alta a cada 1 a 3 anos. Rastreamento do segmento retal remanescente após	Colonoscopia, com início aos 20 anos, anual para portadores de mutação em genes de reparo do DNA; a cada 2 anos quando não são realizados estudos de mutação. Biópsia aspirativa do endométrio quando realizar as colonoscopias.
cirurgia profilática		
Tratamento cirúrgico/ profilático	Colectomia subtotal profilática com anastomose íleo-retal; ou proctocolectomia retal com reservatório ileal.	Colectomia subtotal para estágios iniciais de CCR. Considerar possibilidade de colectomia total para portadores e de mutação conhecida em genes de reparo do DNA e considerar histerectomia total e ooforectomia profilática para pacientes com CCR inicial que já constituíram sua família.
Aconselhamento genético*	SIM. Detecção de mutação desconhecida no gene APC no sangue- R\$ 750,00. Detecção de Mutação Conhecida no gene APC no sangue para familiares - R\$ 150,00.	SIM. Detecção de mutação desconhecida nos genes MMR no sangue 1750. Detecção de mutação conhecida nos genes MMR no sangue para familiares R\$ 150,00.

* Conforme pesquisa ao Instituto Ludwig do Hospital do Câncer em São Paulo, SP.

Eventos genéticos envolvidos na patogenia da CCR

Em 1895, a costureira do Dr. Alfred Warthin lhe disse que ela esperava morrer de câncer. Ela estava saudável naquele momento, mas muitos de seus parentes haviam morrido de câncer do cólon e outras doenças malignas. O Dr. Warthin, que era Professor de Patologia na Universidade de Michigan, ficou intrigado pela história, e decidiu investigar os arquivos locais de Patologia a respeito da família de sua costureira, que acabou se tornando a família "G" - o protótipo de todas as famílias com síndromes de câncer familiar. Posteriormente, descobriu-se que a história da família "G" permitia classificá-la como suscetível à Síndrome do Câncer Colorretal Hereditário Sem Polipose (HNPCC)^{45,75,140,141}

Como foi visto, sabe-se que há duas síndromes familiares em que a herança de um gene mutado aumenta muito a probabilidade de CCR: a PAF e o HNPCC. Apesar de serem síndromes genéticas herdadas pelas várias gerações de uma família, os mecanismos de carcinogênese envolvem a herança genética e uma seqüência elaborada de outras alterações genéticas somáticas que se juntam ao fator herdado para propiciar a carcinogênese. Tais alterações genéticas somáticas levam décadas para ocorrer, o que explica o fato de uma pessoa com PAF ter seu primeiro adenoma aos 16 anos, mas apenas ter CCR diagnosticado ao redor dos 40 anos. Percebeu-se então que as pessoas acometidas pelas síndromes apresentavam uma instabilidade genômica, decorrente da mutação genética herdada, que as predispunha a terem mais mutações somáticas. Ou seja, a mutação herdada facilitava a ocorrência de novas mutações.

Embora estime-se que a PAF e o HNPCC sejam responsáveis por 1% e 10%, respectivamente, de todos os casos de CCR, o estudo das mutações nestes casos é de grande valia para avaliação dos casos de CCR esporádico, pois as etapas genéticas são essencialmente as mesmas. Por volta de 15% dos CCR esporádicos resultaram de duas mutações somáticas a um gene envolvido no reparo de DNA, tendo como consequência a mesma hipermutabilidade vista nos pacientes com HNPCC. Os 85% restantes parecem ser resultado de duas mutações somáticas no gene APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), ou algum outro gene supressor tumoral, seguido pela mesma instabilidade cromossômica encontrada na PAF

Categorias de genes envolvidos na carcinogênese colorretal¹¹²

1) Genes supressores tumorais - são genes

cuja função é regular o crescimento e a proliferação celular. Uma alteração genética que leve à perda de função deste gene permitiria uma proliferação celular irrefreada, facilitando o desenvolvimento de neoplasias. Perda de função de genes supressores tumorais são, portanto, eventos relativamente freqüentes no surgimento de neoplasias em todo o corpo.

2) Oncogenes são genes que codificam para proteínas que promovem crescimento celular normal e diferenciação. A ocorrência de uma alteração na estrutura do protooncogene (levando à síntese de uma proteína alterada) ou de uma mudança na regulação da expressão do gene (que passa a ser excessivamente expresso), resulta na transformação do proto-oncogene em um oncogene, que promove proliferação celular desregulada e o surgimento de neoplasias.

3) Genes envolvidos no reparo de DNA são os genes do complexo MMR (Mismatch Repair) que são responsáveis pela correção de erros de pareamento de bases do DNA após a ação da DNA polimerase para duplicação do DNA. A mutação desses genes deixa o DNA em um estado de hipermutabilidade, apresentando um maior número de mutações (pois os erros da DNA polimerase não são corrigidos) e causando o fenótipo de instabilidade de microssatélites, que são seqüências altamente repetitivas de DNA e muito sujeitas a sofrerem erros durante a replicação pela DNA polimerase.

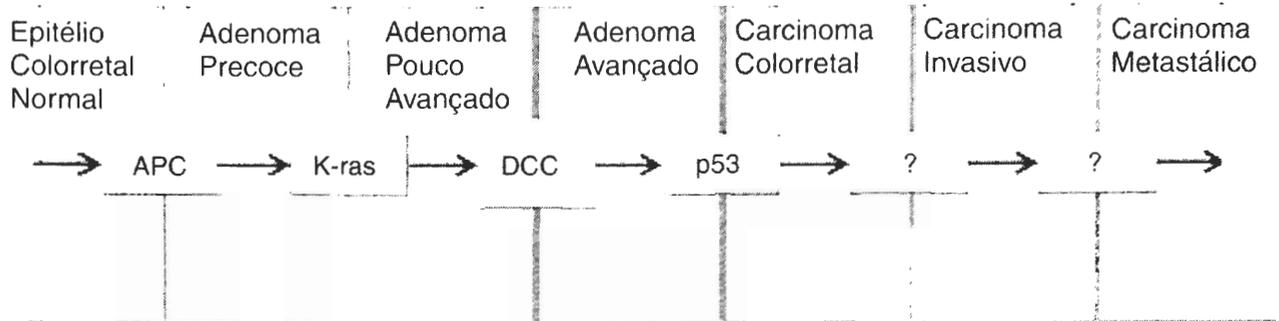
Vias genéticas da carcinogênese colorretal (Figura 3)

1) Via da instabilidade cromossômica: ocorre na PAF, onde o paciente herda uma mutação no gene supressor tumoral APC. A função normal deste gene é bloquear a proliferação celular incontrolada. Ela só ocorre, porém, se a célula tiver seus dois alelos inativados. No caso da PAF, o primeiro alelo inativo é herdado, e a perda do segundo alelo permite o desenvolvimento de um adenoma, um evento com grande probabilidade de ocorrer, já que todas as células apresentam um alelo inativo. Isto explica o aparecimento de múltiplos adenomas na PAF. Em um CCR esporádico, deveria ocorrer a perda dos dois alelos do gene APC em uma mesma célula para que houvesse o surgimento de um adenoma, portanto um evento mais difícil de ocorrer. Por razões não bem compreendidas, a perda dos dois alelos do gene APC deixa o cromossomo da célula instável e

mais suscetível a sofrer deleções ou mutações somáticas, levando a perda ou inativação de mais

genes supressores tumorais ou ativação de oncogenes.

Via da Instabilidade Cromossômica



Via da Hipermutabilidade

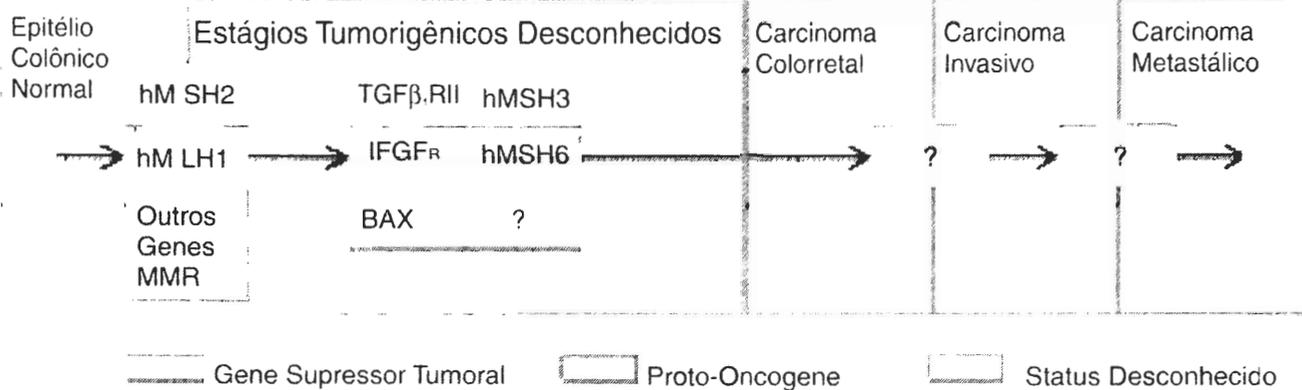


Figura 3 Vias genéticas de carcinogênese colorretal.

2) Via da hipermutabilidade do DNA

Ocorre no HNPCC, em que a alteração genética herdada é a inativação de um dos alelos dos genes envolvidos no reparo do DNA (genes hMSH2 e hMLH1, principalmente). A inativação do segundo alelo faz com que a célula perca sua capacidade de realizar reparos no DNA, o que abre caminho para o surgimento de diversas mutações somáticas que acabam por levar ao surgimento de CCR.

GENES ENVOLVIDOS NA CARCINOGENESE COLORRETAL

1) Gene APC

O gene responsável pela PAF, denominado de APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), foi identificado em 1991 e localiza-se no cromossomo 5q21-22^{41,48,58,55}

Mutações herdadas no gene APC foram demonstradas em 80% dos pacientes com PAF⁸⁵. Seguindo a hipótese de Knudson⁶⁰ de que duas alterações genéticas são necessárias para o desenvolvimento de câncer, alterações em ambos os alelos do gene APC foram identificadas em pacientes que haviam desenvolvido CCR na PAF. A mutação germinativa é acompanhada por uma mutação somática ou, mais comumente, por uma deleção cromossômica. O gene APC é, portanto, um gene supressor tumoral clássico, necessitando da inativação de suas duas cópias para favorecer a carcinogênese^{85,86}.

Embora o gene APC tenha sido primeiramente demonstrado como o gene responsável pela PAF, um estudo em 1987 constatou sua importância no CCR esporádico ao identificar deleções no cromossomo 5q em 20% dos carcinomas colorretais esporádicos¹²⁵. Outros estudos com CCR esporádico constataram que a deleção do 5q ou mutações do gene APC estavam presentes com frequência semelhante entre os adenomas sem microinvasão, os adenomas com microinvasão e os carcinomas invasivos, sugerindo ser a inativação do gene APC por mutação e/ou deleção uma alteração precoce ou até mesmo iniciadora do desenvolvimento dos CCR esporádicos^{86,136}.

No que se refere à sua estrutura, o gene APC consiste de 8538 nucleotídeos distribuídos por 15 éxons transcritos que codificam uma proteína citoplasmática com 300 kDa e 2843 aminoácidos^{41,58}. Esta proteína apresenta semelhança de seqüências de aminoácidos com as proteínas dos filamentos intermediários, como miosina e ceratina⁴¹ e sua expressão é mais elevada na porção superior da cripta, sugerindo uma relação com o grau de maturação da célula¹²⁴. Estudos demonstraram ser a proteína mutante do gene APC solúvel no citoplasma, enquanto que a proteína do tipo selvagem é insolúvel. Outros estudos demonstraram que, *in vitro*, a proteína truncada forma complexos com a proteína selvagem. A proteína truncada pode, então, interferir na função da proteína selvagem, o que significa que o gene APC também pode funcionar de modo dominante negativo nas células heterozigóticas *in vivo*^{124,129}.

Várias funções já foram atribuídas à proteína APC. Em primeiro lugar, ela tem um papel importante na regulação da proliferação celular, dada sua habilidade de inibir a progressão das células da fase G1 (ou pré-sintética de DNA) para a fase S (de síntese de DNA) do ciclo celular. Também se suspeita de uma função da proteína nos mecanismos de apoptose¹⁴. Sabe-se também que a proteína APC interage com uma série de outras proteínas, dentre as quais as que mais têm sido alvo de estudo são as cateninas, especialmente a beta-catenina. As cateninas (alfa, beta e gama) são uma família de proteínas citoplasmáticas com função de adesão intercelular, fazendo parte, juntamente com a placoglobina, dos complexos de junção aderente e dos desmossomos^{102,115}. Normalmente, a proteína APC se liga à beta-catenina por um sítio codificado no éxon 15 e permite a ligação da enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) promovendo assim a degradação da beta-catenina⁷⁵.

Um bloqueio desta destruição, com inibição da GSK3, é realizado pelo fator de crescimento Wnt-1. Com a inibição, aumentam-se os níveis de beta-catenina, que se torna livre para interagir com duas outras proteínas. Forma então um complexo com a alfa-catenina e este complexo se liga ao domínio citoplasmático da E-caderina, uma outra proteína transmembrana cuja porção extracelular se liga à uma proteína semelhante numa célula vizinha e forma uma adesão intercelular. O complexo das cateninas medeia então a interação entre a E-caderina e o citoesqueleto, que é essencial para a replicação celular²⁰. A beta-catenina também pode funcionar como um fator ativador de transcrição do DNA, se complexando com o fator da célula T (Tcf), formando um complexo molecular ativador de transcrição de DNA e iniciando, provavelmente, a transcrição de genes que promovem a proliferação celular ou inibem a apoptose^{83,87,105,115,129}. A perda da proteína APC funcionaria então como uma sinalização contínua por Wnt-1. Resumindo, a proteína APC teria então uma função de retirar o excesso de beta-catenina, modulando o nível desta no citoplasma e afetando a estrutura celular e vias de transdução de sinais relacionadas à proliferação celular, controlando deste modo a replicação celular⁸⁹.

A partir da identificação do gene APC, iniciaram-se vários estudos para detectar as diferentes mutações existentes. Mutações somáticas deste gene foram encontradas em até 81% dos casos de carcinoma colorretal esporádico^{86,102}. Muito embora não tenha sido demonstrada a necessidade de inativação do alelo remanescente para desenvolvimento maligno do tumor, na maior parte (mais de 50%) dos casos de adenocarcinoma colorretal, havia mutações em ambos os alelos⁸⁶.

Nos pacientes com PAF foram encontradas mutações nas linhagens germinativas de 67% a 80% dos pacientes, todos sem parentesco^{85,86}. No gene APC, percebeu-se que há uma região, conhecida como MCR (*Mutation Cluster Region* - região de aglomeração de mutações), que acumula a maioria das mutações, apresentando por volta de 75% das mutações somáticas em tumores esporádicos^{9, 85}. Nos pacientes com PAF, porém, essa região é responsável por apenas 23% das mutações germinativas⁸⁶. O códon 1309, localizado na MCR, é o alvo mais frequente de mutações germinativas e somáticas^{40,41}. Embora não haja nenhum estudo detectando uma correlação direta entre o local da mutação e o fenótipo, é possível que as mutações no códon 1309 estejam associadas ao desenvolvimento precoce da PAF, enquanto as mutações localizadas na extremidade 5' do gene se associem a fenótipos mais brandos e de início mais tardio^{104,127}. As evidências acima indicam que o gene APC codifica uma proteína com papel crítico nos processos de interações intercelulares e regulação da proliferação celular. A sua disfunção resultante de uma deleção alélica ou outras mutações tem papel primordial e precoce na cascata de alterações genéticas responsável pelo surgimento da PAF e do CCR esporádico.

2) Gene K-Ras

Para que haja uma manutenção adequada da homeostase e do desenvolvimento celular, é necessária a interação da célula com o meio extracelular. Para que este processo ocorra, existe uma cadeia de sinalizadores que captam sinais recebidos do meio extracelular por receptores e fazem a transdução destes sinais de modo a passar a informação para o núcleo celular⁷. Nesta cadeia de sinalizadores há um grupo de proteínas conhecidas como ras (de "*Rat Sarcoma*" - pois foram relacionadas mutações destas proteínas com o desenvolvimento de sarcomas em ratos), altamente conservado entre as espécies de animais superiores. Neste grupo de proteínas podem-se identificar três subgrupos: N-ras, H-ras e K-ras. As proteínas ras desempenham um papel importante na transdução de sinais mitogênicos através da membrana plasmática, com a estimulação de cascatas enzimáticas que levam à progressão da célula no ciclo de replicação celular. Pode-se deduzir, portanto, que uma mutação que leva à uma ativação permanente destas proteínas tem um papel importante nos mecanismos de carcinogênese⁵.

Mutações no gene ras constituem a alteração oncogenética mais comum em tumores humanos²². O gene K-ras é o gene mais estudado dentre a família ras. Localizado no braço curto do cromossomo 12, o gene K-ras codifica a proteína de 21 kDa

conhecida como p21-ras. Quando o gene K-ras sofre uma mutação, há uma diminuição na interação da proteína p21-ras com a proteína ativadora da GTP-ase (ras-GAP), ficando a proteína p21-ras permanentemente ligada com GTP, ou seja, permanentemente no estado ativo. A proteína p21-ras no seu estado ativo realiza a fosforilação de um resíduo de serina da proteína raf-1, que por sua vez ativa uma cascata de quinases que acabam por ativar fatores de transcrição nucleares como o c-myc. Como a p21-ras mutada está sempre ativa, tem-se como consequência uma sinalização contínua para o núcleo e uma estimulação potente para a proliferação celular. Pode-se dizer, então, que o gene K-ras é um protooncogene, o qual uma vez ativado se torna um oncogene, ou seja, um gene que estimula a proliferação celular neoplásica^{5,12}

Mutações do gene K-ras foram identificadas em até 47% dos carcinomas colorretais esporádicos, assim como em 58% dos adenomas com mais de um centímetro e com displasia de alto grau^{11,15,28,29,62,136}. Em comparação, apenas 9% dos adenomas com menos de 1 cm apresentavam estas mutações¹³⁶. Estes dados contrastam com os obtidos para as deleções e mutações do gene APC, indicando que as mutações do gene K-ras ocorrem em células carregando já dois alelos inativados do APC. Recentemente foram relatadas mutações do gene K-ras nos focos de criptas aberrantes, com freqüências de 58% a 73%^{74,105}. Nessas criptas os índices de mutação do APC são muito menores. Isto sugere que, com o APC intacto, uma mutação ativadora do K-ras leva apenas à formação da cripta aberrante, que é uma lesão não neoplásica e não progressiva. Por outro lado, a disfunção do APC é encontrada em focos displásicos de criptas aberrantes e em adenomas, e nestes casos o K-ras ativado dá uma certa "dianteira" para a proliferação neoplásica¹²². Frente a esses dados, pode-se dizer que as mutações do gene K-ras são fatores relativamente precoces na tumorigênese colorretal, ocorrendo antes das transformações malignas¹³⁶

A mutação encontrada mais frequentemente é uma mutação pontual no códon 12, embora possam ser encontradas mutações também nos códons 13 e 61^{11,33,126,136}. Estudos mais recentes indicam que, provavelmente, as variadas mutações do gene K-ras estariam relacionadas com diferenças de agressividade biológica, comportamento tumoral e prognóstico para o paciente, embora isto ainda não tenha sido confirmado^{8,31,32,126}

O gene K-Ras é o principal protooncogene encontrado no CCR, sendo de extrema valia na transdução regular de sinais estimuladores da proliferação celular. Quando mutado, porém, serve de potente estímulo para a carcinogênese colorretal.

3) Gene DCC

Estudos citogenéticos de 1985 mostraram que a deleção alélica do braço longo do cromossomo 18 era uma alteração genética relativamente comum no câncer colorretal⁸⁸ sendo posteriormente localizada no *locus* 18q2¹³⁶. A introdução do cromossomo 18 em linhagens celulares de CCR inibiu o potencial maligno destas células, indicando que o gene localizado na região deletada era um gene supressor tumoral³⁸. Através de estudos com clonagem posicional, pôde-se identificar e clonar um gene localizado nessa região, ao qual foi dado o nome de DCC (*Deleted in Colon Cancer*)²⁶

O gene DCC é um gene enorme, com mais de 1,35 milhões de pares de bases e no mínimo 29 éxons²⁶. Codifica uma proteína transmembrana com 180 kDa, 1447 aminoácidos e uma porção extracelular com domínios semelhantes à imunoglobulina e fibronectina III. Foi constatado que a estrutura da proteína do gene DCC é homóloga a das proteínas N-CAMs, que são moléculas de adesão celular neural envolvidas na comunicação intercelular⁴⁶. Deduziu-se, então, que a proteína DCC desempenha uma função essencial na modulação da adesão célula-célula, e, desse modo, modula o crescimento e a diferenciação celular na cripta colônica normal⁹¹

As deleções do cromossomo 18q ocorrem em aproximadamente 73% dos carcinomas esporádicos, 47% dos adenomas com áreas de microinvasão e apenas 11% dos adenomas sem áreas de microinvasão. Estes resultados sugerem que a perda do 18q é um evento relativamente tardio na carcinogênese colorretal^{19,27,28,29,136}.

Com a descoberta do gene DCC, vários estudos subseqüentes vem tentando estabelecer a correlação entre a perda do 18q e o estágio do tumor. Demonstrou-se que praticamente todas as metástases hepáticas apresentavam deleção do 18q⁹⁵. Um outro estudo constatou que 67% dos CCR nos estágios B e C de Dukes apresentavam perda total ou parcial do 18q, sendo esta perda maior nos tumores no estágio C. Esse estudo também mostrou que o prognóstico da doença em pacientes no estágio B e com deleção do 18q era semelhante ao prognóstico de pacientes no estágio C. Por outro lado, pacientes com tumores no estágio B sem deleção do 18q apresentavam prognóstico semelhante ao de pacientes com tumores no estágio A. Esses achados indicam que a deleção do 18q está fortemente relacionada com uma pior sobrevida para os pacientes com CCR, sugerindo que, provavelmente, a proteína DCC tem um papel supressor tumoral⁵⁴

Pode-se dizer que a deleção do 18q, com a perda de um ou mais genes supressores tumorais,

dentre eles o DCC, constitui uma alteração genética tardia que contribui na carcinogênese colorretal através do comprometimento do funcionamento adequado dos mecanismos de adesão célula-célula, levando ao surgimento dos padrões anormais de diferenciação celular observados no CCR e exacerbando o surgimento de metástases pela perda de contatos celulares.

4) Gene p53

Descrito pela primeira vez em 1979, é o gene mais frequentemente associado com o câncer e já foi postulado seu papel na carcinogênese em vários tecidos^{68,72}. O p53 é o gene supressor tumoral clássico, agindo na regulação do desenvolvimento e crescimento celular^{37,61,135}. Localizado no *locus* 17p13, ele codifica uma proteína de 53kDa e 393 aminoácidos que tem a característica especial de ser expressa quando o DNA celular sofre algum tipo de dano, como aquele causado por luz ultravioleta, irradiação ou agentes quimioterápicos. A proteína p53 se liga então pelo seu domínio no terminal C ao local danificado do DNA e interrompe as células na fase G do ciclo celular, impedindo a progressão desta no ciclo de replicação até que o dano ao DNA tenha sido reparado⁶⁹. Caso isto não ocorra, induz a célula a entrar em apoptose, para impedir a divisão celular e a perpetuação de material genômico alterado na linhagem celular¹¹⁹.

Os mecanismos pelos quais a proteína p53 bloqueia o ciclo celular e induz a apoptose estão parcialmente elucidados. Após se ligar à região do DNA danificada, a proteína ativa então a transcrição da proteína p21 que inibe certas enzimas quinases necessárias para a célula passar para a fase S do ciclo celular¹³⁹. Com isso, bloqueia o ciclo celular. O mecanismo de ativação da apoptose parece estar relacionado à modulação dos *Bcl-2* e *Bax*. Para iniciar a apoptose a proteína p53 ativa o gene *Bax*, que promove a apoptose, e inibe o gene *Bcl-2*, que reprime a apoptose. São os níveis relativos destas duas proteínas que vão determinar se a célula vai ou não entrar em apoptose^{84,94}. Pode-se deduzir facilmente que uma mutação do p53 o deixaria inefetivo e permitiria a divisão celular com a passagem de material genômico alterado para as células-filhas.

Do mesmo modo que a perda do APC parece ser o evento crucial para o desenvolvimento de um adenoma, a perda do p53 é crucial para a sua transformação maligna. Foi demonstrado que 75% dos casos de CCR apresentavam perda de função dos dois alelos do p53, geralmente um por mutação e o outro por deleção^{39,136}. A explicação para isto era de que provavelmente a proteína p53 mutada agia de modo dominante negativo sobre a proteína

selvagem, impedindo sua ação adequada e dando uma vantagem de crescimento para estas células, estimulando a replicação celular e facilitando a ocorrência da deleção do outro alelo³⁹. A frequência de perda dos dois alelos, porém, era muito menor nos adenomas sem microinvasão (6%) e com microinvasão (24%) indicando ser a inativação dos alelos do p53 um evento bem tardio na carcinogênese colorretal¹³⁶.

Mutações do p53 parecem conferir um prognóstico pior para o doente, estando associadas a um risco 2,39 vezes maior de morte^{4,43,110}. Um dos primeiros estudos sobre prognóstico mostrou que 17% dos pacientes com CCR sem deleção do 17p morriam de doença metastática, enquanto que 49% dos que tinham deleção morriam de doença metastática⁵⁶. Essa associação mostrou-se independente de outros fatores como idade, estágio ou conteúdo celular de DNA. Portanto, a detecção da mutação do p53 por técnicas de imunohistoquímica ou PCR poderá servir de importante ferramenta para prognóstico, procedimento este que já vem sendo feito para tumores de cabeça e pescoço¹³.

5) Genes de reparo do DNA (Mismatch Repair- MMR)

Mutações somáticas podem surgir na célula de diversas maneiras, causadas por substâncias mutagênicas tanto endógenas como exógenas. Outra possível fonte de mutações somáticas são os erros cometidos pela DNA polimerase durante a replicação do DNA. Estima-se que esses erros ocorram a cada 10^5 bases, sendo que 99% são corrigidos pela própria enzima, deixando então um erro a cada 10^7 bases. É ativado então o sistema de Mismatch Repair (MMR) do DNA da célula, cuja principal função é o reconhecimento e correção de três tipos de erros: pareamento desigual de bases simples, bases quimicamente alteradas e alças na hélice. No primeiro tipo de erro, a DNA polimerase falha em parear um nucleotídeo na fita-padrão de DNA com o seu complemento correto na fita nova que está sendo sintetizada. No segundo tipo de erro, a polimerase incorpora bases modificadas quimicamente por mutágenos na fita nova que está sendo sintetizada. O terceiro tipo de erro ocorre quando a polimerase se vê face a uma sequência muito repetitiva de DNA, como muitos nucleotídeos A (polyA) ou muitos dinucleotídeos GA. Se a sequência da fita-padrão é altamente variada, a sequência da fita-nova só pode ser de um único jeito. Porém, se a fita padrão tem uma sequência muito repetitiva, a DNA polimerase pode errar e permitir a inclusão de um ou dois nucleotídeos extras. Se o sistema MMR falhar, começam a ocorrer mutações com uma frequência muito maior^{6,34,50,51,64,65,116}.

Muito antes de ser descoberto nos seres humanos, o sistema MMR já era estudado em organismos mais simples. Na bactéria *Escherichia coli* três proteínas constituíam o cerne do sistema: as proteínas codificadas pelos genes *mutS*, *mutL* e *mutH*³⁰. Também se encontraram genes homólogos aos das bactérias em leveduras, os genes *yMSH2*, *yMLH1* e *yPMS1*^{108,109}. Notou-se que mutações nos genes MMR tanto das bactérias como dos fungos levavam a um fenótipo de desestabilização.

Os microssatélites são regiões do genoma que consistem de repetições de um, dois ou três nucleotídeos. São altamente polimórficas quanto ao seu comprimento, de modo que uma mesma pessoa tem em geral dois alelos diferentes para cada microssatélite. No entanto, as sequências que flanqueiam as microssatélites são extremamente estáveis. Isso permitiu a análise do comprimento das microssatélites pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia de Polimerase)^{50,51,64,116,128}. Ao mesmo tempo que se analisavam mutações do sistema MMR em bactérias, percebeu-se que ocorriam fenômenos semelhantes com as sequências microssatélites em tumores humanos. Foi dado a este fenótipo o nome de Instabilidade de Microssatélites (MSI) ou fenótipo RER+ (*Replication Error Positive*) e constatado que estava associado ao HNPCC. Foi o primeiro passo na caracterização das alterações genéticas que levam ao HNPCC^{52,64,77,78,80,81,98,102,103,120,131,133}.

Iniciaram-se então os estudos para identificar os genes homólogos do sistema MMR no ser humano¹⁴⁴. O primeiro a ser identificado e clonado foi o *hMSH2*, localizado no cromossomo 2p, homólogo da *mutS*^{30,70}. Seguiu-se a identificação do gene *hMLH1*, no cromossomo 3p21, homólogo da *mutL*^{71,100}, e dos genes *hPMS1* e *hPMS2*, nos *locus* 2q31-33 e 7p22⁹⁰. Recentemente foi identificado o gene *hMSH6*, também conhecido como *hGTBP*, outro homólogo da *mutS*^{23,97}. Os estudos mais recentes têm focalizado a interação e função dos produtos protéicos dos genes MMR. Sabe-se que a proteína *hMSH2* aparentemente tem a função chefe no serviço de reconhecimento de erros de pareamento de bases. Ela age, porém, formando um dímero com a proteína *hMSH6*, para formar o complexo *hMSH2/hMSH6*, homólogo do complexo *mutS-alpha* encontrado na *E. coli*. A *hMLH1* também forma um dímero, se juntando à *hPMS2*, e este complexo vai agora interagir com o complexo formado pela *hMSH2/hMSH6*. A função do *hPMS1* ainda não foi devidamente elucidada.

Os genes MMR parecem seguir o padrão de gene supressor tumoral na definição de sua capacidade carcinogênica no HNPCC, requerendo uma segunda mutação somática após a mutação germinativa para que haja uma perda efetiva de função

e ocorra a carcinogênese. Em algumas linhagens celulares, porém, segue-se o padrão dominante-negativo, em que a presença de apenas uma mutação confere o fenótipo maligno à célula. Acredita-se que nestes casos a proteína mutada interaja com a proteína selvagem impedindo sua ação adequada.

5.1) Mutações dos genes MMR no HNPCC e no CCR esporádico

a) Mutação do *hMSH2* no HNPCC

O primeiro gene a ser identificado, sabe-se que apenas uma mutação na linhagem germinativa não é suficiente para causar o fenótipo RER+ requerendo uma mutação somática do alelo selvagem restante^{30,70}. Calcula-se que mutações neste gene estariam presentes em aproximadamente 40% das famílias com HNPCC^{73,79}.

b) Mutação do *hMLH1* no HNPCC

Semelhantemente ao *hMSH2*, a mutação em um único alelo não é suficiente para causar o fenótipo RER+¹⁰¹. As mutações em *hMLH1* foram detectadas em 24 a 47% dos pacientes com HNPCC^{44,63,79,93,146}. A maioria das mutações (70%) resulta numa proteína truncada¹⁴⁵.

c) Mutação do *hPMS1* e do *hPMS2* no HNPCC

Com função pouco conhecida, não são responsáveis por 10% das mutações encontradas em pacientes com HNPCC⁹⁰.

d) Mutação do *hMSH6/hGTBP* no HNPCC

Muito embora não tenham sido encontradas mutações germinativas em pacientes com HNPCC, mutações do gene induzidas *in vitro* levam as células afetadas a adquirirem o fenótipo maligno⁹⁹.

e) Mutação dos genes MMR no CCR esporádico

Os primeiros estudos constataram que 28% dos CCR esporádicos são RER+ com uma frequência maior nos tumores proximais do que nos distais. Em geral eram tumores com melhor prognóstico e menor probabilidade de terem perda de heterozigosidade nos cromossomos 5q, 17p e 18q¹³¹. Outro estudo correlacionou o fenótipo RER+ com características patológicas dos tumores, mostrando que os tumores com fenótipo RER+ eram em geral proximais, maiores e mais indiferenciados⁵⁷.

Para avaliar o momento da ocorrência da mutação, estudou-se a frequência do fenótipo RER+ em adenomas (3%) comparado com a frequência em CCR (16%), levando à conclusão que a mutação dos genes MMR não é um mecanismo importante na progressão inicial dos tumores. Conclui-se que a importância dos genes MMR no CCR esporádico se limita ao percentual (15%) de tumores que apresentam IMS e fenótipo RER+¹.

6) Gene MCC (*Mutated in Colon Cancer*)

A pesquisa pelo gene responsável pela PAF identificou um gene no cromossomo 5 *locus* q21 que foi denominado MCC⁵⁹. Um grande número de tumores de cólon esporádicos tiveram mutações no MCC identificadas. Entretanto, não foram encontradas mutações desse gene nas células germinativas em pacientes com PAF, eliminando a possibilidade de esse gene ser o responsável pela doença⁹². Muitos estudos demonstraram perda de heterozigose no *locus* MCC em adenocarcinomas colorretais, sugerindo que MCC é um gene supressor tumoral. Todavia, o MCC está ligado proximamente ao APC, tornando a interpretação difícil. De fato, um estudo de 21 tumores com perda de heterozigose do *locus* do MCC falhou em encontrar mutações no outro alelo restante em qualquer um dos tumores, e nenhum deles apresentava perda de heterozigose do MCC ou do APC separadamente²¹. Portanto, a função do MCC na oncogênese ainda é incerta.

A proteína MCC provavelmente funciona no controle do ciclo celular. Embora os níveis totais de MCC não se alterem conforme a célula entre ou passe pela fase S (de síntese de DNA), a proteína é fosforilada nessa fase. Adicionalmente, a expressão aumentada de MCC normal inibiu a entrada celular na fase S.

7) Gene CD44

A glicoproteína de superfície celular CD44 é um receptor de linfócitos com participação no endereçamento destes, mas também está presente em muitos outros tecidos. A sua provável função era, assim, de mediar as interações célula-célula e célula-substrato. Em 1991, foi isolado o cDNA de uma proteína que era homóloga ao CD44, usando um anticorpo monoclonal contra células de adenocarcinoma pancreático metastático de ratos⁴². Essa proteína, entretanto, era maior do que a expressada normalmente e foi demonstrada ser uma variante de *splicing* encontrada somente em tumores metastáticos. Em contraste com células-controle transfectadas somente com o vetor, quando essa variante era expressada em linhagem de células cancerosas não metastatizantes e injetadas em animais singênicos, os tumores desenvolviam metástases à distância. Subsequentemente, foi observado que um homólogo humano a essa variante de *splicing* de CD44 estava presente em muitos tecidos normais como a pele, mas ausente de outros como epitélio colônico normal. Entretanto, utilizando anticorpos específicos a essa variante, identificou-se uma expressão robusta em cânceres de cólon e mama e em pólipos adenomatosos^{47,113}. Nos pólipos,

a presença de CD44 estava associadas com áreas de displasia moderada a intensa.

O gene do CD44 é composto de 19 éxons em sua totalidade. A forma expressada em linfócitos é ausente dos éxons 7 a 14, que são processados fora durante o *splicing*. A variante do *splicing* insere alguns desses éxons e geralmente apresenta uma variedade de combinações, gerando um grande número de produtos na análise por eletroforese¹¹³. O éxon 10 tem sido implicado como o éxon mais comum que se correlaciona com o potencial metastático, mas outras variantes de éxons provavelmente também apresentam o seu papel.

Embora não se saiba ainda o mecanismo pelo qual a variante de CD44 possibilite a capacidade metastatizante, seu significado clínico reside na observação de que a expressão da variante do CD44 parece ser um indicador de prognóstico independente, prevendo uma incidência maior de recorrências e de mortalidade¹³⁷. Isso possibilita a identificação de subgrupos específicos de pacientes que poderiam se beneficiar de um manejo no pós-operatório mais agressivo, além de uma nova técnica de rastreamento¹³⁸.

8) C-myc

O gene c-myc é um membro da família de oncogenes, identificado primeiramente como um homólogo do oncogene transformante v-myc do vírus da mielocitomatose de aves. Em células mamárias, a expressão do c-myc em associação com H-ras resulta em transformação das células de cultura⁶⁶. C-myc codifica uma fosfoproteína de 62 kilodaltons localizada tanto no citoplasma como no núcleo, que se liga ao DNA e ativa a transcrição. A ativação do c-myc com o aumento do RNAm e da proteína mostraram estar associados com a proliferação celular em inúmeros tecidos. O mecanismo de expressão aumentada em algumas circunstâncias é devido ao rearranjo do gene com perda subsequente do controle normal da sua expressão gênica.

Na mucosa colônica normal, a expressão de c-myc ocorre no camada proliferativa, ou seja, no terço inferior das criptas^{82,114}. Aproximadamente 25% das células apresentam níveis elevados da proteína, detectada por imunocitoquímica primariamente dentro do núcleo. Níveis elevados de expressão de c-myc têm sido identificados frequentemente em células neoplásicas colorretais por análise tanto do RNAm^{121,123} quanto das proteínas^{82,114}. Em pólipos adenomatosos, a proteína também é encontrada nas camadas mais superficiais, refletindo a expansão já conhecida dos compartimentos proliferativos dessas lesões. Em adenocarcinomas, a expressão de c-myc é heterogênea, mas na maioria dos casos há ativação

aumentada do gene com maior quantidade de RNAm e proteína nas células malignizadas. O mecanismo de ativação de c-myc nessas neoplasias é desconhecido, porque somente uma minoria parece resultar de amplificação gênica^{2,25,123}. Somente uma associação da ativação de c-myc com câncer colorretal foi descrita e se há uma causalidade na oncogênese esta ainda deverá ser melhor determinada. Caso exista, a mutação parece ocorrer na fase inicial da seqüência adenoma-carcinoma.

9) Gene src

Este gene originalmente foi identificado como um homólogo celular do oncogene v-src (gene transformante do vírus do sarcoma de Rous). O c-src codifica um membro da família src de oncoproteínas. O seu produto, pp60, o primeiro protooncogene descoberto, é uma proteína tirosino-quinase. A expressão de pp60 ativado, assim como a de seu homólogo, é capaz de transformar células, aumentando a atividade proliferativa conforme cresce a atividade de pp60.

Estudos já mostraram atividade de pp60 aumentada em carcinomas de cólon e em pólipos pré-malignos^{9,17,18}. Os níveis de atividade se correlacionam com o estágio da neoplasia. Pólipos menores de 2 cm apresentam os mesmos níveis de atividade de células normais da mucosa, enquanto em pólipos a partir de 2 cm até lesões metastatizantes se observa uma correlação com o estágio da neoplasia e essa atividade¹³⁰. Também se notou correlação entre o grau da displasia e o grau histológico com a atividade de pp60¹⁸, sendo consistente a elevação dessa atividade de acordo com o grau de displasia em epitélios colônicos de pacientes com colite ulcerativa¹⁶. Níveis altos de atividade de pp60 foram ainda encontrados em cânceres moderadamente e bem diferenciados, mas em tumores pobremente diferenciados a atividade era similar a daquela do tecido normal¹⁴³. No tecido neoplásico, há um aumento moderado na quantidade de pp60, mas a sua atividade está aumentada. Assim, src está elevado em células de neoplasias colorretais em um estágio inicial, mas a sua função na proliferação epitelial ainda não está bem esclarecida, devendo atuar durante a mitose.

10) Gene da enzima COX-2

Estudos epidemiológicos demonstraram que o uso crônico da aspirina resulta em um risco reduzido de câncer colorretal³⁶ e que o tratamento com sulindac de pacientes com PAF causa regressão dos pólipos retais³⁵. Esses medicamentos, drogas

anti-inflamatórias não esteróides (DAINES), funcionam reduzindo os níveis teciduais de metabólitos do ácido araquidônico, ou eicosanóides. Duas enzimas são responsáveis pela síntese de eicosanóides: ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2). A primeira é uma enzima presente na maioria dos tecidos. Em contraste, COX-2 não é expressa em condições normais, mas é induzida por citocinas inflamatórias, fatores de crescimento ou promotores de tumor. Como os níveis de COX-1 não se alteram significativamente, acredita-se que COX-2 apresente o principal papel na resposta inflamatória. As DAINES inibem não especificamente a atividade de COX-1 e COX-2.

Baseado em parte nos efeitos das DAINES nas neoplasias do cólon, foi investigado o efeito da COX na carcinogênese colorretal. Os níveis de Prostaglandina E2 estão elevados significativamente em CCR e pólipos, embora não em todos os tumores^{107,111}. Os níveis da COX-2 são muito baixos no epitélio colônico normal, mas apresentam-se elevados em CCR e pólipos²⁴. Em todos os estudos, não foram identificados diferenças significativas nos níveis de COX-1 entre o epitélio neoplásico e o normal. Esse estudo demonstra uma associação mas não um papel causal da COX-2 no câncer colorretal. Três estudos subsequentes demonstraram uma função direta da enzima. Transformações permanentes da linhagem de célula epitelial intestinal de rato expressando COX-2 foram gerados¹³². Quando as células cresciam na laminina ou em um modelo de membrana basal, houve maior proliferação e adesão nas células expressando COX-2. Adicionalmente, quando medido diretamente, houve comparativamente menor apoptose. Todas essas observações foram revertidas com o uso do inibidor sulindac. Todos esses achados possibilitaram a conclusão de que 5em um modelo de cultura de tecidos a expressão da COX-2 resultou em menor diferenciação, aumento da proliferação e da adesão célula-matriz e menor apoptose, todas essas manifestações fenotípicas sendo propriedades típicas de neoplasia.

Recentemente, em um modelo de PAF em rato Min¹⁰ demonstrou-se que COX-2 está envolvida na carcinogênese. Observou-se que a proteína COX-2 e os níveis de PGE2 estavam elevados na mucosa normal desses animais heterozigotos, em comparação com a de ratos sem alteração gênica para PAF. Adicionalmente, os níveis de apoptose estavam diminuídos no terço superior do viló do epitélio. Quando tratados com sulindac, todas essas anormalidades foram revertidas e próximo da totalidade da formação dos tumores foram inibidas nesses animais. Em outra pesquisa⁹⁶, estudaram-se camundongos com knockout, heterozigotos para APC e heterozigotos ou homozigotos para COX-2. Com expressão diminuída para COX-2, esses animais

desenvolveram menos pólipos intestinais e colônicos, sendo que aqueles homozigotos para o knockout de COX-2 apresentaram um decréscimo de 86% em comparação com os controles. Adicionalmente, todos os pólipos eram significativamente menores como um resultado da redução do COX-2. Por sua vez, quando os animais heterozigotos para APC, mas apresentando COX-2 normal, foram tratados com um inibidor específico da atividade enzimática de COX-2, apresentaram 50 a 60% de redução no número de pólipos, em comparação com uma redução de 26% quando tratados com sulindac. Esses estudos demonstraram que COX-2 apresenta um impacto direto

no desenvolvimento de pólipos colônicos e cânceres. Deve-se ressaltar que, apesar de COX-2 estar presente predominantemente na lâmina própria das células do vilo e pólipos nesse estudo, nos cânceres humanos estava localizado nas células cancerosas derivadas do epitélio¹¹⁸. A diferença em relação aos pólipos humanos para os de rato pode ser devido a diferenças entre espécies ou do estudo de PAF em relação a tumores esporádicos. Entretanto, é inegável que a expressão de COX-2 parece apresentar um papel significativo na via da carcinogênese colorretal.

Os genes envolvidos no CCR estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3 Genes envolvidos na carcinogênese colorretal.

Categoria	Nome	Função do gene na patogênese do câncer
Supressores tumorais	APC	Sua perda afeta a regulação do ciclo celular e da apoptose; controla os níveis citoplasmáticos da proteína b-catenina, que funciona como um ativador da transcrição de DNA.
	DCC	Molécula de adesão celular; perda de função é estímulo para comportamento metastático
	p53	Regula o ciclo celular e a apoptose após dano ao DNA; perda de função leva à replicação celular mesmo em face de mutações no DNA.
	MCC	Função desconhecida; efeito da perda de função desconhecido
Oncogenes	K-ras	Proteína de ligação com o GTP e intermediária na via de sinalização de fatores de crescimento; mutação leva à sua ativação constante e estimulação irrefreada à replicação do DNA
	src	Enzima tirosina quinase; tem atividade elevada em adenomas e carcinomas, porém os mecanismos que levam à sua ativação são desconhecidos
	c-myc	Ativador de transcrição; expressão aumentada em neoplasias do cólon, porém os mecanismos de amplificação são desconhecidos
Genes Mismatch Repair	hMSH2 hMLH1 hMSH6 hPMS1 hPMS2	Fazem parte do sistema de reparo do DNA; perda leva ao fenótipo de instabilidade de microssatélites e à hipermutabilidade do DNA
Outros Genes	CD44v	Glicoproteína de superfície celular; molécula de adesão celular relacionada com doença metastática.
	COX-2	Gene da enzima Ciclooxigenase-induzível; inibe diferenciação celular no epitélio intestinal e diminui apoptose.

CONCLUSÃO

A elucidação completa dos mecanismos genéticos envolvidos na patogênese molecular do CCR é um fator de grande relevância na busca da diminuição tanto da mortalidade do CCR, que

permanece praticamente inalterada nas últimas décadas, quanto no impacto social imposto por tal doença. Ao passo que o conhecimento obtido através da genética avança, é possível desenvolver métodos

de investigação e diagnóstico mais sensíveis e específicos, como o rastreamento para populações de alto risco. Do mesmo modo, nos próximos anos o conhecimento genético deverá sedimentar-se como um dos fatores de maior peso na decisão terapêutica e na abordagem do paciente com tal patologia. Ademais, a elaboração de tratamentos alternativos à cirurgia, um procedimento invasivo com seu risco inerente, também parece possível através da terapia

gênica. Portanto, é inegável a importância para clínicos e cirurgiões da área digestiva entenderem os mecanismos genéticos envolvidos na gênese do CCR, uma vez que toda conduta médica em relação a essa doença certamente, num futuro não distante, apresentará como base o quadro genético. Familiarizar-se com a Genética do Câncer Colorretal e os avanços nessa área torna-se, portanto, imperativo para esses profissionais.

Cotti GCC, Santos FPS, Sebastianes FM, Habr-Gama A, Seid VE, Martino RB. Genetics of colorectal cancer. Rev Med (São Paulo) 2000 abr./dez.;79(2/4):45-64.

ABSTRACT: Colorectal cancer (CRC) is one of the most important neoplasms not only for its prevalence but also for its incidence, accounting for 10% of all the neoplasms in the USA. However, its mortality remained unaffected in the last 50 years. Since Morson described the adenoma-carcinoma sequence for the first time in 1978, the elucidation of the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of CRC became intensively studied and many progresses were obtained. Several genes, like APC, DCC and p53, among others, were identified as participants of the adenoma-carcinoma sequence. They are involved in the multi-step process of the tumorigenesis, where the accumulation of genetic mutations in unstable cells represents the most important factor, which ends up rising the cancer. There are two basic types of CRC: the sporadic, that accounts for 85% of the total of cases of CRC; and the familial, with about 15% of the cases, which includes the Adenomatous Polyposis of the Colon (APC) and the Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC). The mechanisms of action of such genes are now being described and research is being made to determine their prognostic value. One expects that the complete elucidation of such mechanisms will allow a decrease not only on the mortality, but also on the social impact imposed by such disease. Moreover, alternative treatments for surgery seem possible by gene therapy. Therefore, it is imperative for gastrointestinal surgeons and physicians to be familiarized with the genetics of the colorectal cancer.

KEYWORDS: Colorectal neoplasms/genetics; Colorectal neoplasms/epidemiology; Sequence/genetics; Adenomatous polyposis coli/genetics; Adenocarcinoma/epidemiology; Adenocarcinoma/genetics; Mutation/genetics.

REFERÊNCIAS

1. Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP, Järvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G, Juhola M, et al. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1994;54(7):1645-8.
2. Albanese I, Albert M, Bazan V, Russo A, Baiamonte S, Migliavacca M, Bazan P, La Farina M. Structural analysis of c-myc in human sporadic colorectal carcinomas. *Anticancer Res* 1994;14:1103-6.
3. Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long term risk of colorectal cancer after excision of retossigmoid adenomas. *N Engl J Med* 1992;326:658-62.
4. Auvinen A, Isola J, Visakorpi T, Koivula T, Virtanen S, Hakama M. Overexpression of p53 and long term survival in colon carcinoma. *Br J Cancer* 1994;70:293-6.
5. Barbacid M. ras genes. *Ann Rev Biochem* 1987;56:779-827
6. Barnes DE, Lindahl T, Sedgwick B. DNA repair. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:424-33.
7. Baserga R, Stein GS, Denhardt DT, Giordano A: The molecular basis of cell cycle and growth control. New York: Wiley, Johns & Sons; 1998.
8. Benhattar J, Losi L, Chaubert P, Givel JC, Costa J. Prognostic significance of K-ras mutations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 1993;104:1044-8.
9. Bérout C, Soussi T: APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucl Acid Res* 1996;24:121-4.
10. Boolbol SK, Dannenberg AJ, Chadburn A, Martucci C, Guo XJ, Ramonetti JT, Abreu Goris M, Newmark HL, Lipkin ML, DeCosse JJ, Bertagnolli MM. Cyclooxygenase -2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of adenomatous polyposis. *Cancer Res* 1996;56:2556-60.
11. Bos H, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan de Vries M, van Boon JH, van der Eb AJ, Vogelstein B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987;327:293-7
12. Bos JL. p21 ras: an oncoprotein functioning in growth factor-induced signal transduction. *Eur J Cancer* 1995;31A:1051-4.

13. Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, Goodman SM, Sidransky D. Molecular assessment of histopathological staging in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995;332:429-35.
14. Browne SJ, Willians AC, Hague A, Butt AJ, Paraskeva C. Loss of APC protein expressed by human colonic epithelial cells and the appearance of a low-molecular-weight form is associated with apoptosis in vitro. *Int J Cancer* 1994;59:56-64.
15. Capella G, Cronaues-Mitra S, Peinado MA, Peruch M. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environ Health Perspect* 1991;93:125-31.
16. Cartwright CA, Coad CA, Egbert BM. Elevated c-Src tyrosine kinase activity in premalignant epithelia in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 1994;93:509-15.
17. Cartwright CA, Kamps MP, Meisler AI, Pipas JM, Eckhart W. pp60^{c-src} activation in human colon carcinoma. *J Clin Invest* 1989;83:2025-33.
18. Cartwright CA, Meisler AI, Eckhart W. Activation of the pp60^{c-src} protein kinase is an early event in colonic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:558-62.
19. Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence. *Cancer* 1992;70:1727-31.
20. Cowin P. Unravelling the cytoplasmic interactions of the cadherin superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10759-61.
21. Curtis LJ, Bubb VJ, Gledhill S, Morris RG, Bird CC, Wyllie AH. Loss of heterozygosity of MCC is not associated with mutation of the retained allele in sporadic colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 1994;3:443-6.
22. de Vries JE, ten Kate J, Bosman FT. p21 ras in carcinogenesis. *Pathol Res Pract* 1996;192:658-68.
23. Drummond JT, Li G-M, Longley MJ, Modrich P. Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cell. *Science* 1995;268:1909-12.
24. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994;107:1183-88.
25. Erisman MD, Scott JK, Watt RA, Astrin SM. The c-myc protein is constitutively expressed at elevated levels in colorectal carcinoma cell lines. *Oncogene* 1988;2:367-78.
26. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Rupert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in human colorectal cancers. *Science* 1990;247:49-56.
27. Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 1987;238:193-7.
28. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
29. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1995;768:101-10.
30. Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027-38.
31. Finklestein SD, Sayegh R, Bakker A, Swalsky PA. Determination of tumor aggressiveness in colorectal cancer by K-ras-2 analysis. *Arch Surg* 1993;128:526-31.
32. Finklestein SD, Sayegh R, Christensen S, Swalsky PA. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 1993;71:3827-38.
33. Forrester K, Almoguerra C, Han K, Grizzle WE, Percuho M. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colorectal tumorigenesis. *Nature* 1987;327:298-303.
34. Friedberg EC, Walker GC, Siede W. DNA repair and mutagenesis. Washington: ASM Press; 1995.
35. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi, Hyland LM, Celano P, Booker SV, Robinson CR, Offerhaus GJ. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993;328:1313-6.
36. Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Speizer FC. Aspirin and the risk of colorectal cancer in human. *N Engl J Med* 1995;333:609-14.
37. Gottlieb TM, Oren M. p53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta* 1996;128:77-102.
38. Goyette MC, Cho K, Fasching CL, Levy DB, Kinzler KW, Paraskeva C, Vogelstein B, Stanbridge EJ. Progression of colorectal cancer is associated with multiple tumor suppressor gene defects but inhibition of tumorigenicity is accomplished by correction of any single defect via chromosome transfer. *Mol Cell Biol* 1992;12:1387-95.
39. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4855-78.
40. Groden J, Gelbert L, Thliveris A, Nelson L, Robertson M, Joslyn G, Samowitz W, Spirio L, Carlson M, Burt R, et al. Mutational analysis of patients with adenomatous polyposis: Identical inactivating mutations in unrelated individuals. *Am J Hum Genet* 1993;52:263-72.
41. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J,

- Spirio L, Robertson M, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991;66:589-600.
42. Günthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann Y, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991;65:13-24.
 43. Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jeco N, Asselain B, Remvikos Y, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1994;106:42-8.
 44. Han H-J, Maruyama M, Baba S, Park JG, Nakamura Y. Genomic structure of human mismatch repair genes hMLH1 and its mutation analysis in patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). *Hum Mol Genet* 1995;4:237-42.
 45. Hauser IJ, Weller CV. A further report of the cancer family of Warthin. *Am J Cancer* 1936;27:434-49.
 46. Hedrick L, Cho KR, Fearon ER, Wu TC, Kinzler KW, Vogelstein B. The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes Dev* 1994;8:1174-83.
 47. Heider K-H, Hofmann M, Hors E, van den Berg F, Ponta H, Herrlich P, Pals ST. A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J Cell Biol* 1993;120:227-33.
 48. Herrera L, Kakati S, Gibas L, Pietrzak E, Sandberg AA. Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet* 1986;25:473-6.
 49. Hill MJ, Morson BC, Bussey HJ. A etiology of adenoma-carcinoma sequence in large-bowel. *Lancet* 1978;1:245-7
 50. Hoejmakers JH. Nucleotide excision repair I: from *E. coli* to yeast. *Trends Genet* 1993;9:173-77
 51. Hoejmakers JH: Nucleotide excision repair II: from yeast to mammals. *Trends Genet* 1993;9:211-7
 52. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61.
 53. Jass JR. Colorectal adenoma progression and genetic change: Is there a link? *Ann Med* 1995;27:301-6.
 54. Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR. Allelic losses of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994;331:213-21.
 55. Joslyn G, Carlson M, Thliveris A, Albertsen H, Gelbert L, Samowitz W, Groden J, Stevens J, Spirio L, Robertson M. Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell* 66: 601-13, 1991.
 56. Kern SE, Fearon ER, Tersmette KWF, Enterline JP, Leppert M, Nakamura Y, White R, Vogelstein B, Hamilton SR. Allelic loss in colorectal carcinomas. *JAMA* 1989;261:3099-103.
 57. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994;145:148-56.
 58. Kinzler KW, Nilbert MC, Su L, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D, et al. Identification of FAP locus gene from chromosome 5q21. *Science* 1991;253:661-5.
 59. Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hamilton SR, Hedge P, Markham A, et al. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 1991;251:1366-70.
 60. Knudson AG. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 45: 1437-43, 1985.
 61. Ko LJ, Prives C. p53: Puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996;10:1054-72.
 62. Kobayashi M, Watanabe H, Ajioka Y, Honma T, Asakura H. Effect of K-ras mutations on morphogenesis of colorectal adenomas and early cancers. *Hum Pathol* 1996;27:1042-9.
 63. Kolodner RD, Hall NR, Lipford JM, Kane MF, Morrison PT, Finan PJ, Burn J, Chapman P, Earabino C, Merchant E, et al. Structure of the human MLH1 locus and analysis of a large hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma kindred for MLH1 mutations. *Cancer Res* 1995;55:242-8.
 64. Kolodner RD. Mismatch repair: Mechanism and relationship to cancer susceptibility. *TIBS* 1995;20:397-401.
 65. Kornberg A, Baker TA. DNA replication. 2nd ed. New York: W.H. Freeman; 1992.
 66. Land H, Parada LF, Weinberg RA. Tumorigenic conversion of primary embryos fibroblast requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 1983;304:596-601.
 67. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics: 1998. *CA Cancer J Clin* 1998;48:6-29.
 68. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 1979;278:261-3.
 69. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-6.
 70. Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nyström Lahti M, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993;75:1215-25.

71. Lindblom A, Tannergård P, Werelius B, Nordenskjöld M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat Genet* 1993;5:279-82.
72. Linzer DIH, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular tumor antigen present in SV40-transformed and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979;17:43-52.
73. Liu B, Parsons RE, Hamilton SR, Petersen GM, Lynch HT, Watson P, Markowitz S, Willson JK, Green J, de la Chapelle A, et al. hMSH2 mutations in hereditary non-polyposis colorectal cancer kindreds. *Cancer Res* 1994;54:4590-4.
74. Losi L, Roncucci L, di Gregorio C, de Leon MP, Benhattar J. K-ras and p53 mutations in human colorectal aberrant crypt foci. *J Pathol* 1996;178:259-63.
75. Lynch HT, Krush AJ. Cancer family "G" revisited: 1895-1970. *Cancer* 1971;27:1505-11
76. Lynch H, Lynch J: Genetics of colonic cancer. *Digestion* 1998;59:481-92.
77. Lynch HT, Smyrk T, Lynch JF. Overview of natural history, molecular and genetics and management of HNPCC (Lynch syndrome). *Int J Cancer* 1996;69:38-43.
78. Lynch HT, Smyrk T, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: An updated review. *Gastroenterology* 1993;104:1535-49.
79. Maliaka YK, Chudina AP, Belev NF, Alday P, Bochkov NP, Buestedde JM. CpG dinucleotides in the hMSH2 and hMLH1 genes are hotspots for HNPCC mutations. *Hum Genet* 1996;97:251-5.
80. Marra G, Boland CR. DNA repair and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1996;25:755-72.
81. Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: The syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1114-25.
82. Melhem MF, Meisler AI, Finley GG, Bryce WH, Jones MO, Tribby II, Pipas JM, Koski RA. Distribution of cells expressing myc proteins in human colorectal epithelium, polyps, and malignant tumors. *Cancer Res* 1992;52:5853-64.
83. Miller JR, Moon RT. Signal transduction through β -catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes Dev* 1996;10:2527-39.
84. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995;80:293-9.
85. Miyoshi Y, Ando H, Nagase H, Nishisho I, Horii A, Miki Y, Mori T, Utsinomiya J, Baba S, Petersen G: Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4452-6.
86. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1992;1:229-33.
87. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin- Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997;275:1787-90.
88. Muleris M, Salmon RJ, Zafrani B, Girodet J, Dutrillaux B. Consistent deficiencies of chromosome 18 and the short arm of chromosome 17 in eleven cases of human large bowel cancer; A possible recessive determinism. *Ann Genet (Paris)* 1985;28:206-13.
89. Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P Regulation of intracellular β -catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3046-50.
90. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wey YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;371:75-80.
91. Nigam AK, Savage FJ, Boulos PB, Stamp GW, Liu D, Pignatelli M. Loss of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1993;68:507-14.
92. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsinomiya J, Baba S, Hedge P. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991;253:665-9.
93. Nystrom-Lahti M, Parsons R, Sistonen P, Pihlkkänen L, Aaltonen LA, Leach FS, Hamilton SR, Watson P, Bronson E, Fusaro R, et al. Mismatch repair genes on chromosome 2p and 3p account for a major share of hereditary non-polyposis colon cancer (HNPCC) families evaluable by linkage. *Am J Hum Genet* 1994;55:659-65.
94. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-19.
95. Ookawa K, Sakamoto M, Hirohashi S, Yoshida Y, Sugimura T, Terada M, Yokota J. Concordant p53 and DCC alterations and allelic losses on chromosomes 13q and 14q associated with liver metastases of colorectal cancer. *Int J Cancer* 1993;53:382-7
96. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM Suppression of intestinal polyposis in Apc knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996;87:803-9.

97. Palombo F, Gallinari P, Iaccarino I, Lettieri T, Hughes M, Darrigo A, Truong O, Hsuan JJ, Jiricny J. GTBP, a 160 kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science* 1995;268:1912-4.
98. Papadopoulos N, Lindblom A. Molecular basis of HNPCC: mutations of MMR genes. *Hum Mut* 1997;10:89-99.
99. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Liu B, Parsons R, Lengauer C, Palombo F, Darrigo A, Markowitz S, Wisson JK, Kinzler KW, et al. Mutations of GTBP in genetically unstable cells. *Science* 1995;268:1915-7
100. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994;263:1625-9.
101. Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogenstein B, Modrich P. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 1993;75:1227-36.
102. Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez A, Perucho M. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10065-9.
103. Perucho M, Peinado MA, Ionov Y, Casares S, Malkhosyan S, Stanbridge E. Defects in replication fidelity of simple repeated sequences reveal a new mutator mechanism for oncogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994;59:339-48.
104. Presciuttini S, Varesco L, Sala P, Gismondi V, Rosseti C, Bafico A, Ferrara GB, Bertaiolo L. Age of onset in familial adenomatous polyposis: Heterogeneity within families and among APC mutations. *Ann Hum Genet* 1994;58:331-42.
105. Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC, Cheyer C, Kaplan EL. K-ras mutations in putative preneoplastic lesion in human colon. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:2004-7
106. Pro-Onco. Estimativa da incidência e mortalidade por Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 1996, 19p.
107. Pugh S, Thomas GAO. Patients with adenomatous polyps and carcinoma have increased colonic mucosal prostaglandin E2. *Gut* 1994;35:675-8.
108. Reenan RA, Kolodner RD. Characterization of insertion mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* MSH1 and MSH2 genes: evidence for separate mitochondrial and nuclear functions. *Genetics* 1992;132:975.
109. Reenan RA, Kolodner RD. Isolation and characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding homologs of the bacterial HexA and MutS mismatch repair proteins. *Genetics* 1992;132:963-73.
110. Remvikos Y, Tominaga O, Hammel P, Laurent-Puig P, Salmon RJ, Dutrillaux B, Thomas G. Increased p53 protein of colorectal tumours correlates with poor survival. *Br J Cancer* 1992;66:758-64.
111. Rigas B, Goldman IS, Levine L. Increased eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med* 1993;122:518-23.
112. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1998.
113. Rodriguez C, Monges G, Rouanet P, Dutrillaux B, Lefrançois D, Theillet C. CD44 expression patterns in breast and colon tumors: A PCR-based study of splice variants. *Int J Cancer* 64: 347-54, 1995.
114. Royds JA, Sharrard RM, Wagner B, Polacz SV. Cellular localization of c-myc product in human colorectal neoplasia. *J Pathol* 1992;166:225-33.
115. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Müller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P. Association of the APC gene product with β -catenin. *Science* 1993;262:1731-4.
116. Sancar AZ, Sancar GB. DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem* 1988;57:29-67
117. Sankila R, Aaltonen LA, Jarvinen HJ, Mecklin JP. Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer. *Gastroenterology* 1996;110:682-7
118. Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T. Expression of cyclooxygenase -1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:3785-9.
119. Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J. Induction of apoptosis by wild type p53 in a human colon tumor-derived cell-line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4495-9.
120. Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkhosian S, Perucho M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Genet* 1994;6:273-81.
121. Sikora K, Chan S, Evan G, Gabra H, Markham N, Stewart J, Watson J. c-myc oncogene expression in colorectal cancer. *Cancer* 1987;59:1289-95.
122. Smith AJ, Stern HS, Penner M, Hay K, Mitri A, Bapat BV, Gallinger S. Somatic APC and K-ras mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 1994;54:5527-30.
123. Smith DR, Myint T, Goh H-S. Over-expression of the c-myc proto-oncogene in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1993;68:407-13.

124. Smith KJ, Johnson KA, Bryan TM, Hill DE, Markowitz S, Willson JK, Paraskeva C, Petersen GM, Hamilton SR, Vogelstein B, et al. The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:2846-50.
125. Solomon E, Voss R, Hall V, Bodmer WF, Jass JR, Jeffreys AJ, Lucibello FC, Patel I, Rider SH. Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature* 1987;328:616-9.
126. Span M, Moerkerk PTM, De Goeij AF, Arends JW. A detailed analysis of K-ras mutations in relation to tumor progression and survival in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 1996;69:241-5.
127. Spirio L, Olschwang S, Groden J, Robertson M, Samowitz W, Joslyn G, Gelbert L, Thliveris A, Carlson M, Otterud B, et al. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 1993;75:951-7.
128. Strand M, Prolia TA, Liskay RM, Petes TD. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast affecting DNA mismatch repair. *Nature* 1993;365:274-6.
129. Su L-K, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 1993;262:1734-7.
130. Talamonti MS, Roh MS, Curley AS, Gallick GE. Increase in activity and level of pp60 in progressive stages of colorectal cancer. *J Clin Invest* 1993;91:53-60.
131. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.
132. Tsujii M, Dubois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxidase synthase 2. *Cell* 1995;83:493-501.
133. Umar A, Boyer JC, Thomas DC, Nguyen DC, Risinger JI, Boyd J, Ionov Y, Perucho M, Kunkel TA. Defective mismatch repair in extracts of colorectal and endometrial cancer cell lines exhibiting microsatellite instability. *J Biol Chem* 1994;269:14367-70.
134. Vasen HF, Walson P, Mechlin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch Syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116:1453-6.
135. Velculescu VE, El-Deiry WS. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin Chem* 1996;42:858-68.
136. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-32.
137. Yamaguchi K, Urano T, Goi T, Saito M, Takeuchi K, Hirose K, Nakagawara G, Shiku H, Furukawa K. Expression of a CD44 variant containing exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 1996;14:1122-7.
138. Yoshida K, Sugino T, Bolodeoku J, Warren BF, Goodison S, Woodman A, Toge T, Tahara E, Tarin D. Detection of exfoliated carcinoma cells in colonic luminal washings by identification of deranged patterns of expression of the CD44 gene. *J Clin Pathol* 1996;49:300-5.
139. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 1995;55:5187-90.
140. Warthin AS. Hereditary with reference to carcinoma: as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-193. *Arch Intern Med* 1913;12:546-55.
141. Warthin AS. The further study of a cancer family. *J Cancer Res* 1925;9:279-86.
142. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 1993;71:677-85.
143. Weber TK, Steele G, Summerhayes JC. Differential pp60 activity in well and poorly differentiated human colon carcinomas and cell lines. *J Clin Invest* 1992;90:815-21.
144. Wevrick R, Buchwald M. Mammalian DNA-repair genes. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3:470-4.
145. Wijnen J, Khan PM, Vasen H, Menko F, van der Klift H, van der Broek M, et al. Majority of hMLH1 mutations responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer cluster at the exonic region 15-16. *Am J Hum Genet* 1996;58:300-7.
146. Wijnen J, Vasen H, Khan PM, Menko FH, van der Klift H, van Leeuwen C, et al. Seven new mutations in hMSH2, na HNPCC gene, identified by denaturing gradient-gel electrophoresis. *Am J Hum Genet* 1995;56:1060-6.
147. Willis RA. The spread of tumors in the human body. 3rd ed. London: Butterworth; 1952.
148. Winaer SJ, Fletcher RH, Miller L, Godlee F, Stolar MH, Mulrow CD, et al. Colorectal cancer screening: Clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 1997;112:594-642.

Comparação entre as pressões portal e da veia hepática ocluída no transplante de fígado*

Confrontation between portal pressure and wedged hepatic venous pressure after liver transplantation*

Marília D'Elboux Guimarães Brescia** Paulo Celso Bosco Massarollo***

Brescia MDG, Massarollo PCB. Comparação entre as pressões portal e da veia hepática ocluída no transplante de fígado. Rev Med (São Paulo) 2000 abr./dez.;79(2/4):65-72.

RESUMO: **Introdução:** A pressão portal (PP) após o transplante de fígado (Tx) é freqüentemente avaliada por meio da pressão da veia hepática ocluída (PVHO). Entretanto, não são conhecidos trabalhos sobre a concordância entre a PP e a PVHO no fígado transplantado. **Casuística e método:** Foram estudados prospectivamente 23 pacientes submetidos à Tx. A PP foi medida por cateterização de veia ileal, e a PVHO e a pressão de veia hepática livre (PVHL), por meio de cateter com balão. As pressões foram comparadas pelo teste "t" de Student pareado e análise de regressão linear. **Resultado:** Existe gradiente significativo entre a PP e a PVHO ($1,4 \pm 1,6$ mmHg; $p < 0,001$). O gradiente foi igual ou superior a 2mmHg em 9 casos (39,1%). Há correlação linear entre PP e PVHO ($PVHO = 1,397 + 0,845*PP$; $r = 0,938$; $p < 0,001$) e entre os gradientes PP-PVHO e PP-PVHL ($PP-PVHO = -0,871 + 0,429*PP-PVHL$; $r = 0,429$; $p = 0,001$). **Conclusão:** 1) Existe gradiente significativo entre a PP e a PVHO no fígado transplantado, apesar de uma forte correlação linear entre as pressões; 2) O gradiente é mais pronunciado nos casos com pressão portal mais elevada.

DESCRITORES: Pressão na veia porta; Transplante de fígado/efeitos adversos; Veias circulação hepática; Estudos prospectivos; Cateterismo/métodos; Dilatação com balão/métodos; Modelos lineares

INTRODUÇÃO

A utilização da pressão de veia hepática ocluída (PVHO) como índice indireto da pressão portal (PP) foi proposta por Myers e Taylor¹⁵, em 1951, como forma de contornar as dificuldades anatômicas para a medida direta da PP. A vantagem é que se utiliza um cateter introduzido na veia hepática por meio de punção periférica das veias jugular ou femoral. O método baseia-se no princípio dos vasos comunicantes, ou seja, que a pressão distribui-se uniformemente por uma coluna líquida estática.

Assim, a interrupção do fluxo na veia hepática permitiria a equalização da pressão com os sinusóides e, por continuidade, com a veia porta.

Originalmente, a oclusão da veia hepática era obtida pela introdução do cateter no vaso até que sua extremidade ficasse impactada num pequeno ramo, impedindo o fluxo sanguíneo⁵. Assim, para a realização da medida, era necessário fazer repetidas manipulações da sonda, até que a posição adequada fosse obtida. Mais recentemente,

* Prêmio Oswaldo Cruz (Cirurgia) - XIX Congresso Médico Universitário da FMUSP COMU, 2000.

** Acadêmica da FMUSP.

*** Prof. Dr. da Disciplina de Transplante e Cirurgia do Fígado do Departamento de Cirurgia da FMUSP (Orientador).

passou-se a realizar a oclusão da veia hepática por meio da insuflação de um balão adaptado à extremidade do cateter⁵. Esta técnica dispensa a movimentação do cateter para interrupção do fluxo, prevenindo o risco de migração para fora da veia⁵. Adicionalmente, a PVHO obtida com balão representa uma área muito maior do fígado, podendo fornecer resultados mais confiáveis⁵. Por fim, pode-se citar a maior rapidez na obtenção da medida, prevenindo a ocorrência de congestão do parênquima.

A correlação entre a PVHO e a PP foi confirmada na doença hepática alcoólica, tanto na fase de hepatite quanto na cirrose². Entretanto, esta relação não é perfeita em pacientes com hepatite crônica viral, cirrose biliar e esquistossomose, nos quais a PVHO é geralmente inferior à PP^{5,13}. Nestes casos, existe um gradiente entre a pressão sinusoidal, mais baixa, e a PP, que é mais elevada, devido à localização pré-sinusoidal do obstáculo ao fluxo portal.

Após o transplante de fígado (Tx), a PP foi estimada por meio da PVHO em vários estudos^{4,6,16}. Entretanto, não são conhecidos trabalhos que procuraram verificar se, no fígado transplantado, existe concordância entre as duas pressões. Assim, é capaz que os trabalhos já realizados sobre hemodinâmica portal após o Tx apresentem uma falha metodológica que comprometa suas conclusões.

O objetivo desta pesquisa é verificar se existe correlação e concordância entre a PVHO e a PP no fígado transplantado.

CASUÍSTICA E MÉTODO

Foram estudados prospectivamente 23 pacientes de ambos os sexos, com idade superior ou igual a 18 anos, matriculados para realização de Tx na Unidade de Fígado do Hospital das Clínicas da FMUSP. Foram excluídos pacientes com trombose do tronco da veia porta, diagnosticada antes ou durante o Tx.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAPPesq). Todos os pacientes incluídos no estudo forneceram consentimento expresso, cujos termos também foram avaliados e aprovados pela CAPPesq. No serviço, todos os pacientes da lista de espera para Tx são submetidos rotineiramente a um programa pré-operatório de orientação. Nestas consultas, os pacientes foram informados com detalhes sobre o projeto, incluindo os procedimentos que seriam empregados e seus riscos potenciais. Após o esclarecimento das eventuais dúvidas, foi sugerido

que refletissem sobre o interesse na participação da pesquisa. Entretanto, a autorização só foi solicitada após a internação do paciente, quando já existia um doador disponível para a realização do Tx. Os que concordaram assinaram o termo de autorização. Os demais foram operados normalmente, sem nenhum prejuízo para seu tratamento.

A casuística foi constituída entre 25 de junho de 1999 e 9 de abril de 2000. Neste período, o grupo realizou 41 transplantes em 38 pacientes (Tabela 1). Com exceção de um caso, todos concordaram em participar da pesquisa. Entretanto, dezoito casos foram excluídos por diferentes razões (Tabela 2). Os dados demográficos dos 23 pacientes estudados estão expostos na Tabela 3.

As cirurgias do doador e do receptor foram realizadas com pequenas adaptações à técnica habitual. Durante o preparo do fígado *ex situ*, um cateter de oclusão com balão de 20 mm de diâmetro (*Medi-tech 17-200, Boston Scientific Corporation, EUA*) foi introduzido na veia hepática direita por pelo menos 6 cm. Esta sonda foi exteriorizada na veia cava infra-hepática do enxerto. Na cirurgia do receptor, logo após a abertura da parede, foi dissecado e cateterizado um ramo venoso ileal com uma sonda plástica, procedimento utilizado rotineiramente, no grupo, para a medida da pressão portal. O cateter foi introduzido até que houvesse refluxo de sangue com facilidade. Após isso, a sonda permaneceu fechada, preenchida com solução salina.

Durante a colangiografia, que é realizada rotineiramente após a conclusão da anastomose biliar, no final do Tx, foram realizadas as medidas de PVHO (com o balão inflado) e PP (cateter ileal). Em média, este momento ocorreu $174,0 \pm 87,1$ minutos após a revascularização do enxerto. Adicionalmente, foi registrada a pressão da veia hepática livre (PVHL), obtida com o balão desinflado. Todas as medidas foram obtidas com o mesmo transdutor, estipulando-se como nível de referência zero a linha axilar média.

A oclusão da veia hepática pelo balão foi considerada satisfatória quando três critérios foram atendidos: (1) obtenção de curva de pressão estável, após insuflação do balão; (2) ausência de refluxo, depois da injeção de 2 mL de contraste através do cateter, sob controle fluoroscópico (Figura 1); (3) queda da pressão, após desinsuflação do balão¹⁸. Durante a avaliação da PVHO, o balão permaneceu insuflado apenas alguns segundos, sendo esvaziado logo após a confirmação radioscópica da oclusão, para prevenir congestão do parênquima.

Tabela 1 Relação dos transplantes realizados durante o período de condução do estudo.

Caso	Iniciais	Sexo	Idade	Data	Indicação	Incluído
1	PZMC	F	40	25/6/99	cirrose por VHC	sim
2	VAS	F	44	9/7/99	hepatite aguda grave	sim
3	MLBA	F	69	16/7/99	cirrose criptogênica	sim
4	JAP	M	68	16/7/99	cirrose alcoólica	não
5	VAS	F	44	21/7/99	retransplante por disfunção do enxerto	não
6	JSN	M	53	27/7/99	cirrose alcoólica	sim
7	CASF	M	50	29/7/99	cirrose por VHC	não
8	JEB	M	28	3/8/99	oxalúria tipo I	não
9	JEB	M	28	5/8/99	retransplante por disfunção do enxerto	não
10	MLR	F	42	18/8/99	retransplante por trombose de artéria hepática	não
11	MS	M	57	20/8/99	cirrose por VHC	sim
12	JAF	M	62	22/8/99	cirrose por VHC + álcool	sim
13	AMAR	F	44	27/8/99	cirrose alcoólica	sim
14	JN	M	58	4/9/99	cirrose por VHC	sim
15	MI	M	60	12/9/99	cirrose alcoólica + HCC	sim
16	MRS	M	52	14/9/99	cirrose por VHB+HCC	sim
17	JLF	M	49	4/10/99	cirrose criptogênica	não
18	CMN	F	18	8/10/99	colangite esclerosante primária	sim
19	AFH	M	55	9/10/99	retransplante por trombose de artéria hepática	sim
20	AEE	M	57	12/11/99	cirrose por VHC	não
21	MBFG	F	59	14/11/99	cirrose por VHC	não
22	RCM	M	46	15/11/99	cirrose por VHC	não
23	IAM	F	29	1/12/99	hepatite aguda grave	sim
24	TGL	F	36	6/12/99	polineuropatia amiodótica familiar	não
25	ARZ	M	46	6/12/99	cirrose por VHC e VHB + HCC	sim
26	UAMC	F	31	8/12/99	polineuropatia amiodótica familiar	sim
27	OAS	M	55	8/12/99	cirrose por VHC e VHB + HCC	não
28	AML	M	70	16/12/99	cirrose por VHC + HCC	sim
29	ERP	M	40	31/12/99	cirrose por VHC + HCC	não
30	MM	M	64	1º/1/00	cirrose por VHC + HCC	sim
31	ARP	M	49	16/1/00	cirrose por VHC	sim
32	MLS	F	22	18/1/00	cirrose auto-imune	não
33	MLS	F	22	30/1/00	retransplante por disfunção do enxerto	não
34	SAS	F	26	15/2/00	hepatite aguda grave	não
35	SCV	M	44	23/2/00	polineuropatia amiodótica familiar	sim
36	IOCF	F	52	1º/3/00	cirrose criptogênica	não
37	TH	M	55	18/3/00	cirrose criptogênica	sim
38	MNRC	F	42	22/3/00	hepatite auto-imune	sim
39	JP	M	60	23/3/00	cirrose por VHC	sim
40	VPF	M	42	3/4/00	cirrose por VHC	sim
41	JCB	M	54	9/4/00	cirrose criptogênica	não

Tabela 2 Causas de exclusão do estudo.

Caso	Motivo
4	trombose de veia porta
5	dificuldade de cateterização de veia ileal (edema)
7	perda de posicionamento do cateter da veia hepática
8	perda de posicionamento do cateter da veia hepática
9	instabilidade hemodinâmica
10	dificuldade de cateterização de veia ileal (aderências)
17	dificuldade de cateterização de veia ileal (coagulopatia)
20	perda de posicionamento do cateter da veia hepática
21	recusa do paciente
22	perda de posicionamento do cateter da veia hepática
24	perda de posicionamento do cateter da veia hepática
27	erro de medida da PVHO
29	erro de medida da PVHO
32	instabilidade hemodinâmica
33	perda de posicionamento do cateter da veia hepática
34	erro de medida da PVHO
36	instabilidade hemodinâmica
41	trombose de veia porta

PVHO: pressão de veia hepática ocluída.

Tabela 3 - Dados demográficos dos pacientes estudados: idade, sexo e tempo de isquemia do enxerto.

n	23
idade (anos)	49,7 ± 12,9
sexo (M/F)	14/9
Dt de isquemia do enxerto (min)	645,0 ± 194,4

M: masculino; F: feminino; Dt: tempo

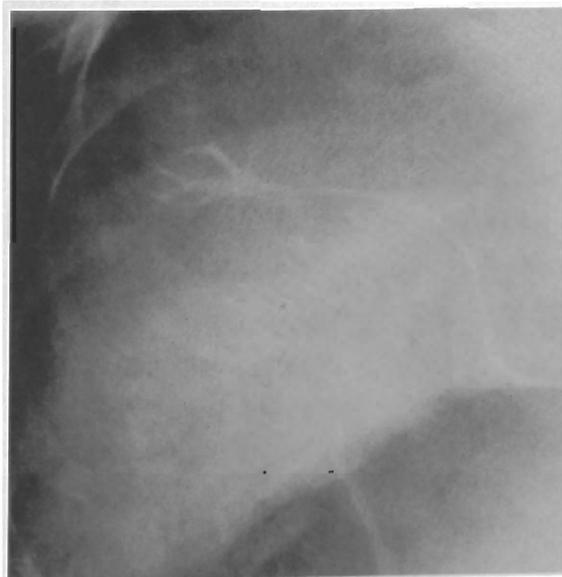


Figura 1 Controle radiológico da oclusão de veia hepática pelo cateter com balão. Observe a estagnação do contraste no vaso.

A medida das pressões foi realizada em apnéia, para evitar que as incursões respiratórias do paciente determinassem oscilação na curva pressórica. Nos casos em que persistiram oscilações, apesar dessa manobra, foi registrada a média aritmética dos valores máximo e mínimo observados.

A comparação dos valores de PVHO e PP foi realizada por meio do teste "t" de Student pareado e análise de regressão linear. A comparação dos gradientes PP-PVHL e PP-PVHO foi realizada por meio de análise de regressão linear. Os resultados estão expressos em "média ± desvio padrão".

O tamanho da amostra foi calculado fixando-se os erros de tipo I e II em 5% e estimando-se o coeficiente de correlação de Pearson (r) em 0,70. Este valor de "r" foi escolhido por ser considerado o limite acima do qual a correlação entre as medidas aproxima-se progressivamente da "perfeição"¹⁹

RESULTADO

O resultado obtido em cada um dos casos é mostrado na Tabela 4. As freqüências observadas dos valores do gradiente PP-PVHO são mostradas na Figura 2. Foi observado gradiente de 2mmHg ou superior em 9 casos (39,1%).

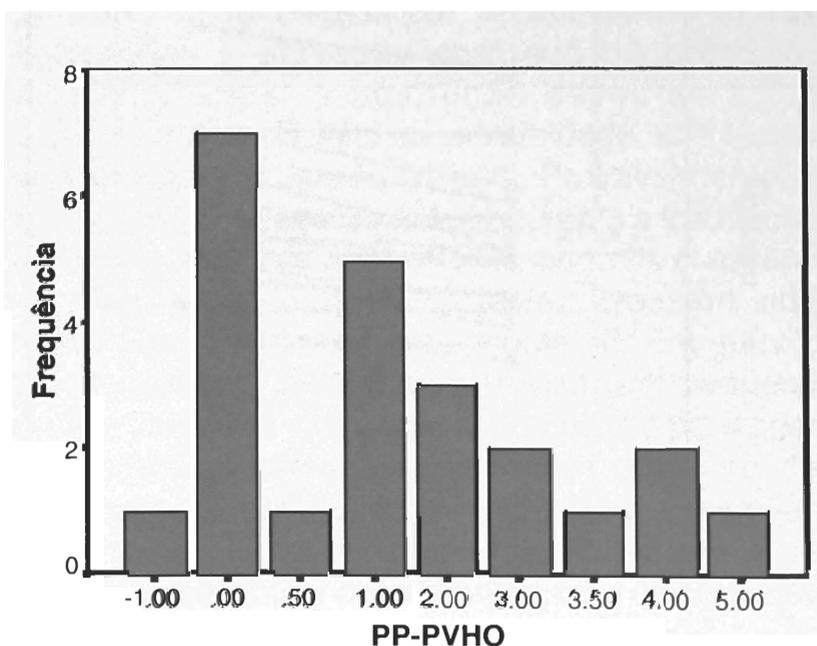


Figura 2 - Frequências observadas do gradiente entre a pressão portal (PP) e a pressão da veia hepática ocluída (PVHO).

Os valores máximo e mínimo e os quartis do gradiente PP-PVHO são mostrados por meio de gráfico "box-plot" (Figura 3). O gradiente PP-PVHO variou de -1 a 5 mmHg. A mediana do gradiente PP-PVHO é 1 mmHg, com percentil 75 correspondendo a 3 mmHg.

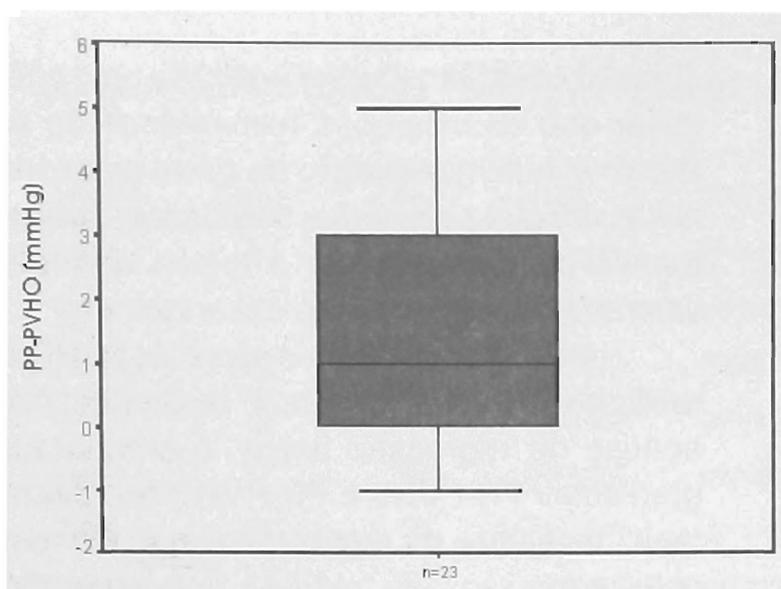


Figura 3 - Gráfico "box-plot" do gradiente entre a pressão portal (PP) e a pressão da veia hepática ocluída (PVHO).

Os gradientes individuais de PP-PVHO são mostrados na Figura 4. O valor médio de PP é $18,2 \pm 4,7$ mmHg. O valor médio da PVHO é $16,8 \pm 4,2$ mmHg. Existe um gradiente de pressão estatisticamente significativo entre a PP e a PVHO ($1,4 \pm 1,6$ mmHg; $p < 0,001$).

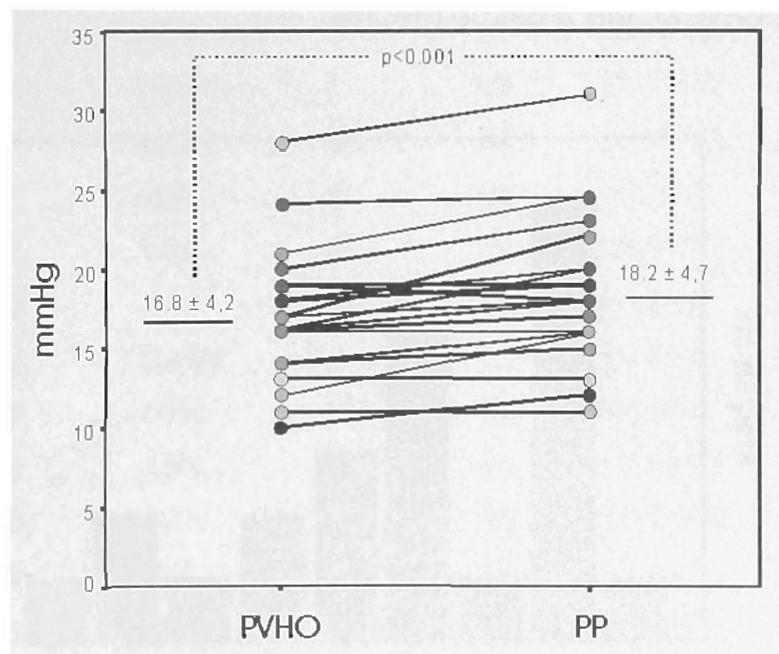


Figura 4 - Gradiente entre a pressão portal (PP) e a pressão da veia hepática ocluída (PVHO). Existe um gradiente significativo entre as duas pressões ($1,4 \pm 1,6$ mmHg; $p < 0,01$).

Existe forte correlação linear positiva entre PP e PVHO ($PVHO = 1,397 + 0,845 \cdot PP$; $r = 0,938$; $p < 0,001$). A curva de regressão linear está expressa na Figura 5.

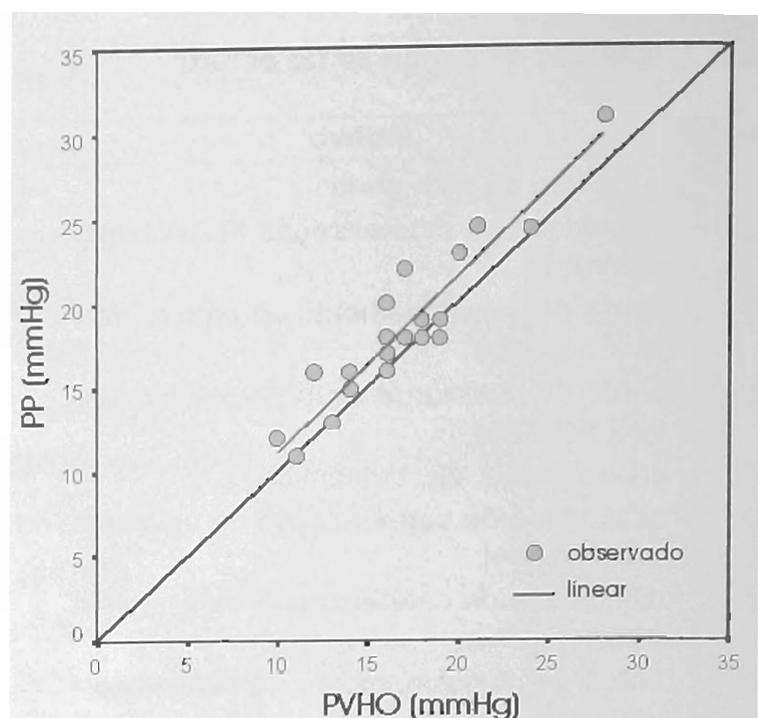


Figura 5 Curva de regressão linear entre a pressão portal (PP) e a pressão da veia hepática ocluída (PVHO). Existe forte correlação linear positiva entre as duas pressões ($PVHO = 1,397 + 0,845 \cdot PP$; $p < 0,01$).

Existe correlação linear positiva entre os gradientes PP-PVHO e PP-PVHL ($PP-PVHO = -0,871 + 0,429 \cdot PP-PVHL$, $r = 0,429$; $p = 0,001$). A curva de regressão linear está expressa na Figura 6.

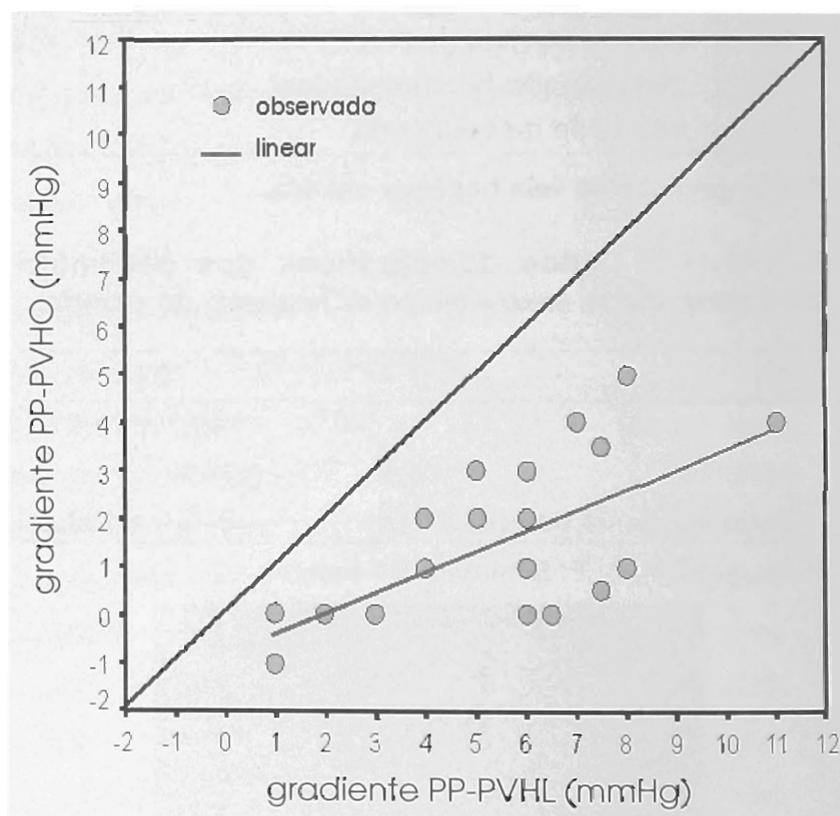


Figura 6 Curva de regressão linear entre o gradiente da pressão portal para a pressão da veia hepática ocluída ($PP - PVHO$) e o gradiente da pressão portal para a pressão da veia hepática livre ($PP - PVHL$). Existe correlação linear positiva entre os dois gradientes ($PP - PVHO = -0,871 + 0,429 \cdot PP-PVHL$; $r = 0,429$; $p = 0,001$).

DISCUSSÃO

O Tx é considerado um tratamento definitivo

para a hipertensão portal em pacientes cirróticos já que, teoricamente, corrige tanto a alteração hemodinâmica quanto a doença hepática crônica de base⁸. Entretanto, alguns trabalhos têm relatado a ocorrência de complicações da hipertensão portal, como sangramento de varizes de esôfago¹² e ascite^{9,10} mesmo após o Tx. Estas complicações podem estar relacionadas com a persistência de alterações da hemodinâmica portal após o procedimento.

Após Tx, os pacientes apresentam circulação hiperdinâmica nos territórios sistêmico e esplâncnico, por até vários meses⁶. A elevação do fluxo da veia porta correlaciona-se positivamente à do débito cardíaco⁷. O hiperfluxo esplâncnico poderia fornecer explicação suficiente para justificar uma elevação da pressão portal. Entretanto, em estudo recente realizado neste serviço, pacientes transplantados apresentaram resistência vascular portal significativamente maior do que controles normais¹⁴. A eventual ocorrência de um gradiente entre a PP e a PVHO nesses casos depende da intensidade do componente pré-sinusoidal da resistência portal no fígado transplantado. O esclarecimento dessa questão motivou a realização do presente estudo.

Os resultados obtidos demonstram uma diferença média de $1,4 \pm 1,6$ mmHg entre a PP e a PVHO. Embora este gradiente seja estatisticamente significativo, pode-se questionar qual a sua importância clínica. Alguns autores consideram "discreto" um gradiente de até 2 mmHg². No presente estudo, 39,1% dos pacientes apresentam gradiente igual ou superior a esse valor. Vinte e cinco por cento dos casos situam-se acima de 3 mmHg, um limite mais rigoroso, mas que é utilizado por outros autores¹⁸.

Após o Tx, observa-se a formação de um colar peri-portal, na maioria dos casos, evidenciado por meio de tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética^{1,11}. Esse achado radiológico corresponde a um edema dos espaços porta determinado pelo inevitável comprometimento da drenagem linfática do enxerto¹. Essa pode ser uma explicação para o aumento da resistência pré-sinusoidal que, no presente estudo, ocorreu em alguns pacientes no período intra-operatório.

Mais tardiamente, durante episódios de rejeição celular aguda (RCA) do enxerto, podem ocorrer elevações da pressão portal⁶. Os principais achados histológicos da RCA são o infiltrado inflamatório dos espaços porta e a endotelialite dos ramos portais^{3,17}. Devido à localização dessas lesões, é provável que também o aumento da resistência portal na RCA tenha um componente fundamentalmente pré-sinusoidal.

Um aspecto interessante é a ocorrência de correlação linear positiva entre os gradientes PP-PVHO e PP-PVHL. Este resultado significa que a discrepância entre a PP e a PVHO é mais intensa nos casos com elevação mais acentuada da PP. Desta forma, a estimativa da PP por meio da PVHO revela-se mais falha justamente nos casos em que essa avaliação deve apresentar maior importância clínica.

Além dos resultados hemodinâmicos, o presente estudo permitiu aprendizados adicionais sobre o emprego adequado dos métodos utilizados. Verificou-se que a causa mais freqüente de exclusão da pesquisa foi a perda de posicionamento do cateter da veia hepática, que ocorreu em seis casos (30%). Em alguns, houve apenas falha técnica na fixação do cateter. Em outros, porém, a extremidade da sonda migrou para a veia cava inferior apesar de bem posicionada e fixada. Aparentemente, isto ocorreu devido às características do material de confecção do cateter, que torna-se mais maleável à temperatura corpórea, favorecendo sua migração, levado pelo fluxo sanguíneo. Para evitar esse inconveniente, passou-se a realizar fixação adicional, transfixando a parede anterior da veia hepática direita logo na sua origem. Esse artifício aparentemente solucionou o problema sem determinar qualquer consequência adversa.

Outro fator relevante foi o erro de medida da PVHO, que ocorreu em três casos (15%). Em dois, observou-se obstrução do cateter após insuflação do balão, caracterizada por desaparecimento das oscilações e elevação contínua da pressão. Aparentemente, a obstrução deveu-se a um posicionamento vicioso da extremidade, que ficava voltada contra a parede do vaso. Provavelmente, o deslocamento parcial do cateter durante a insuflação do balão contribua para o fenômeno. Os cuidados de fixação descritos acima talvez tivessem sido suficientes para evitar esse problema. Entretanto, por segurança, passou-se a realizar um pequeno orifício lateral na extremidade do cateter, para criar uma via alternativa de drenagem em caso de obstrução do orifício distal. As demais exclusões deveram-se a critérios previstos no projeto de pesquisa (trombose de veia porta) ou a dificuldades técnicas que, por razões éticas, levaram o cirurgião a interromper o estudo.

Os desdobramentos do projeto suscitam algumas questões adicionais. Qual é a contribuição relativa dos demais componentes da resistência vascular portal, além do pré-sinusoidal? Existe, de fato, correlação entre a intensidade do edema peri-portal e o gradiente PP-PVHO? Os pacientes com gradiente PP-PVHO alargado apresentam evolução clínica diferente dos demais? Para esclarecimento dessas dúvidas, pretende-se propor novos estudos, inseridos na mesma linha de pesquisa.

CONCLUSÃO

Conclui-se que existe uma diferença estatisticamente significante entre a PP e a PVHO no fígado transplantado, apesar de uma excelente

correlação linear entre as duas medidas. O gradiente entre a PP e a PVHO é mais pronunciado nos casos com pressão portal mais elevada.

Brescia MDG, Massarollo PCB. Confrontation between portal pressure and wedged hepatic venous pressure after liver transplantation. Rev Med (São Paulo) 2000 abr./dez.;79(2/4):65-72.

ABSTRACT: Introduction. Portal pressure (PP) after liver transplantation (LTx) has often been evaluated using the wedged hepatic venous pressure (WHVP). However, the agreement between PP and WHVP has not been investigated in the transplanted liver. **Patients and Methods:** Twenty-three LTx recipients were prospectively studied. PP was measured through ileal vein cannulation. WHVP and hepatic venous pressure (HVP) were measured using a balloon catheter. Pressure gradients were compared using paired Student's t-test and linear regression analysis. **Results:** There is a significant gradient between PP and WHVP (1.4 ± 1.6 mmHg; $p < 0.001$). A gradient of 2 mmHg or more was observed in 9 cases (39.1%). PP and WHVP are linearly related ($WHVP = 1.397 + 0.845 * PP$; $r = 0.938$; $p < 0.001$) as well as PP-WHVP and PP-HVP gradients ($PP - WHVP = -0.871 + 0.429 * PP - HVP$; $r = 0.429$; $p = 0.001$). **Conclusion:** 1) Despite a strong linear correlation, there is a significant gradient between PP and WHVP in the transplanted liver; 2) The gradient is more pronounced in cases with higher portal pressure.

KEYWORDS: Portal Pressure; Liver transplantation/adverse effects; Liver circulation; Prospective studies; Catheterization/methods; Balloon dilatation/methods; Linear models.

REFERÊNCIAS

1. Aspestrand F, Mathisen O, Bergan A. Perivascular low attenuation zone at CT of liver transplants. A follow-up study. *Acta Radiol* 1991;32:244-6.
2. Boyer TD, Triger DR, Horisawa M, Redeker AG, Reynolds TL. Direct transhepatic measurement of portal vein pressure using a thin needle – comparison with wedged hepatic vein pressure. *Gastroenterology* 1977;72:584-9.
3. Demetris AJ, Qian SG, Sun H, Fung JJ. Liver allograft rejection: an overview of morphologic findings. *Am J Surg Pathol* 1990;1(Suppl):49-63.
4. Gadano A, Hadengue A, Widmann JJ, Vachieri F, Moreau R, Yang S, et al. Hemodynamics after orthotopic liver transplantation: study of associated factors and long-term effects. *Hepatology* 1995;22:458-65.
5. Groszmann RJ, Glickman M, Blei AT, Storer E, Conn HO. Wedged and free hepatic venous pressure measured with a balloon catheter. *Gastroenterology* 1979;76:253-8.
6. Hadengue A, Lebrec D, Moreau R. Persistence of systemic and splanchnic hyperkinetic circulation in liver transplant patients. *Hepatology* 1993;17:175-8.
7. Henderson JM, Gilmore GT, Mackay GJ, Galloway JR, Dodson TF, Kutner MH. Hemodynamics during liver transplantation: the interactions between cardiac output and portal venous and hepatic arterial flows. *Hepatology* 1992;16:715-8.
8. Ho KS, Lashner BA, Edmond JC, Baker AL. Prior esophageal variceal bleeding does not adversely affect survival after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1993;18:66-72.
9. Jamieson GN, Jamieson N, Barnes ND. Ultrafiltration for intractable ascites after liver transplantation. *Arch Dis Child* 1991;66:988-9.
10. John TG, Plevris JN, Redhead DN, Garden OJ, Finlayson NDC, Sanfey HA. Massive ascitic fluid loss after liver transplantation. *Gastroenterology* 1996;111:564-8.
11. Lang P, Schnarkowski P, Grampp S, van Dijke C, Gindele A, Steffen R, et al. Liver transplantation: significance of the periportal collar on MRI. *J Comput Assist Tomogr* 1995;19:580-5.
12. Massarollo PCB, Mies S, Brescia MDG, Raia S. Sangramento por varizes esofágicas após transplante de fígado com anastomose portal pérvia. *Transplantes* 1998;4:24-7.
13. Mies S, Kisilevzky NH. Angiografia. In: Dani R, Castro LP. *Gastroenterologia clínica*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1993. p.57-80.
14. Mies S, Massarollo PCB, Beer A, Figueira ERR, Leonardi M, Quintella E, et al. Persistence of increased portal pressure, blood flow and vascular

- resistance after liver transplantation. *Transplantation* 1999;67:S362.
15. Myers JD, Taylor WJ. An estimation of portal venous pressure by occlusive catheterization of hepatic venule. *J Clin Invest* 1951;30:662.
 16. Navasa M, Feu F, García-Pagán JC, Jiménez W, Llach J, Rimola A, et al. Hemodynamic and humoral changes after liver transplantation in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1993;17:355-60.
 17. Sankary H, Foster P, Novich K, Ashmann M, Bhattacharyya A, Coleman J, et al. Quantitative analysis of portal tract infiltrate allows for accurate determination of hepatic allograft rejection. *Am J Surg* 1991;161:131-4; discussion 134-5.
 18. Sarin SK, Sethi KK, Nanda R. Measurement and correlation of wedged hepatic, intrahepatic, intrasplenic and intravariceal pressures in patients with cirrhosis of liver and non-cirrhotic portal fibrosis. *Gut* 1987;28:260-6.
 19. Stevenson WJ. *Estatística aplicada à administração*. São Paulo: Harper & Row do Brasil; 1981. p.339-94.

Manifestação intestinal rara em paciente com imunodeficiência comum variável e estrogiloidíase - Relato de caso*

Uncommom gastrointestinal manifestation in immunodeficient patient's report case*

Cristina Helena Prado Kobata** Murilo Catafesta das Neves**
Simone Elisa Dutenhefner** Francisco Salles Collet e Silva***
Pedro Francisco G. Bianchi Jr**** Elza Hissako Kanashiro*****

Kobata CHP, Neves MC, Dutenhefner SE, Silva FSC, Bianchi Jr PFG, Kanashiro EH. Manifestação intestinal rar em paciente com imunodeficiência comum variável e estrogiloidíase. Relato de caso. Rev Med (São Paulo) 2000 abr./dez.;79(2-4):73-80.

RESUMO: Relato de paciente com imunodeficiência rara e manifestação gastrointestinal incomum. Paciente masc., 26a., com Imunodeficiência Comum Variável (ICV), em uso de Prednisona, entre outras drogas, com diarréias recorrentes há 5a. e pesq. de *S.stercoralis* negativas. Há 3d., dor abd. difusa, náuseas, vômitos e parada de eliminação de gases e fezes. Apresentava-se em MEG, descorado, desidratado, distensão abd., dor à palpação, DB+ e ausência de RHA. Ao RX abd., alças distendidas, edemaciadas e "empilhamento de moeda". Submetido à enterectomia do delgado médio por sinais de sofrimento, o exame da peça demonstrou estrogiloidíase transmural e necrose hemorrágica da muscular própria, sem comprometimento da mucosa. Evoluiu com síndrome do intestino curto e choque séptico, com boa resposta a antibiótico e tiabendazol. Consideram os autores, após revisão de literatura, que a ICV é rara e estrogiloidíase associada é incomum, podendo ser mais encontrada quando em uso de corticóides. A necrose hemorrágica da muscular própria sem comprometimento da mucosa não foi detectada na literatura estudada.

DESCRITORES: Enteropatias parasitárias/complicações; Estrogiloidíase/etiologia; Imunodeficiência de variável comum/etiologia.

INTRODUÇÃO

As imunodeficiências primárias refletem anormalidades no desenvolvimento e maturação das células do sistema imunológico. Esses defeitos ocorrem principalmente nos linfócitos T e B

resultando em uma suscetibilidade maior para infecções devido a uma deficiência na imunidade celular e/ou humoral^(8,22) Classicamente, deficiências na imunidade humoral causam as chamadas

Prêmio Oswaldo Cruz (Relato de Caso) COMU, 2000.

** Acadêmicos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

*** Médico-Doutor Assistente da Disciplina da Cirurgia do Trauma da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (orientador).

**** Médico-Doutor Assistente da Disciplina de Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (orientador).

***** Médica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (orientador).

hipogamaglobulinemias que são divididas em dois grupos, o primeiro das que têm linfócitos B e o segundo das que não têm. No primeiro grupo, encontra-se a Imunodeficiência Comum Variável (ICV), a Deficiência de IgA, a Síndrome de Hiper-IgM, os Defeitos específicos de subclasses de IgG e outras desordens não muito definidas. No segundo grupo encontra-se a Agamaglobulinemia ligada ao X⁷

A ICV foi descrita pela primeira vez em 1953 e é pouco freqüente, com uma incidência de aproximadamente 1:100.000^{11,23}. O fenótipo da doença é muito variável e muitos pacientes apresentam infecções bacterianas recidivantes, predominantemente no trato respiratório superior. Mais raramente, há acometimento do trato gastrointestinal, normalmente inflamatório ou infeccioso por *Giardia lamblia*^{11,19,22}

Entre as helmintíases intestinais, ainda que considerada endêmica, a estrogiloidíase, em sua forma disseminada, é incomum em doentes com ICV devido à predominância da forma humoral da imunodeficiência. Esta parasitose, primordialmente intestinal, acomete 83% da população brasileira e de outros países tropicais, sem que haja manifestação clínica exuberante^{4,20}. É causada pelo *Strongyloides stercoralis*, nematódio da família Rhabdiasidae, descrito pela primeira vez em 1876 por Bavay, que o isolou de fezes de soldados franceses⁴ e, no mesmo ano, identificado como parasita humano por Normand²¹. Possui grande importância clínica devido à sua capacidade única dentre os nematódios de fazer auto-infecção em indivíduos imunodeprimidos, conforme demonstrada por Olphus, em 1929, quando encontrou a larva no cólon de um caso fatal²¹. Outras vezes pode ocorrer invasão de tecidos extra-abdominais levando a quadros graves, potencialmente fatais⁴ caracterizando a estrogiloidíase disseminada descrita, pela primeira vez, em 1940²¹. As manifestações clínicas são variáveis, dependendo do grau de infestação e do estado de imunidade do indivíduo. Entre 30% e 50% dentre os infestados apresentavam-se assintomáticos ou oligossintomáticos, apresentando sintomas gastrointestinais vagos⁴

Relata-se, a seguir, uma manifestação abdominal rara em paciente com Imunodeficiência Comum Variável e estrogiloidíase.

RELATO DE CASO

ID: L. C. O., 26 anos, masculino, branco, casado, aposentado (serralheiro), natural de São Paulo, onde reside.

QD: Dor abdominal e vômitos há 3 dias.

HPMA: Paciente, portador de Imunodeficiência Comum Variável (diagnosticada há 8 meses) e rebelde a tratamento, iniciou há 3 dias da internação

quadro de dor abdominal difusa do tipo cólica, com piora progressiva, sem fatores de melhora ou piora, acompanhada de anorexia, náuseas, vômitos e parada de eliminação de gases e fezes. Procurou nosso serviço sendo internado para avaliação diagnóstica e terapêutica.

Estava em uso de g-globulina (400 mg/Kg/dose), Prednisona (60 mg/dia) e Ciprofloxacina (1,0 g/dia, há 5 dias).

AP: Imunodeficiência Comum Variável diagnosticada há 8 meses, com exames datados de outubro/99 apresentando imunoglobulinas baixas (IgG:423, IgA:60, IgM:119), assim como contagem de CD4+ e CD8+ (CD4:339, CD8:296, CD4/CD8:1,15).

Broncopneumonias/IVAS de repetição há 5 anos.

Diarréias recorrentes há 5 anos, com PPF e pesquisa de estrogilóides negativos.

Bronquiolite obliterante diagnosticada há 2 anos.

Nega diabetes, HAS, asma brônquica, etilismo ou tabagismo.

HF: Nega quadros infecciosos, neoplasias.

Pai com HAS.

EXAME FÍSICO: Apresentava-se em mau estado geral, toxemiado, descorado +/4+, desidratado ++/4+, acianótico, anictérico, temperatura: 37,2°C, FR: 20 inc/min, FC: 110 bat/min, PA: 110 X 90 mmHg.

Bulhas cardíacas rítmicas normofonéticas em 2 tempos, sem sopros.

Murmúrios vesiculares presentes, bem distribuídos, simétricos, com roncos difusos.

Abdome distendido, com dor à palpação superficial e profunda, DB+ difusamente e ausência de ruídos hidroaéreos. Baço não percutível e fígado palpável no rebordo costal direito.

Membros sem alterações.

EXAMES COMPLEMENTARES: Htc: 35,1%; Hb: 11,4 g/dL, GB: 21 mil/mm³ (0%, 84,8%, 6,3%, 5,7%, 3,0%, 0,2%); Plaquetas: 531 mil/mm³.

Raio-X simples de abdome com alças intestinais distendidas, espessadas, edemaciadas e com sinal de "empilhamento de moeda"

HIPÓTESES DIAGNÓSTICAS: Abdome agudo inflamatório ou vascular; imunodeficiência comum variável; bronquiolite obliterante.

CONDUTA: Laparotomia exploradora.

ACHADOS INTRAOPERATÓRIOS: Alças de intestino delgado médio distendidas, vinhosas, com paredes espessadas e sem peristaltismo, iniciando a 170 cm do ligamento de Treitz até 25 cm da válvula íleo-cecal correspondendo a aproximadamente 230 cm de extensão; adenomegalia mesentérica e ausência de líquido livre ou sinais macroscópicos de contaminação da cavidade.

Diagnóstico cirúrgico de possível enterite necrotizante ou trombose venosa mesentérica sendo

realizada enterectomia das alças em sofrimento com êntero-êntero-anastomose término-terminal em 2 planos de sutura e exérese de gânglio mesentérico. Os espécimes de ressecção cirúrgica foram encaminhados para exame histopatológico.

EVOLUÇÃO: No pós-operatório, o paciente evoluiu com síndrome do intestino curto e choque séptico. Foi iniciada nutrição parenteral, reposição volêmica e administração de antimicrobianos de amplo espectro, observando-se gradativa melhora do quadro clínico e laboratorial do estado de choque, além do controle parcial da síndrome do intestino curto.

EXAME HISTOPATOLÓGICO: (3 semanas depois) Parede intestinal adelgada, com presença de *Strongyloides stercoralis* acometendo toda a espessura da parede sob a forma de vermes adultos, larvas, ovos e granulomas. Necrose hemorrágica da túnica muscular própria com extravasamento hemático intenso, sem acometimento proporcional da mucosa. Congestão e edema dos vilos e da submucosa e infiltrado inflamatório constituído principalmente de neutrófilos e eosinófilos. No linfonodo, centro germinativo pouco reativo, hiperplasia linfóide reacional com padrão sinusoidal, seios medulares com larvas de estrogilóides circundadas por células inflamatórias (eosinófilos, linfócitos). Foi notada ausência de plasmócitos em todos os cortes.

Em vista do exame histopatológico, foi iniciado ciclo terapêutico com tiabendazol e recebeu alta em bom estado geral, hemodinamicamente estável, sendo acompanhado ambulatorialmente pelos Serviços de Imunologia, Gastroenterologia e Cirurgia Torácica.

DISCUSSÃO

A ICV é uma rara condição que acomete um grupo heterogêneo de pessoas, homens e mulheres, a maioria na segunda e terceira décadas da vida, cujas manifestações clínicas estão relacionadas à produção deficiente de todas as classes de imunoglobulinas⁸. Estudos recentes enfatizam que a heterogeneidade dessa síndrome sugere que a ICV é, na verdade, um conjunto de várias doenças idiopáticas que culminam numa hipogamaglobulinemia, geralmente com níveis normais de linfócitos B e grande diminuição dos níveis de IgG, IgM e IgA¹². Os resultados da análise laboratorial do doente apresentado estão de acordo com estes últimos relatos, caracterizados pela redução dos níveis de imunoglobulina.

Freqüentemente membros da mesma família são afetados por ICV e/ou deficiência de IgA. Cerca

de 15% dos pacientes com ICV têm parentes de primeiro grau com deficiência de IgA, levantando a hipótese de que estão geneticamente relacionados e podem representar estados clínicos diferentes de um mesmo defeito genético^{11,23}. Há evidências que associam ambas as alterações a um único haplótipo de MHC^{8,11}. Não houve possibilidade de caracterizar-se um elo familiar no caso relatado.

Os linfócitos B são imaturos, mas aparentemente conseguem reconhecer antígenos e se proliferar perante estímulo antigênico⁸. No entanto, não conseguem se diferenciar em plasmócitos, (células plasmáticas) que vão, efetivamente, produzir as imunoglobulinas, causando freqüentemente hiperplasia linfóide nodular, incluindo esplenomegalia e hiperplasia linfóide intestinal^{7,8,11,12,13,22}. No caso apontado, apesar da ausência de esplenomegalia e da presença de hiperplasia linfóide reacional de padrão sinusoidal (e não nodular como era de se esperar), observou-se ausência de plasmócitos. O mecanismo exato dessa falha na diferenciação do linfócito B ainda é desconhecido, mas algumas teorias são principalmente atribuídas a ele sem estarem, no entanto, eficientemente comprovadas. Acredita-se na existência de um defeito intrínseco no próprio linfócito B que impede que este se diferencie em plasmócito, mesmo com estímulo normal do linfócito T^{7,8,11,12}; ou que, os linfócitos T e seus produtos, podem estar alterados e fazer uma estimulação inapropriada para o linfócito B^{7,8,11,22}; ou ainda, que a resposta defeituosa dos linfócitos B refletem uma deficiência na função dos linfócitos T auxiliares^{7,8,11,12} que pode estar associada a um número reduzido de CD4+ como no caso apresentado, que leva a uma falha na apresentação de antígeno, ou um número aumentado de CD8+, que faz uma supressão intensa dos linfócitos B^{8,11,12}.

A maioria dos autores concorda que a ICV não é somente uma falha na secreção de imunoglobulinas, mas a representação de um estado generalizado de desregulação imunológica caracterizado por anormalidades funcionais provavelmente não somente de um único fator, mas de ambos os linfócitos B e T, o que clinicamente reflete numa suscetibilidade desses pacientes a uma variedade de condições que não são facilmente explicadas por um defeito exclusivo na resposta humoral do sistema imunológico^{7,8,11,12,23}. Em outras palavras, não só é possível que todas as teorias estejam igualmente corretas, como também, que ocorram associações diversas entre elas, justificando a heterogeneidade das manifestações clínicas em pacientes com ICV. Na maioria dos casos, ocorre somente um defeito no linfócito B ou somente no linfócito T com um quadro clínico mais brando ou, mais raramente, uma associação de falhas nos linfócitos B e T causando além de uma deficiência

humoral, uma deficiência celular, causando um quadro clínico mais rico e exuberante. Acredita-se que o doente relatado apresentava-se neste último grupo citado.

As manifestações clínicas mais comuns da ICV são infecções bacterianas recorrentes em trato respiratório, como as que foram relatadas nos antecedentes do presente caso. Entre outras infecções, são citadas as sinusites, otites médias, bronquites e pneumonias, principalmente por encapsulados (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Staphylococcus aureus*). Alguns pacientes podem apresentar infecções envolvendo microorganismos pouco comuns como *Pneumocystis carinii*, micobactérias, micoplasmas (artrite infecciosa) e fungos, além de ter crises recorrentes de herpes simplex^{8,11,19,22}. A maioria dos pacientes com ICV consegue responder a infecções virais efetivamente, com raras exceções¹¹. Há uma alta incidência de linfadenopatia e esplenomegalia enquanto não tão alta incidência de linfomas e manifestações gastrointestinais infecciosas – principalmente por *Giardia lamblia*, podendo também serem causadas por *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* e *Campylobacter* – e não-infecciosas – síndrome de má-absorção, doença celíaca, carcinomas gástricos e doenças inflamatórias (doença de Cröhn, colite ulcerativa) que são mais comuns^{8,11,18,19,22}. É possível que as crises diarréicas apontadas pelo paciente do caso apresentado tenham sido consequências de síndrome de má-absorção e/ou, também, de uma ou mais infecções pelos microorganismos citados.

É aparentemente paradoxal que, apesar da imunodeficiência, cerca de 20% dos pacientes com ICV desenvolvam alguma doença auto-imune, tais como artrite reumatóide, anemia hemolítica, anemia perniciosa, trombocitopenia, neutropenia, doença de Addison, diabetes mellitus, entre outras. Entre as complicações da ICV, também de fisiopatologia desconhecida, descreve-se uma doença granulomatosa, não-caseosa, semelhante à sarcoidose e que pode acometer vários órgãos como fígado, baço, linfonodos, pulmão, pele e até o cérebro^{11,23}.

O diagnóstico diferencial da ICV inclui as outras imunodeficiências primárias, as secundárias a drogas e as doenças malignas, além de outras condições que predisõem a infecções como alergias, anormalidades anatômicas e fibrose cística¹¹. O diagnóstico é feito pelas inúmeras infecções respiratórias recorrentes, ausência de história familiar compatível com Agamaglobulinemia ligada ao X, nível normal de linfócitos B e diminuição generalizada – e não ausência – de imunoglobulinas^{8,11,22}.

A administração de imunoglobulina por via

intravenosa constitui o principal tratamento disponível, não sendo, entretanto, ainda muito eficaz. Além dos muitos efeitos colaterais como cefaléia, febre, calafrios, desconforto abdominal, muitos pacientes, assim como no caso descrito, não têm redução das inúmeras infecções e continuam comprometendo os órgãos, principalmente os pulmões¹¹.

O mecanismo que envolve a imunorregulação da infecção pelo *S. stercoralis* não está ainda totalmente compreendido. A disseminação da doença, quando se encontra o verme em outros locais que não os tratos gastrointestinal e pulmonar, como por exemplo, no sistema nervoso central, coração, fígado e cérvix uterino, ocorre quando há aumento do número de parasitas por auto-infecção, intimamente associada à imunodepressão. No entanto, indivíduos HIV positivos não apresentam essa manifestação com a frequência esperada. A maior parte dos casos de disseminação ocorre em casos de imunodepressão iatrogênica, diferente da induzida pelo HIV, o que reforça a teoria de que a limitação da infecção está ligada, ao menos em parte, a mecanismos de defesa da mucosa⁴. Sabe-se que os corticosteróides são os mais freqüentemente associados a esse tipo de manifestação^{6,10,11,17,21} e alguns autores defendem que é não só pela ação sobre o sistema imune mas também pela ação direta do corticosteróide sobre a fêmea partenogenética, levando a um aumento da oviposição, ou sobre as larvas rabditóides, acelerando a sua transformação em larvas filarióides⁴. Pode ocorrer, também, infecção por germes Gram-negativos, secundariamente à strongiloidíase, como consequência da invasão da mucosa intestinal por perda de sua capacidade de defesa, podendo inclusive levar a um choque séptico²⁰. Deve-se lembrar a este respeito que, no caso descrito, o paciente apresentava, além da deficiência imunológica de base, referência de estar em tratamento com doses elevadas de corticoesteróide, o que pode ter facilitado a proliferação das larvas e o posterior choque séptico.

É importante conhecer o ciclo de vida do parasita, que é um dos mais complexos na natureza, para que se possa entender as diversas manifestações desta doença.

Este parasita, em sua forma filariforme que mede 300 a 600 microns e tem um esôfago longo e não bulbar²⁰, penetra ativamente na pele humana, atinge a circulação venosa, o coração direito e, pelas artérias pulmonares, alcança os pulmões. Atravessa a parede dos capilares pulmonares, atinge os alvéolos e, seqüencialmente, ascende pela via respiratória passando pelos brônquios, traquéia e quando chega na orofaringe é deglutido atingindo o

intestino delgado, onde invade a mucosa intestinal e se torna um verme adulto^{2,6,21,10,17} que, na forma parasitária, é uma fêmea partenogenética que mede de 2 a 3 mm e tem uma cutícula de 1 a 2 microns de espessura que contém finas estriações transversas em intervalos de 2 microns. O terço anterior do verme contém um longo esôfago cilíndrico enquanto os 2/3 posteriores contêm o intestino e os órgãos reprodutores. O verme coloca ovos de 50 a 60 microns²⁰ que eclodem ainda na luz intestinal, originando formas vegetativas denominadas larvas rabditiformes que medem de 200 a 300 microns e têm uma cápsula bucal curta e um esôfago com bulbo posterior. Estas, por sua vez, são carregadas pelas fezes contaminando o solo. No solo, a larva se desenvolve transformando-se na forma filariforme, que é infectante, perpetuando-se, assim, o ciclo^{2,6,10,17,21}

Pode ainda ocorrer auto-infestação explicando relatos da persistência da doença por até 50 anos, mesmo após o hospedeiro ter deixado a zona endêmica e não poder ser reinfectado^{4,6}. Não se sabe exatamente qual o mecanismo responsável, mas alguns autores acreditam que, ao ocorrer a invasão das camadas mais profundas da parede intestinal, formam-se granulomas próximos aos plexos nervosos mioentéricos (Meissner e Auerbach) provocando sua destruição. Ocorre, então, uma diminuição da peristalse intestinal e o verme passa a ter condições para, após a eclosão do ovo na luz do intestino, desenvolver-se até a forma filariforme sem ser eliminado nas fezes. Essa forma infectante atinge a pele perianal (auto-infestação externa) ou a região colônica (auto-infestação interna) e penetra novamente no mesmo hospedeiro caracterizando, nesse último caso, a hiperinfecção por *estrongilóides*^{1,20}

A *estrongiloidíase* é uma infecção geralmente assintomática. Eventualmente pode manifestar-se clinicamente como Síndrome de Löeffler, urticária recorrente, *larva currens* e anasarca por hipoproteinemia^{4,5,16}. Perda de peso e sintomas gastrointestinais como dor epigástrica semelhante a da úlcera péptica, que é agravada pela ingestão alimentar, dominam o quadro clínico em decorrência da localização do parasita e provavelmente são causados pela invasão da mucosa pelos vermes adultos e larvas. A diarreia é um sintoma freqüente, assim como desconforto abdominal, pirose, mal-estar, sonolência, náuseas e vômitos^{4,14}. Uma associação freqüente em casos graves de *estrongiloidíase* é a síndrome de má-absorção, sendo que alguns autores acreditam que seja decorrente do mau estado nutricional dos pacientes (causado tanto pela dieta pobre, quanto secundário

à anorexia, náuseas e vômitos) e não diretamente pela agressão do verme à mucosa intestinal¹⁵. Raramente a *estrongiloidíase* pode manifestar-se sob a forma de íleo paralítico ou enterorragia¹⁷

Algumas manifestações raras, a maioria atribuídas à hiperinfecção, foram descritas: íleo paralítico mimetizando oclusão intestinal aguda, situação na qual, as alças encontravam-se distendidas e espessadas, porém sem obstrução mecânica ou aderências (nestes casos o diagnóstico diferencial é com linfoma intestinal primário)¹; infarto intestinal por obliteração da artéria mesentérica por fibrose subíntima extensa⁷; enterocolite eosinofílica granulomatosa simulando Doença de Cröhn e enterocolite ulcerativa, com diarreia sanguinolenta e enterorragia¹⁷. Relata-se, também, um caso em 1971 que mimetizou uma enterite necrotizante, motivo pelo qual foi indicada e realizada uma laparotomia que não confirmou a hipótese diagnóstica. Apesar da ausência de qualquer alteração macroscópica, o doente de 29 anos veio a falecer. Submetido ao estudo necroscópico, verificou-se edema da parede intestinal, provavelmente causada por obstrução linfática, e hipertrofia linfóide decorrentes da migração da larva e trombose das veias subserosas⁹. Este último relato foi o que mais se assemelhou, clinicamente, com o caso apresentado. Entretanto, os resultados da laparotomia, da evolução do paciente e do estudo histopatológico mostraram-se substancialmente diferentes.

Embora as alterações anátomo-patológicas da *estrongiloidíase* sejam pouco específicas, há alguns achados que facilitam o diagnóstico etiológico^{4,24}. Além da reação inflamatória da submucosa do intestino delgado, com congestão e edema da mucosa, devido ao depósito de ovos do verme no local, classicamente, em ordem de gravidade, citam-se a enterite catarral, edematosa e ulcerativa. A enterite catarral é caracterizada macroscopicamente por congestão da mucosa e hipersecreção de muco caracterizando um aspecto tigróide²⁰ e, raramente, associam-se microulcerações ou hemorragia⁴. Microscopicamente observam-se infiltrados eosinofílicos e mononucleares na lâmina própria, aumento das células secretoras de mucina e edema dos vilos. As larvas estão confinadas à mucosa. Na enterite edematosa, o intestino apresenta espessamento difuso da parede, os achados microscópicos são atrofia de mucosa, edema de submucosa, alargamento e fusão dos vilos. As larvas estão confinadas à mucosa e submucosa. Na enterite ulcerativa, a parede do intestino delgado apresenta-se rígida pelo edema e pela fibrose, a atrofia da mucosa e ulcerações são achados característicos; microscopicamente observam-se atrofia dos vilos,

ulcerações e edema da mucosa, fibrose da submucosa e atrofia da túnica muscular. As larvas podem ser encontradas em toda a extensão da parede, assim como nos gânglios linfáticos mesentéricos. Pode-se encontrar granulomas contendo células gigantes multinucleadas ao redor das larvas mortas^{4,20}. Frente a casos de hiperinfecção encontram-se larvas em qualquer órgão, inclusive no SNC e, principalmente no cólon⁴. A superfície da mucosa caracteriza-se pela presença de grande quantidade de muco, petéquias e úlceras. A fibrose da parede intestinal (duodeno, jejuno e íleo proximal) caracteriza evolução mais crônica da infecção o que, eventualmente, pode acometer, também, os cólons²⁰.

No caso apontado não se conseguiu caracterizar nenhuma das formas histológicas de estrogiloidíase (catarral, edematosa e ulcerativa), pois apesar da reação inflamatória da submucosa do intestino delgado – eosinofílico e mononuclear – com congestão e edema da mucosa, dos vermes adultos, larvas, ovos e granulomas acometendo toda a espessura da parede, assim como os gânglios mesentéricos, caracterizando a hiperplasia linfóide reacional de padrão sinusoidal, a superfície da mucosa e da submucosa estavam relativamente preservadas, não apresentando grande quantidade de muco, sinais de úlceras, atrofia ou fibrose. Além disso, a parede do intestino estava adelgada às custas de uma necrose hemorrágica de túnica muscular própria, com extravasamento hemático intenso. Segundo informações obtidas para este estudo, o resultado do exame microscópico deste paciente não é característico de qualquer doença previamente relatada. A necrose observada justifica a macroscopia de sofrimento de alça à laparotomia. No entanto, embora o quadro macroscópico do intestino ressecado sugerisse uma causa vascular, não havia lesão proporcional entre mucosa e túnica muscular própria, o que praticamente descarta as causas vasculares (arterites e trombose mesentérica). Não havia, também, sinais de trombos ou microtrombos, além de ser um paciente jovem, sem alterações circulatórias centrais. Do mesmo modo, enterite necrotizante por infecção maciça de algum microorganismo, principalmente por *C. perfringens*, *E. histolytica* ou vírus, foi descartada, assim como as causas vasculares, pela ausência do acometimento da mucosa. Descartadas essas possibilidades, resta-nos interrogar se a própria infecção maciça por estrogilóides, presente no quadro, e somente ela, não possa ter sido responsável pelas alterações descritas.

Caso a estrogiloidíase possa causar tal lesão necrotizante, torna-se necessário lembrar, para diagnóstico diferencial, que uma das manifestações raras desta infecção é o íleo paralítico, situação na

qual deve-se evitar uma laparotomia, conforme ressaltam alguns autores^{1,20}. O quadro de abdome agudo que foi constatado no paciente deste "relato de caso" levou-o à laparotomia que resultou em uma enterectomia devido a alças em sofrimento e, apesar do posterior choque séptico e da síndrome de intestino curto, o doente apresentou boa evolução, confirmando que a conduta foi a mais apropriada.

O diagnóstico em casos não complicados geralmente é feito pela presença das larvas rabditiformes nas fezes, os ovos geralmente não são encontrados pois eclodem na luz intestinal²⁰. O exame é sensível, sendo necessário, no entanto, sempre colher 4 a 6 amostras de fezes em intervalos de pelo menos 2 dias para um resultado satisfatório, pois uma única amostra demonstra o parasita em apenas um terço dos pacientes contaminados. Com o objetivo de aumentar a sensibilidade do exame para 90%, deve-se processar e cultivar as amostras em concentrado de Baermann ou placa de ágar. Já na estrogiloidíase disseminada, a forma filariforme deve ser encontrada tanto no exame de fezes quanto em outros possíveis locais de migração da larva incluindo urina, escarro, lavado broncoalveolar e líquidos intracavitários. O teste de ELISA pode ser feito e tem sensibilidade de 85% e especificidade de 97%, porém, aponta não só uma infecção atual como também uma infecção passada. É relevante a presença de eosinofilia, proporcional ao grau de infecção, exceto em casos graves de disseminação, situação na qual, pode ocorrer aneosinofilia, indicativo de pior prognóstico¹⁶. Convém assinalar que, no doente apresentado, o exame hematológico não revelou eosinofilia acentuada (3%), apesar da maciça parasitose constatada no exame histopatológico.

A administração de tiabendazol, por via oral, na dosagem de 25 mg/kg, duas vezes ao dia durante 2 a 3 dias é o tratamento preconizado habitualmente nas estrogiloidíases. Frente a infecções disseminadas o tratamento deve ser prolongado para 5 a 7 dias. O albendazol é uma alternativa, administrado em doses de 400 mg duas vezes ao dia durante 3 a 7 dias. Finalmente, e como melhor opção, pode-se utilizar a ivermectina na dose de 200 mg, administrada em uma ou duas doses, com efeito comparável ao tiabendazol, porém, com menos efeitos colaterais¹⁶.

CONCLUSÃO

Conclui-se, então, que neste paciente associaram-se duas situações infrequentes:

1. uma rara doença de base, a Imunodeficiência Comum Variável, com manifestações clínicas ricas e, ao mesmo tempo, complexas;

2. o resultado do exame histopatológico que revelou uma estrogiloidíase maciça e uma interessante necrose hemorrágica de túnica muscular própria, sem comprometimento proporcional da mucosa. Esse achado microscópico, aparentemente, não é característico de nenhuma doença previamente relatada. Supõe-se que a associação da ICV e do corticoesteróide facilitou a proliferação dos

estrogilóides e essa infestação maciça possa ser a responsável pela microscopia atípica.

Finalmente, é importante lembrar que os pacientes imunodeficientes são propensos às mais diversas infecções que, nem sempre, cursam de forma típica. Deve-se ter em mente essas situações para que não se incorra em erro diagnóstico e/ou terapêutica.

Kobata CHP, Neves MC, Dutenhofner SE, Silva FSC, Bianchi Jr PFG, Kanashiro EH. Uncommon gastrointestinal manifestation in immunodeficient patient's report case. Rev Med (São Paulo) 2000 abr./dez.;79(2/4):73-80.

ABSTRACT: Uncommon gastrointestinal manifestation in immunodeficient patient's report case. A 26-year-old man with Common Variable Immunodeficiency (CVID), using Prednisone and other drugs, presented 3 days of diffuse abdominal pain, nausea, vomiting and constipation. He referred 5 years of recurrent diarrhea and negative tests for *S.stercoralis*. Physical examination revealed bad general condition, anemia, dehydration, distended abdomen without abdominal sounds and abdominal pain with guarding. The radiologic study showed marked dilation of small bowel which was oedematous. Resection of the affected loop was done and the histopathology showed transmural infection with *S.stercoralis* and haemorrhagic necrosis of muscular layer, without mucosal destruction. He developed malabsorption syndrome and septic shock, treated with antibiotics and thiabendazol. In the revision of literature, CVID is considered a rare disease and associated strongyloidiasis is uncommon, but it is seen in patients using corticosteroid. Haemorrhagic necrosis of muscular layer, without mucosal destruction wasn't mentioned in the studied literature.

KEYWORDS: Intestinal disease, parasitic/complications; Strongyloidiasis/etiology; Common variable immunodeficiency/etiology.

REFERÊNCIAS

1. Al Bahrani ZR, Al Saleem T, Al Gailani MA. Subacute intestinal obstruction by *Strongyloides stercoralis*. J Infect 1995;30(1):47-50.
2. Al Samman M, Haque S, Long JD. Strongyloidiasis colitis: a case report and review of the literature. J Clin Gastroenterol 1999;28(1):77-80.
3. Ali Khan Z, Seemayer TA. Fatal bowel infarction and sepsis: unusual complication of systemic strongyloidiasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1975;69(5-6):473-6.
4. Andrade Neto JL, Assef MCV. Estrogiloidíase. In: Veronesi R, Focaccia R. Tratado de infectologia. São Paulo: Atheneu; 1996. p.1373-78.
5. Boram LH, Keller KF, Justus DE, Collins JP. Strongyloidiasis in immunosuppressed patients. Am J Clin Pathol 1981;76(6):778-81.
6. Bradley SL, Dines DE, Brewer NS. Disseminated *Strongyloides stercoralis* in an immunosuppressed host. Mayo Clin Proc 1978;53(5):332-5.
7. Conley ME, Cooper MD. Genetic basis of abnormal B cell development. Curr Opin Immunol 1998;10(4):399-406.
8. Cooper M, Lawton A. Primary immunodeficient diseases. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. Harrison's - principles of internal medicine. 13th ed. New York: McGraw-Hill; 1994. v.2, p.1565.
9. Craven JL, Cantrell EG, Lewis MG. *Strongyloides stercoralis* infection presenting as necrotizing jejunitis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1971;65(4):532-3.
10. Drasin GF, Moss JP, Cheng SH. *Strongyloides stercoralis colitis*: findings in four cases. Radiology 1978;126(3):619-21.
11. Eisenstein EM, Sneller MC. Common variable immunodeficiency: diagnosis and management. Ann Allergy 1994;73(4):285-92; quiz 293-4.
12. Eisenstein EM, Strober W. Evidence for a generalized signaling abnormality in B cells from patients with common variable immunodeficiency. Adv Exp Med Biol 1995;371B:699-704.
13. Freiman JS, Gallagher ND. Mesenteric Node Enlargement as a Cause of Intestinal Variceal Hemorrhage in Nodular Lymphoid Hyperplasia. J Clin Gastroenterol 1985;7(5):422-4.

14. Friedenberf F, Wongpraparut N, Fischer RA, Gubernick J, Zaeri N, Eiger G, et al. Duodenal obstruction caused by *Strongyloides stercoralis* enteritis in an HTLV-1-Infected host. *Dig Dis Sci* 1999;44(6):1184-8.
15. Garcia FT, Sessions JT, Strum WB, Schweistris E, Tripathy K, Bolanos O, et al. Intestinal function and morphology in strongyloidiasis. *Am J Trop Med Hyg* 1977;26(5pt1):859-65.
16. Goldsmith R. Infectious diseases: protozoal and helminthic. In: Tierney LM, McPhee SJ, Papadakis MA. *Current – medical diagnosis & treatment*. 39th ed. São Francisco: Lang Medical Books McGraw Hill; 2000. p.1456-58.
17. Gutierrez Y, Bhatia P, Garbadawhala ST, Dobson JR, Wallace TM, Carey TE. *Strongyloides stercoralis* eosinophilic granulomatous enterocolitis. *Am J Surg Pathol* 1996;20(5):603-12.
18. Herbst EW, Armbruster M, Rump JA, Buscher HP, Peter HH. Defects of the intestinal humoral immune system in common variable immunodeficiency syndrome. *Adv Exp Med Biol* 1996;371B:705-8.
19. John HA, Sullivan KE, Smith C, Mulberg AE. Enterocolitis in infantile common variable immunodeficiency. A case report and Review of the Literature. *Dig Dis Sci* 1996;41(3):621-3.
20. Meyers WM, Connor DH, Neafie RC. Strongyloidiasis. In: Binford CH, Connor DH. *Pathology of tropical and extraordinary diseases*. Washington (D.C.): Armed Forces Institute of Pathology; 1976. v.2, p.428-32.
21. Powell RW, Moss JP, Nagar D, Melo JC, Boram LH, Anderson WH, et al. Strongyloidiasis in immunosuppressed hosts. Presentation as massive lower gastrointestinal bleeding. *Arch Intern Med* 1980;140(8):1061-3.
22. Rosen FS, Cooper MD, Wedgwood RJ. The primary immunodeficiencies. *N Engl J Med* 1995; 333(7):431-40.
23. Spickett GP, Farrant J, North ME, Zhang JG, Morgan L., Webster AD. Common variable immunodeficiency: how many diseases? *Immunol Today* 1997;18(7):325-8.
24. Trajman A, MacDonald TT, Elia CC. Intestinal immune cells in *Strongyloides stercoralis* infection. *J Clin Pathol* 1997;50(12):991-5.

Estudo dos efeitos da poluição atmosférica na mortalidade neonatal e fetal na cidade de São Paulo, Brasil*

Study of the effects of air pollution in both neonatal mortality and late fetal losses in the city of São Paulo, Brazil*

Daniel Cuba Nishioka** Fernando Luiz Barbério Coura**
Luiz Alberto Amador Pereira*** Gleice Margarete de Souza Conceição***

Nishioka DC, Coura FLB, Pereira LAA. Estudo dos efeitos da poluição atmosférica na mortalidade neonatal e fetal na cidade de São Paulo, Brasil. Rev Med (São Paulo) 2000 abr./dez.;79 (2/4):81-9.

RESUMO: Muitos estudos têm sugerido que crianças e idosos são mais suscetíveis aos efeitos da poluição atmosférica. Poucos enfatizaram os efeitos agudos da poluição em fetos ou recém-nascidos. Utilizando uma abordagem epidemiológica de séries temporais, o presente estudo tem como objetivo investigar a associação de mortes neonatais e mortes fetais tardias com a exposição à poluição atmosférica no ano de 1998, na cidade de São Paulo. Utilizando modelos de regressão de Poisson, encontrou-se uma associação significativa entre mortes fetais tardias e os níveis de O₃ e NO₂; o aumento estimado na mortalidade associado a esses poluentes foi de 3,5 e 4%, respectivamente. Para a mortalidade neonatal encontrou-se uma associação significativa com O₃, PM₁₀, SO₂ e NO₂ sendo que o aumento estimado na mortalidade foi de 10%. Estes resultados mostram a importância da poluição atmosférica na saúde, e quanto os fetos e recém-nascidos sofrem com esse problema ambiental.

DESCRITORES: Doenças respiratórias/epidemiologia; Poluição do ar/efeitos adversos; Mortalidade fetal; Mortalidade infantil.

INTRODUÇÃO

O fim do século XIX foi marcado pelas primeiras mudanças na postura da população mundial face à poluição do ambiente. Com o crescimento vertiginoso dos centros urbanos e com a industrialização dos mesmos evidenciou-se uma queda na qualidade de vida nas grandes cidades. Este problema acabou por repercutir negativamente na saúde das pessoas⁵

A poluição atmosférica, por exemplo, não só

foi responsável por aumentar o número de casos de doentes do aparelho respiratório, como também o número de mortes devido a complicações neste mesmo sistema¹. A origem deste problema ambiental deu-se principalmente com o incremento da frota de veículos automotores e com a emissão de poluentes tóxicos pelas chaminés das indústrias⁵

Para o prejuízo da população em geral, houve demora no estudo das relações entre poluição

Prêmio Oswaldo Cruz (Medicina Preventiva) COMU, 2000.

** Acadêmicos da FMUSP

*** Orientadores Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da FMUSP.

atmosférica e saúde, e na publicação de artigos científicos sobre este tema. Somente em meados deste século, com a ocorrência de episódios de inversões térmicas associadas aos fenômenos meteorológicos, a comunidade científica passou a constatar o aumento da mortalidade em grandes cidades poluídas⁶

Um dos primeiros episódios bem documentados sobre o assunto ocorreu em dezembro de 1952, na cidade de Londres. Uma forte inversão térmica dificultou a dispersão dos poluentes do ar, principalmente compostos ricos em enxofre provenientes da queima de combustíveis. Concomitantemente foi notado um aumento extraordinário da mortalidade da população, num curto período de tempo: durante quatro dias morreram cerca de 4000 pessoas. As causas das mortes eram principalmente bronquites e pneumonias. Assim, surgiam as primeiras evidências da associação entre poluição atmosférica e saúde⁹

A partir de então, estudos epidemiológicos e experimentais foram e ainda são realizados buscando entender e quantificar os diversos danos à saúde causados pela poluição atmosférica.

No ramo dos estudos experimentais, foram observados os danos ao trato respiratório e cardiovascular que o material particulado inalável e substâncias oxidantes ocasionariam em animais, como foi descrito em Bascom et al.² Foi constatado também que a exposição a tais elementos pode provocar graves problemas ao epitélio da árvore brônquica, prejudicando o transporte mucociliar e proporcionando reações inflamatórias nas vias aéreas^{8,13,15}. Além disso, foi reconhecido depois que alguns dos poluentes podem atuar como agentes cancerígenos potenciais¹⁴

Estudos epidemiológicos realizados indicaram válida e clara relação entre altos níveis de poluição e doenças respiratórias⁶

Diversas faixas etárias tornaram-se alvos pesquisas científicas relacionadas ao assunto. No entanto, foi dada uma maior atenção aos idosos e às crianças, uma vez que as pessoas dessas faixas etárias pareceram ser mais suscetíveis à poluição, desde as primeiras pesquisas^{2,9}

A relação entre morbi-mortalidade de idosos e poluição foi avaliada em alguns estudos. Saldiva et al.¹⁶, utilizaram como enfoque a região metropolitana de São Paulo nos períodos de maio de 1990 a abril de 1991. Foi encontrada uma associação entre as mortes de idosos com o aumento da concentração de material particulado inalável. Já Schwartz¹⁸ estudou internações hospitalares de idosos com problemas respiratórios em Spokane, Estados Unidos. Tanto PM_{10} como O_3 estavam associados com o aumento do risco de internações por causas respiratórias.

Até hoje, poucos estudos enfocaram a relação

entre a mortalidade infantil com a poluição atmosférica. Bobak et al.³ realizaram um estudo ecológico na República Tcheca, relacionando a mortalidade infantil com poluentes, PM_{10} , SO_2 e NO_x (NO e NO_2). No estudo utilizou-se um modelo de regressão logística, ajustado segundo fatores socioeconômicos como renda, quantidade de carros, e frequência de abortos. Foram encontradas associações entre a mortalidade neonatal e níveis de SO_2 e PM_{10} , sendo a relação com PM_{10} a mais consistente.

Posteriormente, Saldiva et al.¹⁷ investigaram a associação entre a poluição e a mortalidade infantil, procurando averiguar se este indicador mortalidade infantil se mostrava sensível aos efeitos da poluição atmosférica. Seu estudo utilizou séries temporais de mortalidade devido a causas respiratórias em crianças com idade menor que cinco anos. Através de métodos estatísticos de regressão foi encontrada uma associação significativa entre mortes por doenças respiratórias e níveis de NO_x . Conceição⁴ encontrou os efeitos similares utilizando outra série de tempo e métodos estatísticos mais sofisticados, reafirmando os resultados encontrados por Saldiva et al.¹⁷ em 1994.

Woodruff et al.²¹ avaliaram a relação entre mortalidade pós-neonatal e concentração de PM_{10} , analisando um grupo de 4 milhões de crianças nascidas nos Estados Unidos, entre 1989 e 1991 sugerindo que o material particulado está associado com o risco de mortalidade pós-neonatal.

Seguindo esta mesma linha de estudo, Loomis et al.¹⁰ inspirados pela constatação de aumento do número de mortes de crianças menores de um ano em episódios notificados de poluição atmosférica em Londres, na década de 50, e em estudos recentemente realizados em outros países^{3,17} realizaram um estudo para investigar evidências do mesmo problema na Cidade do México, entre os anos de 1993 e 1995. Efetuando um estudo de séries temporais, observaram que havia um excesso de mortalidade infantil associado a níveis de material particulado inalável menor que 2,5 μm ($PM_{2.5}$) nos dias anteriores à morte (mais especificamente de 3 a 5 dias): por exemplo, um aumento de 10 mg/m^3 na média dos níveis de $PM_{2.5}$, durante três dias seguidos, foi associado a um excesso de 6,9% na morte de crianças. Uma associação também foi encontrada para níveis de NO_2 e O_3 de 3 a 5 dias anteriores à morte, porém esta foi menos consistente que a do $PM_{2.5}$.

Recentemente, foi executado no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) um estudo que obteve resultados relevantes sobre a relação de poluentes com a natimortalidade¹²

No sentido de avaliar um novo aspecto da associação poluição-saúde envolvendo a população neonatal, realizou-se este estudo. Avaliou-se a associação entre a poluição atmosférica e a mortalidade neonatal na cidade de São Paulo e, adicionalmente, procuramos esclarecer um pouco mais sobre os efeitos da poluição atmosférica sobre a mortalidade fetal no ano de 1998.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Dados de mortalidade

Os dados de Natimortalidade e Mortalidade Neonatal para o ano de 1998 foram obtidos no Programa de Aprimoramento de Informações de Mortalidade no Município de São Paulo (PRO-AIM). Estes dados correspondem a todos os óbitos ocorridos nessas categorias de indivíduos cujas mães eram residentes na cidade de São Paulo.

De acordo com a legislação brasileira, natimortos são indivíduos que morrem com idade fetal superior a 28 semanas de gestação, ou com peso maior que 1000 g, ou com comprimento maior que 35 cm, sem sinais vitais na vigência do nascimento. Já a mortalidade neonatal é caracterizada por indivíduos que morrem antes de completarem 28 dias de vida. É obrigatório o preenchimento da declaração de óbito em ambos os casos citados.

Dados de poluição

As informações sobre as concentrações diárias de poluentes foram fornecidas pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). A metodologia para a coleta de dados segue os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da *US Environmental Protection Agency* (EPA). Os poluentes são medidos em 14 estações espalhadas pela cidade de São Paulo. Nem todos os poluentes foram medidos em todas as estações: NO₂ (medido em 7 estações, utilizando quimiluminescência), SO₂ (medido em 6 estações, utilizando fluorescência de pulso (UV)), CO (medido em 7 estações, utilizando infravermelho não dispersivo), O₃ (medido em 8 estações, utilizando ultravioleta) e PM₁₀ (material particulado inalável constituído por partículas com diâmetro menor que 10 µm, medido nas 14 estações utilizando radiação beta). A CETESB fornece um valor diário (equivalente ao período das 00:00 horas às 24:00 do dia corrente) da concentração dos poluentes para cada estação: média diária da concentração para PM₁₀, NO₂ e SO₂, maior concentração do dia para O₃; maior média móvel de 8 horas do dia CO.

Variáveis meteorológicas

Os dados sobre a temperatura mínima diária e umidade média diária foram obtidos pelo Instituto Astronômico e Geofísico da Universidade de São Paulo (IAG-USP).

Análise estatística

Para investigar a associação entre as variáveis de mortalidade e as concentrações diárias de poluentes foram ajustados modelos aditivos generalizados (em particular, regressão de Poisson), que permitem o ajuste de curvas de alisamento⁷. Trata-se de uma abordagem semi-paramétrica, muito útil para modelar a sazonalidade bem como relações não lineares entre o número de óbitos e as variáveis explicativas. O alisador utilizado neste estudo foi o *loess*⁷.

O número de óbitos é uma contagem e é possível que obedeça a uma distribuição de *Poisson*. Assim, os modelos de regressão de Poisson são preferencialmente considerados na análise desse tipo de dado, pois incorporam as informações a respeito dos parâmetros da distribuição da variável de interesse de forma mais adequada do que os modelos lineares.

Nos modelos ajustados neste estudo, basicamente, o logaritmo natural do número esperado de óbitos foi modelado como função das variáveis explicativas, entre as quais, as concentrações diárias dos poluentes, a umidade relativa média do ar e a temperatura mínima diária.

Para modelar a sazonalidade foi ajustada uma curva de alisamento do número de óbitos em função do número de dias transcorridos. O parâmetro de alisamento foi escolhido após várias tentativas, de forma que a curva apreendesse apropriadamente o comportamento sazonal dos dados.

Uma vez que a relação entre o número de óbitos e a temperatura/umidade pode não ser linear, foram ajustadas curvas de alisamento do número de óbitos em função dessas variáveis meteorológicas.

A estratégia de análise consistiu em ajustar um modelo básico para a mortalidade diária contendo os "melhores" controles para a sazonalidade e clima. Foram ajustadas curvas de alisamento com diferentes parâmetros e após a escolha do mais adequado, foram incluídos no modelo sete variáveis indicadoras representando cada dia da semana. A seguir foram testadas diversas representações das variáveis meteorológicas como, por exemplo, a temperatura e umidade do dia corrente, médias móveis de 1 a 7 dias e defasagens de 1 a 2 dias dessas variáveis

visando obter o “melhor” e mais coerente resultado. A ferramenta utilizada para a escolha do melhor conjunto de variáveis foi o Critério de Informação de Akaike (CIA). O melhor modelo foi aquele com o menor CIA¹⁹. Optou-se por não utilizar curvas de alisamento para a temperatura e para a umidade nos modelos finais porque todas elas apontavam para uma relação linear entre o número de óbitos e as variáveis meteorológicas.

Assim, para os modelos envolvendo os óbitos fetais, foram escolhidos os valores de temperatura de dois dias anteriores e de umidade do dia corrente. Para aqueles envolvendo os óbitos neonatais, foram escolhidos os valores de temperatura e umidade do dia corrente.

Após a escolha dos modelos básicos, os poluentes foram incluídos nestes modelos, considerando as concentrações do dia corrente, suas médias móveis de até 7 dias e defasagens de até 2 dias.

Com o objetivo de simplificar as análises subsequentes, escolheu-se, para cada poluente, o modelo mais “representativo” do seu efeito, definido como sendo o que apresentou o maior e o mais significativo coeficiente para o modelo em questão. A seguir foram ajustados modelos que continham dois poluentes simultaneamente, com o intuito de observar se algum poluente mantinha-se significativa na presença dos demais.

Foi calculado o aumento percentual de mortalidade associado a aumentos da poluição. Nestes cálculos, o aumento da poluição considerado foi aquele correspondente à distância interquartil da distribuição do poluente (percentil 75 menos o percentil 25), conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Aumento Percentual de Mortalidade} = (e^{(\text{coeficiente} \times p75-p25)} - 1) \times 100$$

Onde: e = número de Neper; coeficiente = coeficiente do poluente estimado no modelo de regressão; p75-p25 = diferença entre o terceiro quartil e o primeiro quartil da concentração dos poluentes para o período de estudo.

As análises foram realizadas utilizando os programas SPSS e S-Plus.

RESULTADOS

Os Gráficos 1 e 2 mostram os diagramas de dispersão dos eventos de interesse com as respectivas curvas de alisamento (*loess*) utilizadas nos modelos de regressão de *Poisson*. Estas curvas são variáveis explicativas nos modelos de regressão e correspondem à variabilidade da mortalidade que é devida à sazonalidade.

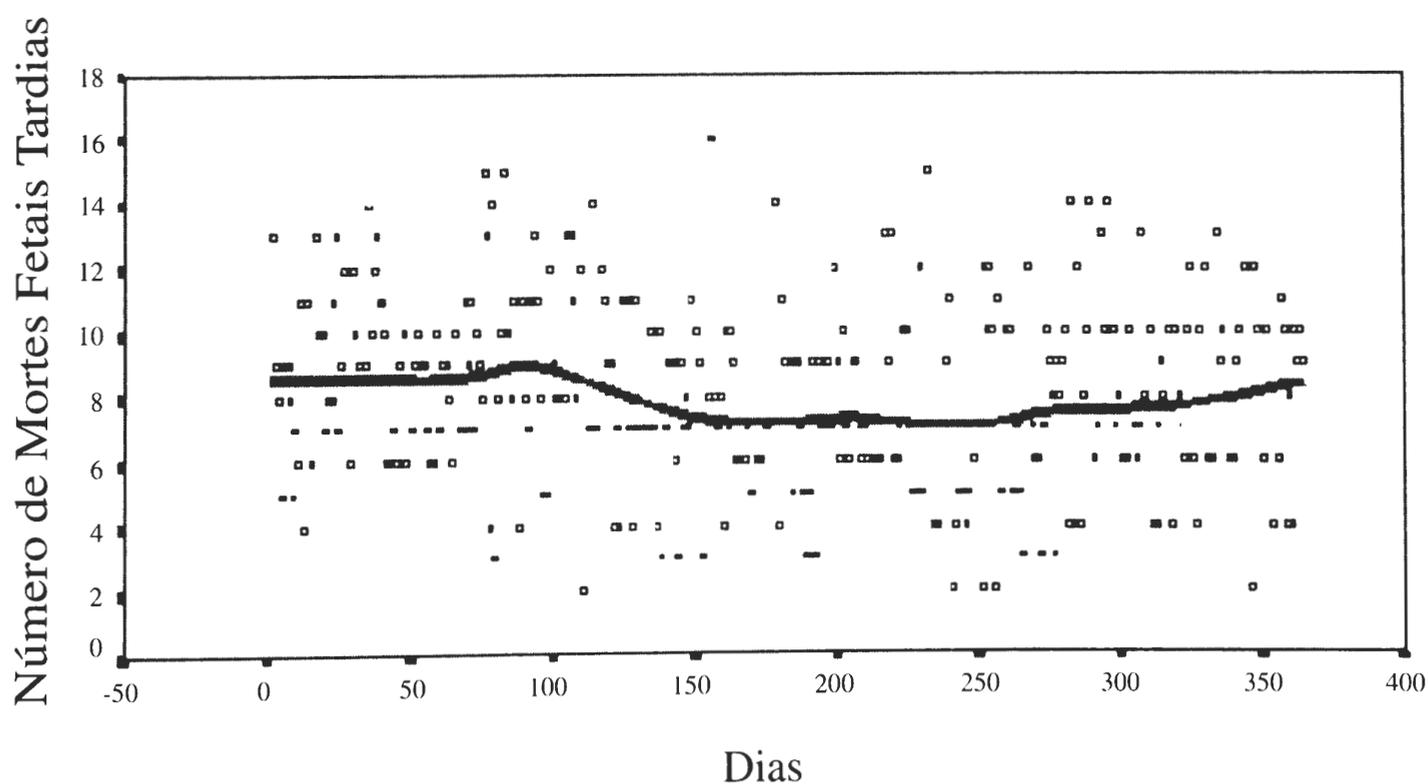


Gráfico 1 Diagrama de dispersão para mortes fetais tardias com a curva de alisamento ajustada.

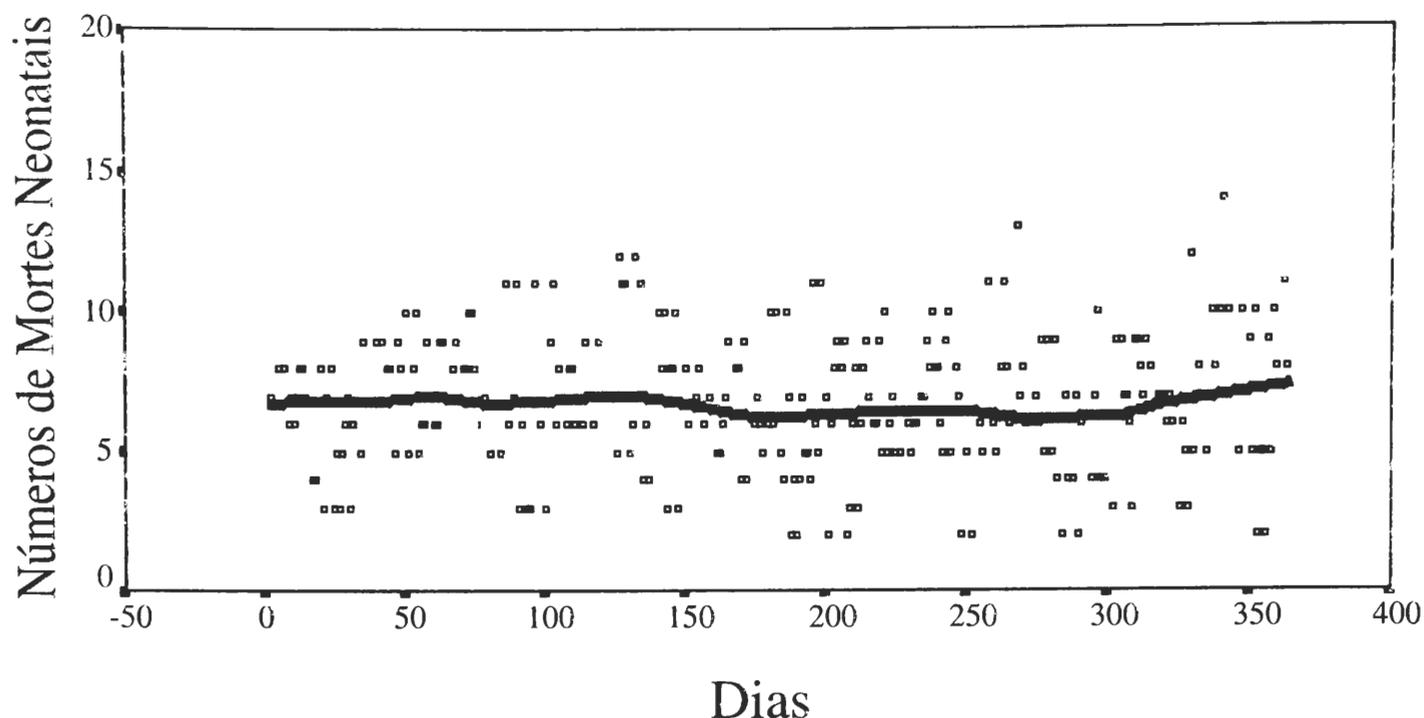


Gráfico 2 - Diagrama de dispersão para mortes neonatais com a curva de alisamento ajustada.

A Tabela 1 apresenta algumas medidas descritivas das variáveis de interesse para o estudo em questão. Observa-se que o número de óbitos fetais e neonatais é baixo, não ultrapassando 17 ocorrências diárias no período estudado.

Tabela 1 Medidas descritivas das principais variáveis incluídas no estudo (todas as variáveis foram medidas em bases diárias).

	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Valores de mortalidade				
Mortalidade intra-uterina	7,92	2,96	2	16
Mortalidade neonatal	6,71	2,80	1	17
Concentrações de poluentes				
PM ₁₀ (mg/m ³)	49,38	20,07	19,29	125,48
SO ₂ (mg/m ³)	13,31	7,40	2,90	45,97
CO (ppm)	3,20	1,43	1,03	10,25
O ₃ (mg/m ³)	66,46	47,32	13,33	389,45
NO ₂ (mg/m ³)	100,06	39,86	32,00	303,00
Variáveis climáticas				
Temperatura mínima (°C)	15,69	3,26	7,20	23,20
Umidade relativa (%)	82,05	7,85	59,00	96,50

A Tabela 2 mostra as estimativas do modelo de regressão básico incluindo a temperatura de dois dias anteriores, umidade média do dia, loess para o número de dias corridos e dias da semana, tendo como variável de interesse a mortalidade fetal tardia.

A Tabela 3 mostra as estimativas do modelo de regressão básico incluindo a temperatura de dois dias anteriores, umidade média do dia, loess para o número de dias corridos e dias da semana, tendo

como variável de interesse a mortalidade neonatal.

A Tabela 4 mostra os resultados de alguns dos modelos finais de regressão de Poisson utilizados, tendo como variável de interesse mortes fetais tardias. Observou-se uma associação significativa entre as concentrações do dia de O₃ e o número de óbitos. Uma associação menos significativa foi encontrada entre as concentrações do dia de NO₂ e o número de óbitos.

Tabela 2 - Coeficientes estimados e erros padrão do modelo básico escolhido para a mortalidade fetal tardia.

	Coeficiente	Erro padrão
Intercepto	1.951	0.222
Loess (n.º dias, 0.25)	-0.509	0.386
Variáveis meteorológicas		
Temperatura de dois dias	0.017***	0.006
Umidade média	-0.004*	0.002
Dias da semana		
Segunda	0.200***	0.074
Terça	0.155**	0.075
Quarta	0.250***	0.073
Quinta	0.260***	0.073
Sexta	0.323***	0.072
Sábado	0.213***	0.074

*** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$

Tabela 3 Coeficiente estimados e erros padrão do modelo básico escolhido para a mortalidade neonatal.

	Coeficiente	Erro padrão
Intercepto	1.365	0.270
Loess (N.º dias, 0.25)	0.112	0.436
Variáveis meteorológicas		
Temperatura de dois dias	0.019***	0.007
Umidade média	0.003	0.003
Dias da semana		
Segunda	0.030	0.081
Terça	-0.022	0.082
Quarta	-0.032	0.082
Quinta	0.009	0.081
Sexta	0.090	0.080
Sábado	-0.027	0.082

*** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$

Tabela 4 - Coeficientes e respectivos erros padrão da concentração do poluente, em modelos que têm como variável de interesse mortes fetais tardias, já controlados para sazonalidade e clima.

	Coeficiente	Erro padrão
O₃		
Dia	0,0008 **	0,0004
Média móvel de 2 dias	0,0005	0,0005
Média móvel de 3 dias	0,0001	0,0006
Média móvel de 4 dias	0,0004	0,0007
NO₂		
Dia	0,0008 *	0,0005
Média móvel de 2 dias	0,0004	0,0006
Média móvel de 3 dias	-0,0002	0,0007
Média móvel de 4 dias	-0,0004	0,0007

*** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos nos modelos de regressão finais utilizados, para os poluentes que foram significantes com a variável de interesse mortes neonatais. Observou-se associações significantes entre PM₁₀, SO₂, O₃ e NO₂ e a variável em questão, sendo que o O₃ mostrou uma associação mais robusta que os outros poluentes. Essas associações se mostraram significantes com uma defasagem de até quatro dias.

Tabela 5 - Coeficientes e respectivos erros padrão da concentração do poluente, em modelos que têm como variável de interesse mortes neonatais, já controlados para sazonalidade e clima.

	Coeficiente	Erro Padrão
PM₁₀		
Dia	0,0038 ***	0,0012
Média Móvel de 2 dias	0,0033 ***	0,0013
Média Móvel de 3 dias	0,0020	0,0013
Média Móvel de 4 dias	0,0013	0,0014
SO₂		
Dia	0,0090 **	0,0033
Média Móvel de 2 dias	0,0097 **	0,0037
Média Móvel de 3 dias	0,0085 **	0,0040
Média Móvel de 4 dias	0,0096 **	0,0043
O₃		
Dia	0,0012 **	0,0004
Média Móvel de 2 dias	0,0015 ***	0,0005
Média Móvel de 3 dias	0,0018 ***	0,0006
Média Móvel de 4 dias	0,0023 ***	0,0007
NO₂		
Dia	0,0014 **	0,0006
Média Móvel de 2 dias	0,0017 *	0,0007
Média Móvel de 3 dias	0,0013	0,0007
Média Móvel de 4 dias	0,0013	0,0008

*** $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; * $p < 0,10$

A Tabela 6 mostra que quando O₃ e NO₂ (poluentes que se mostraram significantes quando incluídos separadamente) são colocados simultaneamente no modelo de regressão, a associação com a mortalidade fetal tardia perde a sua significância.

Tabela 6 - Coeficientes, erros padrão e significâncias das concentrações de cada poluente, em um modelo que tem como variável de interesse mortes fetais tardias, e variáveis explicativas O₃ e NO₂, simultaneamente.

	Coeficiente	Erro padrão	Significância (p)
O ₃	0,0006	0,0004	0,1324
NO ₂	0,0005	0,0006	0,3888

Para a mortalidade neonatal, o O_3 mostrou mais fortemente associado e permaneceu significativo na presença dos demais poluentes. O PM_{10} e o SO_2 também mantiveram-se significantes na presença de O_3 (Tabela 7). Isto sugere que o efeito de cada poluente, pelo menos em parte, independe dos demais.

Tabela 7 - Coeficientes, erros padrão e significâncias das concentrações de cada poluente, em modelos que tem como variável de interesse mortes neonatais, e variáveis explicativas O_3 e PM_{10} , O_3 e SO_2 , O_3 e NO_2 .

	Coeficiente	Erro Padrão	Significância (p)
Modelo 1			
O_3	0,0010	0,0004	0,0263
PM_{10}	0,0028	0,0013	0,0297
Modelo 2			
O_3	0,0011	0,0004	0,0106
SO_2	0,0070	0,0034	0,0427
Modelo 3			
O_3	0,0012	0,0004	0,0033
NO_2	0,0076	0,0163	0,6414

Utilizando os coeficientes obtidos, foi feito um cálculo para o aumento percentual da mortalidade de acordo com o aumento de poluição. Assim sendo, observou-se que um aumento de 43 mg/m^3 de O_3 está associado a um acréscimo de 3,5% na natimortalidade. Um aumento de 53 mg/m^3 de NO_2 está associado a um aumento de 4% no mesmo.

Tratando-se de neonatos, um aumento de 22 mg/m^3 de PM_{10} acarretou em um aumento de 9% na mortalidade. Já para SO_2 , um aumento de 9 mg/m^3 na sua concentração levou a um aumento de 9% no número de mortes. Para o O_3 , um aumento de 43 mg/m^3 ocasionou um aumento de 10% na mortalidade. E, finalmente, para um aumento de 53 mg/m^3 de NO_2 , ocorreu um acréscimo de 9% na mortalidade.

DISCUSSÃO

A realização do presente estudo é bastante importante pois analisa os efeitos da poluição sobre uma parcela da população ainda não explorada num estudo de séries temporais. Encontrou-se uma associação entre o número de óbitos neonatais e os níveis de O_3 , PM_{10} , SO_2 e NO_2 .

Adicionalmente, encontrou-se uma associação entre o número de óbitos fetais e as concentrações de O_3 e NO_2 , sendo que estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Pereira et al.¹²

Observando os resultados, foram encontradas associações concordantes com os estudos anteriores, que mostraram associações de poluentes gasosos com mortalidade. Pereira et al.¹² mostraram importante associação da mortalidade fetal tardia com SO_2 . Conceição⁴ mostrou associação entre diversos poluentes gasosos e mortalidade infantil.

As associações obtidas com mortes fetais tardias mostraram-se positivamente significantes para O_3 , e uma significância marginal para NO_2 . Um aumento da concentração de O_3 do primeiro ao terceiro quartil, aumenta o risco de mortes fetais tardias em 3,5%. Para NO_2 , um aumento da concentração do primeiro ao terceiro quartil eleva o risco em torno de 4,0%. Deve-se lembrar que as concentrações deste poluente têm diminuído em comparação ao estudo de Pereira et al.¹²

Importantes associações com a maioria dos poluentes foram encontradas para a mortalidade neonatal. Apenas o CO não mostrou associação. Para cada poluente, PM_{10} , SO_2 , O_3 e NO_2 , um aumento nas respectivas concentrações, do primeiro ao terceiro quartil, mostrou incremento de aproximadamente 9% no risco de mortes neonatais.

Em ambas análises o O_3 apresentou associações significantes, fato novo e interessante, já que as suas concentrações vêm se mostrando estáveis ao longo do tempo.

Vale lembrar que o presente trabalho estuda os efeitos agudos da poluição, demonstrando que a população enfocada, fetos e recém-nascidos, são bastante suscetíveis a variações da poluição atmosférica. Esses achados epidemiológicos são fundamentados na segunda parte do trabalho realizado por Pereira et al.¹³, em que medindo níveis de carboxi-hemoglobina presentes no sangue do cordão umbilical de uma amostra de 47 recém-nascidos, encontrou um nível maior desse marcador nos dias muito poluídos.

Estudos já exploraram os efeitos crônicos da poluição nos fetos. Wang et al.²⁰ acompanhando gestantes do início até o fim da gravidez, no período de 1988 a 1991 encontraram uma associação entre exposição a poluentes e com baixo peso ao nascimento.

A hipótese de que os óxidos de nitrogênio interferem no transporte de oxigênio são descritos na literatura. Naoum et al. (1984), estudando alterações hematológicas em trabalhadores de Cubatão, demonstraram maior formação de meta-hemoglobina devido a uma maior exposição ao NO_2 . Este resultado pode ser extrapolado para as gestantes, que, ao se exporem a altos níveis de NO_2 , apresentariam níveis de meta-hemoglobina maiores, prejudicando a oxigenação fetal.

O presente trabalho é pioneiro na investigação dos efeitos agudos da poluição do ar em recém-nascidos. A continuidade desse estudo é de suma importância, detalhando as causas de óbitos num período de série temporal maior que permita um melhor controle das

variáveis de sazonalidade, elucidando se há alguma causa de morte neonatal que se sobressai frente à exposição dos poluentes atmosféricos urbanos. Assim se poderá ter uma idéia ainda mais precisa dos agravos provocados pela poluição atmosférica.

Nishioka DC, Coura FLB, Pereira LAA, Conceição GMS. Study of the effects of air pollution in both neonatal mortality and late fetal losses in the city of São Paulo, Brazil. Rev Med (São Paulo) 2000 abr./dez.;79 (2/4):81-9.

ABSTRACT: Several studies have suggested that infants and elderly are more susceptible to the effects of air pollution. Few studies have focused the acute effects of air pollution on fetuses and newborn babies. Using time series analysis techniques, the present study investigates the association between air pollution exposure and neonatal mortality and late fetal losses, in the year of 1998, in the city of Sao Paulo, Brazil. Poisson regression was applied and it was found an association between late fetal losses and levels of O_3 and NO_2 . It was estimated an excess of 3,5% and 4% on mortality. A statistic association was found between levels of O_3 , PM_{10} , SO_2 and NO_2 and an increase of 10% in neonatal mortality. This results show the side effects of air pollution in health, and how fetuses and newborn babies are affected with this environmental problem.

KEYWORDS: Respiratory tract diseases/epidemiology; Air pollution/adverses effects; Fetal mortality; Infant mortality.

REFERÊNCIAS

1. Amdur MO, Doull J, Klaassen CD. Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons. 4th ed. Oxford: Pergamon Press; 1991.
2. Bascom R, Bromberg PA, Costa DA, Devlin R, Dockery DW, Frampton MW, et al. Health effects of outdoor pollution. Am J Respir Crit Care Med 1996;153:3-50.
3. Bobak M, Leon DA. Air pollution and infant mortality in the Czech Republic, 1986-88. Lancet 1992;340:1010-14.
4. Conceição GMS. Métodos estatísticos para avaliação da associação entre poluição atmosférica e marcadores de morbi-mortalidade na cidade de São Paulo e aplicações [dissertação]. São Paulo; 1999. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
5. Derisio JC. Introdução ao controle de poluição ambiental. São Paulo: CETESB; 1992.
6. Dockery DW, Pope III CA. Acute respiratory effects of particulate air pollution. Annu Rev Public Health 1994;15:107-32.
7. Hastie T, Tibshirani R. Generalized additive models. London: Chapman & Hall; 1990.
8. Lemos M, Lichtenfels AJFC, Amaro Jr E, Macchione M, Martins MA, King M, et al. Quantitative pathology of nasal passages in rats exposed to urban levels of air pollution. Environ Res 1994;66:87-95.
9. Logan WPD. Mortality in London fog incident, 1952. Lancet 1953;1:336-8.
10. Loomis D, Castillejos M, Gold DR, McDonnell W, Borja-Arbutto VH. Air pollution and Infant mortality in Mexico City. Epidemiol Res 1999;10:118-23.
11. Naoum PC, Mourão CA, Ruiz MA. Alterações hematológicas induzidas por poluição industrial em moradores e industriários de Cubatão (S. Paulo, Brasil). Rev Salud Publica 1984;18:271-7.
12. Pereira PM, Saldiva PHN, Sakae RS, Böhm GM, Martins MA. Urban levels of air pollution increase lung responsiveness in rats. Environ Res 1995;69:96-101.
13. Pereira LAA, Loomis D, Conceição GMS, Braga ALF, Arcas RM, Kishi H, et al. Association between air pollution and intrauterine mortality in São Paulo, Brazil. Environ Health Perspect 1998;106:325-9.
14. Reymão MSF, Cury PM, Lichtenfels AJFC, Battlehner CN, Conceição GMS, Cappellozi VL, et al. Urban air pollution enhances the formation of urethane-induced lung tumors in mice. Environ Res 1997;74:150-8.
15. Saldiva PHN, King M, Delmonte VLC, Macchione M, Parada MAC, Daliberto ML, et al. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. Environ Res 1992;57:19-33.
16. Saldiva PHN, Pope III CA, Schwartz J, Dockery DW, Lichtenfels AJ, Salge JM. Et al. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. Arch Environ Health 1995;50:159-63.

17. Saldiva PHN, Lichtenfels AJFC, Paiva PSO, Barone IA, Martins MA, Massad E, et al. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brazil: a preliminar report. *Environ Res* 1994;65:218-25.
18. Schwartz J. Air pollution and hospital admissions for respiratory disease. *Epidemiol Res* 1996;7:20-7
19. Splus-4. Guide to statistics. Seattle: MathSoft, Data Analisis Products Division; 1997
20. Wang X, Ding H, Ryan L, Xu X. Association between air pollution and low birth weight: a community-based study. *Environ Health Perspect* 1997;105:514-20.
21. Woodruff TJ, Grillo J, Schoendorf KC. The relationship between selected causes of post-neonatal infant mortality and particulate air pollution in the United States. *Environ Health Perspect* 1997;105:608-12.

Índice de autores/Authors index

Amato Neto V, 12
Bianchi Jr PFG, 73
Boulos M, 1
Brescia MEG, 65
Chieffi PP, 12
Conceição GMS, 81
Cotti GCC, 45
Coura FLB, 81
Dias JCP, 12
Dutenhefner SE, 73
Ejzenberg D, 36
Guastini CMF, 27
Habr-Gama A, 45
Kanashiro EH, 73
Kimura ET, 36
Kobata CHP, 73

Lacaz CS, 32
Lopes MH, 12, 27
Martino RB, 45
Massarollo PCB, 65
Neves MC, 73
Nishioka DC, 81
Nisida IVV, 12
Pereira LAA, 81
Ruocco RMSA, 12
Sabino EC, 12
Santos FPS, 45
Sartori AMC, 27
Sebastianes FM, 45
Seid VE, 45
Shikanai-Yasuda MA, 27
Silva FSC, 73
Umezawa ES, 12

Índice de assunto

Adenocarcinoma/epidemiologia

Genética do Câncer Colorretal, 45

Adenocarcinoma/genética

Genética do Câncer Colorretal, 45

AIDS

Novas características das endemias em centros urbanos, 27

Apoptose/efeitos de drogas

Avaliação da ocorrência de apoptose em células foliculares da tiróide de rato após estimulação seguida de supressão do hormônio tireotrófico endógeno, 36

Cateterismo/métodos

Comparação entre as pressões portal e da veia hepática ocluída no transplante de fígado, 65

Dilatação com balão/métodos

Comparação entre as pressões portal e da veia hepática ocluída no transplante de fígado, 65

Doença de Chagas

Novas características das endemias em centros urbanos, 27

Doenças endêmicas

Malária, 1

Novas características das endemias em centros urbanos, 27

Doenças respiratórias/epidemiologia

Estudo dos efeitos da poluição atmosférica na mortalidade neonatal e fetal na cidade de São Paulo, 81

Doenças transmissíveis/transmissão

História das vacinações. As grandes figuras de Edward Jenner (1749-1823) e Gustavo Ramon (1886-1963), 32

Enteropatias parasitárias/complicações

Manifestação intestinal rara em paciente com imunodeficiência comum variável e estrogiloidíase, 73

Estrongiloidíase/etiologia

Manifestação intestinal rara em paciente com imunodeficiência comum variável e estrogiloidíase, 73

Estudos de avaliação

Avaliação da ocorrência de apoptose em células foliculares da tiróide de rato após estimulação seguida de supressão do hormônio tireotrófico endógeno, 36

Estudos prospectivos

Comparação entre as pressões portal e da veia hepática ocluída no transplante de fígado, 65

Hormônios tireoidianos/análise

Avaliação da ocorrência de apoptose em células foliculares da tiróide de rato após estimulação seguida de supressão do hormônio tireotrófico endógeno, 36

Imunodeficiência de variável comum/etiologia

Manifestação intestinal rara em paciente com imunodeficiência comum variável e estrogiloidíase, 73

Imunoterapia ativa/métodos

História das vacinações. As grandes figuras de Edward Jenner (1749-1823) e Gustavo Ramon (1886-1963), 32

Literatura de revisão

Malária, 1

Malária

Malária, 1

Modelos lineares

Comparação entre as pressões portal e da veia hepática ocluída no transplante de fígado, 65

Mortalidade fetal

Estudo dos efeitos da poluição atmosférica na mortalidade neonatal e fetal na cidade de São Paulo, 81

Mortalidade infantil

Estudo dos efeitos da poluição atmosférica na mortalidade neonatal e fetal na cidade de São Paulo, 81

Mutação/genética

Genética do câncer colorretal, 45

Neoplasias colorretais/epidemiologia

Genética do câncer colorretal, 45

Neoplasias colorretais/genética

Genética do câncer colorretal, 45

Polipose adenomatosa de cólon/genética

Genética do câncer colorretal, 45

Poluição do ar/efeitos adversos

Estudo dos efeitos da poluição atmosférica na mortalidade neonatal e fetal na cidade de São Paulo, 81

Pressão na veia porta

Comparação entre as pressões portal e da veia hepática ocluída no transplante de fígado, 65

Prevenção primária

Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*, 12

Ratos Wistar

Avaliação da ocorrência de apoptose em células foliculares da tiróide de rato após estimulação seguida de supressão do hormônio tireotrófico endógeno, 36

Sequências de bases/genética

Genética do câncer colorretal, 45

Supressão

Avaliação da ocorrência de apoptose em células foliculares da tiróide de rato após estimulação seguida de supressão do hormônio tireotrófico endógeno, 36

Tirotropina/análise

Avaliação da ocorrência de apoptose em células foliculares da tiróide de rato após estimulação seguida de supressão do hormônio tireotrófico endógeno, 36

Transfusão de sangue

Novas características das endemias em centros urbanos, 27

Transplante de fígado/efeitos adversos

Comparação entre as pressões portal e da veia hepática ocluída no transplante de fígado, 65

Transmissão de doença

Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*, 12

Trypanosoma cruzi

Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*, 12

Vacinação/história

História das vacinações. As grandes figuras de Edward Jenner (1749-1823) e Gustavo Ramon (1886-1963), 32

Veias circulação hepática

Comparação entre as pressões portal e da veia hepática ocluída no transplante de fígado, 65

Keywords index

Acquired immunodeficiency syndrome

New features of the endemic diseases in urban centers, 27

Adenocarcinoma/epidemiology

Genetics of colorectal cancer, 45

Adenocarcinoma/genetics

Genetics of colorectal cancer, 45

Adenomatous polyposis coli/genetics

Genetics of colorectal cancer, 45

Air pollution/adverse effects

Study of the effects of air pollution in both neonatal mortality and late fetal losses in the city of São Paulo, Brazil, 81

Apoptosis/drugs effect

Evaluation of apoptosis occurrence in the thyroid follicular cells of rat after stimulation followed by suppression of endogenous thyrotrophic hormone, 36

Ballon dilatation/methods

Confrontation between portal pressure and wedged hepatic venous pressure after liver transplantation, 65

Blood transfusion

New features of the endemic diseases in urban centers, 27

Catheterization/methods

Confrontation between portal pressure and wedged hepatic venous pressure after liver transplantation, 65

Chagas' disease

New features of the endemic diseases in urban centers, 27

Colorectal neoplasms/epidemiology

Genetics of colorectal cancer, 45

Colorectal neoplasms/genetics

Genetics of colorectal cancer, 45

Communicable diseases/transmission

História das vacinações. As grandes figuras de Edward Jenner (1749-1823) e Gustavo Ramon (1886-1963), 32

Common variable immunodeficiency/etiology

Uncommon gastrointestinal manifestation in immunodeficient patient's report case, 73

Disease transmission

Referring prevention to the alternative modalities of transmission of the *Trypanosoma cruzi*, 12

Endemic diseases

Malária, 1

Evaluation studies

Evaluation of apoptosis occurrence in the thyroid follicular cells of rat after stimulation followed by suppression of endogenous thyrotrophic hormone, 36

Fetal mortality

Study of the effects of air pollution in both neonatal mortality and late fetal losses in the city of São Paulo, Brazil, 81

Immunotherapy, active/methods

História das vacinações. As grandes figuras de Edward Jenner (1749-1823) e Gustavo Ramon (1886-1963), 32

Infant mortality

Study of the effects of air pollution in both neonatal mortality and late fetal losses in the city of São Paulo, Brazil, 81

Intestinal disease, parasitic/complications

Uncommon gastrointestinal manifestation in immunodeficient patient's report case, 73

Linear models

Confrontation between portal pressure and wedged hepatic venous pressure after liver transplantation, 65

Liver circulation

Confrontation between portal pressure and wedged hepatic venous pressure after liver transplantation, 65

Liver transplantation/adverse effects

Confrontation between portal pressure and wedged hepatic venous pressure after liver transplantation, 65

Malária

Malária, 1

Mutation/genetics

Genetics of colorectal cancer, 45
New features of the endemic diseases in urban centers, 27

Portal pressure

Confrontation between portal pressure and wedged hepatic venous pressure after liver transplantation, 65

Primary prevention

Referring prevention to the alternative modalities of transmission of the *Trypanosoma cruzi*, 12

Prospective studies

Confrontation between portal pressure and wedged hepatic venous pressure after liver transplantation, 65

Rats, Wistar

Evaluation of apoptosis occurrence in the thyroid follicular cells of rat after stimulation followed by suppression of endogenous thyrotrophic hormone, 36

Respiratory tract diseases/epidemiology

Study of the effects of air pollution in both neonatal mortality and late fetal losses in the city of São Paulo, Brazil, 81

Review literature

Malária, 1

Sequence/genetics

Genetics of colorectal cancer, 45

Strongyloidiasis/etiology

Uncommon gastrointestinal manifestation in immunodeficient patient's report case, 73

Suppression

Evaluation of apoptosis occurrence in the thyroid follicular cells of rat after stimulation followed by suppression of endogenous thyrotrophic hormone, 36

Thyroid hormones/analysis

Evaluation of apoptosis occurrence in the thyroid follicular cells of rat after stimulation followed by suppression of endogenous thyrotrophic hormone, 36

Thyrotropin/analysis

Evaluation of apoptosis occurrence in the thyroid follicular cells of rat after stimulation followed by suppression of endogenous thyrotrophic hormone, 36

Trypanosoma cruzi

Referring prevention to the alternative modalities of transmission of the *Trypanosoma cruzi*, 12

Vaccination/history

História das vacinações. As grandes figuras de Edward Jenner (1749-1823) e Gustavo Ramon (1886-1963), 32

Orientação aos Colaboradores

Rev Med (São Paulo) 2000 abr./dez.;79(2-4):36-94

1 OBJETIVOS DA REVISTA

A "Revista de Medicina" é um periódico trimestral que tem por finalidade a publicação de artigos de profissionais e estudantes de medicina e ciências afins.

O artigo deverá atingir um nível de complexidade de forma a atender alunos de graduação de curso superior e pós-graduação stricto e lato sensu.

Para esse fim, sempre que possível, encoraja-se um enfoque fisiopatológico ao texto. Somente serão aceitos artigos de caráter médico-científico. Deseja-se que sejam citadas referências atualizadas permitindo leituras complementares mais aprofundadas. Artigos de revisão serão aceitos mediante aprovação do Conselho Consultivo.

2 PRÉ-REQUISITOS PARA ACEITAÇÃO DOS ARTIGOS

A aceitação de artigos pelo Corpo Editorial depende:

- da sua adequação aos objetivos da "Revista de Medicina";
- do respeito às normas para apresentação definidas no item 4:

Os artigos devem ser inéditos e destinar-se exclusivamente à "Revista de Medicina". Os artigos publicados são de propriedade da revista sendo vedada a reprodução total ou parcial em outros periódicos, bem como a tradução para outros idiomas sem a autorização do Corpo Editorial da revista. Todos os artigos submetidos à apreciação do Corpo Editorial deverão ser acompanhados de uma declaração de transferência de direitos autorais, assinada por todos os autores. No caso da não aprovação de um artigo pelo Corpo Editorial, esse será devolvido aos autores. A "Revista de Medicina" não se responsabiliza pelos conceitos e opiniões emitidos nos artigos, sendo esses de exclusiva responsabilidade dos autores.

Toda matéria relacionada à investigação humana e à pesquisa animal deve ter a aprovação prévia da Comissão de Ética da Instituição onde o trabalho foi realizado, de acordo com as recomendações da Declaração de Helsinque (1964 e suas versões posteriores de 1965, 1983 e 1989), as Normas Internacionais de Proteção aos Animais e a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

3 SELEÇÃO DOS ARTIGOS

Os artigos aceitos pelo Corpo Editorial serão encaminhados a um membro do Conselho Consultivo. Este designará relatores responsáveis pela avaliação dos artigos. O autor permanecerá anônimo perante o Conselho Consultivo e os relatores, e estes permanecerão anônimos perante o autor.

Caso o artigo não seja aprovado pelo Conselho Consultivo, os autores serão comunicados desta decisão.

O Corpo Editorial se reserva o direito de realizar adaptações ao estilo da revista e corrigir eventuais erros gramaticais, de grafia, de digitação, de normalização bibliográfica, nos unitermos e keywords, sem alterações no conteúdo dos artigos.

4 NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DE ARTIGOS

Os artigos devem apresentar 10 a 15 páginas digitadas em espaço duplo e em uma só face do papel A4, preservando 3 centímetros nas laterais. Devem ser apresentados um original e duas cópias do artigo.

Na página de rosto devem constar:

- título do artigo elaborado de forma clara e concisa;
- versão do título em inglês;
- nome completo dos autores e respectivos títulos profissionais e acadêmicos;
- instituição na qual o trabalho foi realizado;
- referência à publicação do trabalho em evento indicando local e data de realização;
- nome, endereço e e-mail do autor responsável pela publicação.

4.1 Resumo / Abstract

Todo artigo deve apresentar dois resumos: um em português e outro em inglês. Os resumos devem ter no máximo 250 palavras. O resumo deve:

- indicar o objetivo do trabalho;
- descrever de forma concisa os métodos e técnicas, quando novos, nomear princípios básicos, tipos de operação e grau de exatidão;

- relacionar os resultados em ordem lógica, usando o verbo no passado;
- discutir a compatibilidade ou não entre resultados obtidos e as investigações anteriores;
- usar o verbo na voz ativa e na terceira pessoa do singular;
- evitar as locuções "o autor descreve" "neste artigo" "o autor expõe";
- não adjetivar;
- não usar parágrafos.

4.2 Descritores / Keywords

Devem ser no máximo 5, de acordo com as metodologias:

Descritores em Ciências da Saúde. Metodologia LILACS - Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (<http://www.bireme.br/decs/>);
MESH Medical Subject Heading da National Library of Medicine (<http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/>).

4.3 Estrutura Formal

Introdução Estabelecer o objetivo do trabalho, embasado em bibliografia, relacionando-o a outros trabalhos publicados anteriormente, esclarecendo o estado atual em que se encontra o problema investigado.

Material e Métodos ou Casuística e Métodos (quando a pesquisa envolve seres humanos) Descrever procedimentos, apresentar as variáveis incluídas na pesquisa, determinar e caracterizar a população e a amostra, detalhar técnicas e equipamentos novos, indicar quantidades exatas, referenciar os métodos e técnicas utilizados (incluindo métodos estatísticos).

Resultados Exposição factual da observação, apresentados na sequência lógica do texto e apoiados por gráficos e tabelas.

Discussão - Apresentar os dados obtidos e resultados alcançados, estabelecer a compatibilidade ou não com os resultados anteriores de outros autores. As comunicações pessoais ou publicações de caráter restrito devem ser evitadas como provas de argumento.

Conclusões - Apresentar as deduções lógicas fundamentadas nos resultados e na discussão. As conclusões podem ser concluídas na Discussão.

Agradecimentos (Opcionais) Devem ser breves, dirigidos a pessoas e instituições que contribuíram para elaboração do trabalho.

4.3.1 Referências

Organizar uma lista na ordem alfabética, pelo último sobrenome dos primeiros autores e numerar consecutivamente. Citar as iniciais do prenome.

Citar os seis primeiros autores de acordo com "normas de Vancouver"

Abreviar os títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* (<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>).

Seguir Estilo de Vancouver "*Requisitos Uniformes para Originais Submetidos a Revistas Médicas*" (<http://www.icmje.org/index.html>)

Apresentar as referências de acordo com os exemplos:

Livros e outras monografias

Pastore AR, Cerri GG. Ultra-sonografia: ginecologia, obstetrícia. São Paulo: Sarvier; 1997

Capítulo de Livros

Boulos M. Malária. In: Amato Neto V, Baldy JLS, editores. Doenças transmissíveis. 3ª ed. São Paulo: Sarvier; 1989. p.00-00.

Artigo de Periódico

Shikanai-Yasuda MA, Sartori AMC, Guastini CMF, Lopes MH. Novas características das endemias em centros urbanos. Rev Med (São Paulo) 2000;79(1):27-31.

Dissertações e Teses

Del Sant R. Propedêutica das síndromes catatônicas agudas [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1989.

• **Eventos considerados no todo**

7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p.1561-5.

Eventos considerados em parte

House AK, Levin E. Immune response in patients with carcinoma of the colo and rectum and stomach. In: Resúmenes do 12º Congreso Internacional de Cancer; 1978; Buenos Aires; 1978. p.135.

A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores.

Material eletrônico

Morse SS. Factors in the emergence of infections diseases. Emerg Infect Dis [serial online]; 1(1):[24 screens].
Available form: URL. <http://www.cdc.gov/oncidod/EID/eid.htm>
CDI, clinical dermatology illustrated [monograph on CD-ROM], Reeves JRT, Maibach H. CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. Sand Diego: CMEA; 1995.

Normas completas poderão ser consultadas

“Estilo Vancouver” - Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals (Requisitos uniformes para originais submetidos a revistas médicas):

- Ann Intern Med 1997;126:36-47;
- N Engl J Med, 1991;324:424-8;
- Folha Medica 2000;119(2):9-21;
- <http://www.icmje.org/index.html>;
- <http://www.cma.ca/mwc/uniform.htm>.

4.5 Citação no Texto

As referências são representadas no texto pelo número índice e, apenas em casos especiais, é acrescido o nome do autor. Exemplo: Gown¹⁰

4.6 Tabelas

Devem ser digitadas e apresentadas em folhas à parte, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos na ordem em que forem citadas no texto. Evitar linhas verticais e inclinadas. A entidade responsável pelo levantamento de dados deve ser indicada no rodapé da Tabela.

4.7 Figuras

Todas as ilustrações, fotografias, desenhos, slides, gráficos, etc. devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos na ordem em que forem citadas no texto, identificados como figuras por número e título do trabalho. As legendas devem ser apresentadas em folha a parte, de forma breve e clara.

5 INSTRUÇÕES PARA O ENVIO DE CÓPIAS ELETRÔNICAS

A REVISTA de MEDICINA aceita cópia de trabalhos em versão eletrônica, em disquete de 3,5', gravado em formato Microsoft Word ou através do endereço eletrônico: revistademedicina@caoc.org.br. É possível converter a partir de outros processadores de texto, mas o processo pode induzir a erros. Não envie arquivos ASCII. Cada disquete deve estar claramente identificado e marcado com o nome do autor, título do trabalho e equipamento usado para gerar o disquete, processador de texto (incluindo o número da versão) e nome do arquivo usado. O texto submetido em cópia eletrônica deve ser a versão final corrigida do artigo e estar de acordo com a versão final aceita para publicação. Apague qualquer outro material do disquete.

Siga as instruções gerais de estilo, em especial as das Referências, contidas acima.

Ilustrações e Tabelas serão manuseadas de modo convencional, entretanto, as legendas devem ser incluídas no final do arquivo eletrônico. Caracteres não-standard (letras gregas, símbolos matemáticos, etc) devem ser codificados no texto. Faça uma lista de tais caracteres e dos códigos usados.

Os artigos devem ser enviados para:

Departamento Científico

Revista de Medicina

Centro Acadêmico Oswaldo Cruz

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Av. Dr. Arnaldo, 455 Subsolo

01246-903 São Paulo, SP

Tel.: (011) 3066-7410

e-mail: revistademedicina@caoc.org.br

<http://www.revistademedicina.com.br>

PROVEDOR DE SOLUÇÕES DE COMUNICAÇÃO

Da idéia...

CRIAÇÃO

PRÉ-IMPRESSÃO

diagramação e editoração

escaneamento

tratamento de imagens

...ao resultado!

IMPRESSÃO

promocional e editorial



PATY DIGITAL

Rua Conselheiro Brotero, 181 - São Paulo - CEP 01154-001 - PABX 3666-4282 - www.patydigital.com.br

ORIENTAÇÕES PARA O USO

Esta é uma cópia digital de um documento (ou parte dele) que pertence a um dos acervos que fazem parte da Biblioteca Digital de Obras Raras e Especiais da USP. Trata-se de uma referência a um documento original. Neste sentido, procuramos manter a integridade e a autenticidade da fonte, não realizando alterações no ambiente digital – com exceção de ajustes de cor, contraste e definição.

1. Você apenas deve utilizar esta obra para fins não comerciais. Os livros, textos e imagens que publicamos na Biblioteca Digital de Obras Raras e Especiais da USP são de domínio público, no entanto, é proibido o uso comercial das nossas imagens.

2. Atribuição. Quando utilizar este documento em outro contexto, você deve dar crédito ao autor (ou autores), à Biblioteca Digital de Obras Raras e Especiais da USP e ao acervo original, da forma como aparece na ficha catalográfica (metadados) do repositório digital. Pedimos que você não republique este conteúdo na rede mundial de computadores (internet) sem a nossa expressa autorização.

3. Direitos do autor. No Brasil, os direitos do autor são regulados pela Lei n.º 9.610, de 19 de Fevereiro de 1998. Os direitos do autor estão também respaldados na Convenção de Berna, de 1971. Sabemos das dificuldades existentes para a verificação se uma obra realmente encontra-se em domínio público. Neste sentido, se você acreditar que algum documento publicado na Biblioteca Digital de Obras Raras e Especiais da USP esteja violando direitos autorais de tradução, versão, exibição, reprodução ou quaisquer outros, solicitamos que nos informe imediatamente (dtsibi@usp.br).