



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA**

**MIGUEL ANGELO MARTINS DE CASTRO JUNIOR**

**EFEITO DA PRIMA-1 NA CARCINOGENESE ESOFÁGICA INDUZIDA POR DIETILNITROSAMINA**

**PORTO ALEGRE - RS  
2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA**

**MIGUEL ANGELO MARTINS DE CASTRO JUNIOR**

**EFEITO DA PRIMA-1 NA CARCINOGENESE ESOFÁGICA INDUZIDA POR DIETILNITROSAMINA**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Grad.  
em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS.  
Universidade Federal do Rio Grande - FURG  
Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando Francesconi  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Susi Helene Lauz Medeiros

**PORTO ALEGRE - RS  
2015**

### CIP - Catalogação na Publicação

Martins de Castro Junior, Miguel Angelo  
Efeito da PRIMA-1 na Carcinogênese Esofágica  
Induzida por Dietilnitrosamina. / Miguel Angelo  
Martins de Castro Junior. -- 2015.  
59 f.

Orientador: Carlos Fernando Francesconi.

Coorientador: Susi Heliene Lauz Medeiros.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências em Gastroenterologia e  
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. PRIMA-1. 2. p53. 3. Carcinogênese Esofágica.  
4. Dietilnitrosamina. 5. Esôfago. I. Francesconi,  
Carlos Fernando , orient. II. Lauz Medeiros, Susi  
Heliene, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Dedico a meus Filhos, Guilherme e Bernardo, e a minha Esposa, Angela,  
completam minha vida e nada valeria a pena sem vocês.  
Finalmente, a meus Pais, Miguel e Gladis,  
sinônimos de amor infinito.**

**“Não importa quão estreito é o portão,  
Não importa o tamanho do castigo.  
Eu sou o dono do meu destino.  
Eu sou o capitão da minha alma.”  
William Ernest Henley - 1875.**

## AGRADECIMENTOS

*À Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, em especial ao Curso de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, no que tange seus professores, destacando o Coordenador Prof. Dr. Carlos Fernando Francesconi, pela oportunidade de completar a formação em stricto sensu e pelo profissionalismo na condução durante o período.*

*À Professora Doutora Susi Helene Lauz Medeiros, co-orientadora, o agradecimento ao grande estímulo na fase inicial desta Tese e por ter acreditado na possibilidade de realiza-la.*

*À Universidade Federal do Rio Grande - FURG, pelo apoio na busca desta distinção acadêmica e abertura de seus laboratórios para o desenvolvimento desta Tese.*

*À Faculdade de Medicina, principalmente, aos colegas da Area da Cirurgia da Universidade Federal do Rio Grande, pelo apoio nos períodos de afastamento e pela grandiosidade no entendimento dessa necessidade.*

*Ao Hospital Universitário de Rio Grande e Direção, que apoiaram este projeto e principalmente foram sensíveis à ausência em momentos de dedicação exclusiva da pesquisa.*

*Às funcionárias do Biotério Setorial do Laboratório de Morfologia Experimental, do Setor de Anatomia, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande, Angela Pötter de Castro e Ana Luiza Mazorco pelo cuidado e trato dos animais durante os experimentos.*

*Ao Professor Doutor Carlos Renan Varela Juliano pela coordenação de seu Laboratório de Patologia, o Centro Integrado de Patologia, na confecção do trabalho anatomopatológico.*

*Ao Professor Doutor Antonio Sergio Varela Junior, e Equipe do Laboratório de Histologia da Universidade Federal do Rio Grande pelo trabalho com lâminas de microscopia.*

*À Professora Sandra Malagutti, pelo auxílio e orientações estatísticas.*

*Finalmente, as Famílias Braga de Castro e Pötter compartilha-se esta conquista.*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Carcinogênese Esofágica.....	3
2.2 Carcinogênese Experimental.....	5
2.3 Câncer: Descontrole do Ciclo Celular.....	6
2.4 TP53: Reativando o p53.....	10
2.5 PRIMA-1.....	13
3 JUSTIFICATIVA.....	16
4 QUESTÃO DE PESQUISA.....	17
5 HIPÓTESE.....	18
6 OBJETIVOS.....	19
6.1 Objetivo Geral.....	19
6.2 Objetivos Específicos.....	19
7 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
7.1 Delineamento.....	20
7.2 Animais e Ambiente.....	20
7.3 Experimento.....	21
7.4 Eutanásia.....	22
7.5 Necrópsia.....	22
7.6 Preparo do Material.....	24
7.7 Avaliação Imuno-Histoquímica.....	26
7.8 Análise Estatística.....	27
8 RESULTADOS.....	28
9 DISCUSSÃO.....	37
10 CONCLUSÕES.....	41
11 PERSPECTIVA/CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
12 ANEXO.....	43
13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
14 ARTIGO EM INGLES.....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Mutação gene TP53 detectada apartir de esofagite na carcinogênese esofágica.....	4
Figura 2	- Representa�o esquemática do ciclo celular.....	7
Figura 3	- Representa�o esquemática do ciclo celular.....	9
Figura 4	- Percentual de muta�es no Gene TP53 classificado por neoplasias.	10
Figura 5	- Vias supressoras tumorais que são terapias-alvo com objetivo principal de induzir apoptose.....	13
Figura 6	- PRIMA-1 induz a apoptose por ativa�o do gene p53 mutado via mitocondrial. Reativa�o causa hipersensibiliza�o apopt�ica através de Bax, PUMA, Noxa e Caspase 2.....	13
Figura 7	- Indu�o seletiva da apoptose baseados nas características celulares.....	14
Figura 8	- Fluxograma do experimento. Estudo experimental com dois grupos controles(sem DEN), grupo I(sem PRIMA-1) e grupo II(com PRIMA-1) e quatro estudos(com DEN), grupo III(sem PRIMA-1 inicial), grupo IV(com PRIMA-1 inicial), grupo Va(sem PRIMA-1 inicial após 150 dias) e grupo Vb(com PRIMA-1 inicial após 150 dias). (DEN: dietilnitrosamina; PRIMA-1: p53 reactivation and induction of massive apoptosis).....	21
Figura 9	- (a)Exposi�o toracoabdominal, seguindo-se (b)exposi�o esofágica com disseca�o abdominal e tor�tica e, finalmente, (c)sec�o esofágica no hipofaringe e após sec�o na porão diretamente inferior ao pr�-estômago..	23
Figura 10	- Fotomicrografia de esôfago normal com disposi�o de rolo sobre si mesmo.	24
Figura 11	- Gráfico de barras demonstrando achados histopatológicos dos grupos III e IV. (LIE baixo grau: lesão intraepitelial de baixo grau; LIE alto grau: lesão intraepitelial de alto grau).....	29
Figura 12	- Gráfico de barras demonstrando achados histopatológicos dos grupos Va e Vb. (LIE baixo grau: lesão intraepitelial de baixo grau; LIE alto grau: lesão intraepitelial de alto grau).....	30
Figura 13	- Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imuno-histoquímica do p53 dos grupos I e II.....	31
Figura 14	- Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imuno-histoquímica do p53 dos grupos III e IV.....	32
Figura 15	- Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imuno-histoquímica do p53 dos grupos Va e Vb.....	33
Figura 16	- Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imuno-histoquímica do Ki67 dos grupos I e II.....	34
Figura 17	- Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imuno-histoquímica do Ki67 dos grupos III e IV.....	35
Figura 18	- Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imuno-histoquímica do Ki67 dos grupos Va e Vb.....	36



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Mutações genéticas em carcinoma células escamosas.....	3
Tabela 2	- Idade média de aparecimento de câncer relacionado ao efeito da mutação sobre o gene TP53.....	12

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACE	Adenocarcinoma Esofágico
CCE	Carcinoma Células Escamosas
COX-2	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2
DEN	Dientilnitrosamina
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
EGFR	Epidermal Grown Factor Receptor
FURG	Universidade Federal de Rio Grande
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
INCA	Instituto Nacional do Câncer
PRIMA-1	p53 Reactivation and Induction of Massive Apoptosis
RNA	Ácido Ribonucléico
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## RESUMO

O Carcinoma de células escamosas é o tipo histológico mais comum das neoplasias esofágicas no mundo. Tem sua origem no epitélio escamoso do esôfago e é achado com maior frequência no terço médio do órgão. A carcinogênese esofágica é um processo que resulta do acúmulo de mutações envolvendo diferentes genes, como o TP53. Este está mutado em mais de 50% dos tumores esofágicos. Inúmeras pesquisas têm sido direcionadas para restaurar a função da proteína p53, as quais resultaram na descoberta da PRIMA-1. Neste estudo, foram pesquisados possíveis efeitos protetores da PRIMA-1 no epitélio do esôfago sob efeito carcinogênico químico evitando o desenvolvimento neoplásico e induzindo involução da carcinogênese. Para testar esta hipótese, realizamos estudo, com utilização da PRIMA-1, em um modelo experimental de carcinogênese esofágica por dietilnitrosamina com indução de carcinoma de células escamosas. O estudo experimental foi realizado com 6 grupos de animais, onde os grupos I e II foram considerados controles, sendo diferenciados por uso da PRIMA-1. E os grupos III e IV, e Va e Vb, foram considerados estudos, os quais receberam dietilnitrosamina por 3 dias consecutivos semanalmente. Enquanto os grupos III e IV, foram diferenciados pelo uso de PRIMA-1 prévio ao início da carcinogênese, os grupos Va e Vb, foram diferenciados pelo uso de PRIMA-1 ao final da carcinogênese. O estudo apresentou data de eutanásia com colheita de peças esofágicas, aos 150 dias, grupos I, II, III e IV, e 180 dias, grupos Va e Vb, devido ao período de observação após uso tardio da PRIMA-1. Não foram detectadas alterações histopatológicas nos grupos controles, grupo I (DEN-/PRIMA-) e II (DEN-/PRIMA+). Não foram detectadas diferenças nas alterações histopatológicas estatisticamente significativas entre os grupos III (DEN+/PRIMA-) e IV (DEN+/PRIMA+ inicial). Foram detectadas diferenças nas alterações histopatológicas estatisticamente significativas entre os grupos Va (DEN+/PRIMA-) e Vb (DEN+/PRIMA+ tardio). A análise imunohistoquímica do p53 evidenciou diferença estatística nos grupos que utilizaram a PRIMA-1, em relação aos seus controles. A análise imunohistoquímica do Ki-67 demonstrou diferença estatística somente entre os dois grupos controles. Conclui-se que a PRIMA-1 teve efeito de redução da gravidade histopatológica em esôfago de camundongos previamente induzidos a carcinogênese com dietilnitrosamina e aumento da expressão imuno-histoquímica da proteína p53.

**Descritores:** PRIMA -1. Esôfago. Dietilnitrosamina. Carcinoma de células escamosas. p53. Ki67

## ABSTRACT

The esophageal squamous cell carcinoma is the most common histological type in the world. It is origin in the squamous epithelium of the esophagus and is found more often in the middle third of the organ. The esophageal carcinogenesis is a process that results from the accumulation of mutations in different genes such as TP53. This is mutate in more than 50% of esophageal tumors. Numerous researches have been directed to restore the function of the p53 protein, which resulted in the discovery of PRIMA-1. In this study, we investigated the possible protective effects of PRIMA-1 in the epithelium of the esophagus under chemical carcinogenic effect preventing neoplastic development and inducing regression of carcinogenesis. To test this hypothesis, a study with use of PRIMA-1 in an experimental model of esophageal carcinogenesis induced by diethylnitrosamine with squamous cell carcinoma. The experimental study was performed with six groups of animals, where the groups I and II were considered controls being differentiated by the use of PRIMA-1. And the groups III and IV, and Va and Vb, were considered studies, which received diethylnitrosamine for 3 consecutive days weekly. While the groups III and IV, were differentiated by the use of PRIMA-1 prior to the beginning of carcinogenesis, the Va and Vb groups were differentiated by the use of PRIMA-1 at the end of carcinogenesis. The study presented date of euthanasia with crop esophageal parts, at 150 days, groups I, II, III and IV, and 180 days, Va and Vb groups because of the observation period after late use of PRIMA-1. Histopathological changes were detected in the control groups, Group I (DEN-/PRIMA-) and II (DEN-/PRIMA+). There were no statistically significant differences in pathological changes between the groups III (DEN+/PRIMA-) and IV (DEN+/PRIMA- first). Differences were found in statistically significant histopathological changes between Va groups (DEN+/PRIMA-) and Vb (DEN+/PRIMA+ late). Immunohistochemical analysis of p53 showed a statistically significant difference in the groups using PRIMA-1, compared to their controls. Immunohistochemical analysis of Ki-67 showed statistical difference only between the two control groups. It concludes that the PRIMA-1 was reduced by histopathological effect of gravity previously induced esophageal carcinogenesis in mice diethylnitrosamine and increased immunohistochemical expression of p53 protein.

**Descritores:** PRIMA -1. Esophageal. Diethylnitrosamine. Esophageal squamous cell carcinoma. p53. Ki67

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer da mucosa do esôfago, incluindo seus dois tipos histológicos mais comuns, o carcinoma de células escamosas (CCE) e o adenocarcinoma (ACE), é o oitavo tipo de câncer no mundo, com a estimativa de 482.000 novos casos em 2008 e 407.000 mortes no mesmo ano(1). Os países em desenvolvimento contribuem com 83% dos novos casos e com 86% das mortes(2). No Brasil, as neoplasias em geral são a segunda causa de morte, seguindo-se as doenças do aparelho circulatório(3). Dentre essas, o carcinoma de esôfago foi a oitava causa de óbitos por câncer em 2010, atrás das de pulmão, estômago, cólon e mama, próstata, SNC e fígado(3). A maior incidência está na região Sul, com 18,1 casos por 100 mil habitantes(4).

O CCE ainda é o tipo histológico de câncer de esôfago mais comum no mundo, mesmo após o aumento de 400% na prevalência do ACE nos EUA(5,6) e alguns países da Europa ocidental, onde até 80% dos casos são deste tipo histológico(7). O CCE tem sua origem no epitélio escamoso do esôfago. Apresenta-se mais frequentemente no terço médio do órgão e tem sua incidência estável ao longo dos anos, com uma distribuição mundial caracteristicamente heterogênea, com zonas de alta e baixa incidências em áreas geográficas muito próximas(1). O predomínio do CCE persiste devido a sua alta prevalência na Ásia Ocidental, como em algumas províncias da China, nordeste de Irã, o litoral do mar Cáspio, planícies do Turquistão, onde são diagnosticados 120 a 175 novos casos por 100.000 habitantes por ano(2). Zonas de prevalência intermediária compreendem a França(7), o sul e o oeste da África, e alguns áreas da América do Sul como o Uruguai, sudoeste da Argentina e o Rio Grande do Sul, onde o CCE ainda contabiliza mais de 80% dos novos casos(1,8).

A carcinogênese esofágica é um processo que se desenvolve em múltiplas etapas e que resulta do acúmulo de mutações envolvendo diferentes genes(9). O Gene TP53 codifica a proteína p53, que apresenta importante ação no ciclo celular(10). O Gene TP53 recebe sinalização da presença de mutações e providencia indiretamente reparo ou apoptose, tentando evitar o desenvolvimento de células tumorais(10). Este gene está mutado em mais de 50% dos tumores esofágicos, onde ou não produz a proteína que agiria sinalizando na parada do ciclo ou produz uma proteína truncada que não apresenta ação(9).

Inúmeras pesquisas têm sido direcionadas para restaurar a função da proteína p53(11). O rastreio em linhas de células que transportam mutações do gene TP53 conduziram à descoberta de potente molécula indutora de apoptose em massa denominada PRIMA-1(12). A PRIMA-1 é um composto químico que é capaz de induzir a apoptose em células cancerosas que albergam a p53 mutantes, por reativação da capacidade de ligar-se ao DNA, ativando assim, múltiplas vias de sinalização convergindo para apoptose(13).

Em estudo recente, Piantino(14) avaliou o efeito da PRIMA-1 na indução da apoptose mediada por p53 após indução do dano ao DNA em linhagens de carcinoma de bexiga. PRIMA-1 foi avaliada em duas linhagens celulares de câncer de bexiga, o T24 que tem como característica a mutação do TP53 e o RT4 que possui TP53 intacto. Ela foi capaz de reativar a função da p53 na linhagem de câncer de bexiga com TP53 mutado, promovendo a apoptose através da expressão de Bax e Puma, ativação da cascata das caspases e ruptura da membrana mitocondrial, independente de Bax, na linhagem celular T24 (p53 mt).

Neste estudo, serão pesquisados possíveis efeitos protetores da PRIMA-1 no epitélio do esôfago sob efeito carcinogênico químico evitando o desenvolvimento neoplásico e induzindo involução da carcinogênese. Para testar esta hipótese, realizamos estudo, com utilização da PRIMA-1, em um modelo experimental de carcinogênese esofágica por Dietilnitrosamina com indução de carcinoma de células escamosas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Carcinogênese Esofágica

Em todo o mundo, o carcinoma de células escamosas do esôfago é mais comum do que o adenocarcinoma(15). Tabagismo e consumo de álcool são considerados os principais fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de células escamosas, incluindo-se ainda deficiências vitamínicas e exposições alimentares a nitrosaminas e derivados(16). As vias moleculares que levam das exposições ambientais ao carcinoma são continuamente estudadas(15).

Várias mutações genéticas diferentes foram identificadas em câncer de célula escamosa do esôfago, e são comuns entre eles, e muitas estão associadas com a regulação do ciclo celular, apoptose, mecanismos de reparo do DNA, fatores de crescimento e seus receptores(17). Entendimento básico dessas mutações, é importante para que o conhecimento continue a evoluir, e terapias direcionadas se tornem disponíveis. Vários genes mutados ou desregulados conhecidos em câncer de células escamosas esofágico estão listados na Tabela 1(18). Isto pode ser um ponto de partida para o desenvolvimento de agentes direcionados.

<b>Mutação Genética</b>	<b>Função</b>
p53	Supressão Tumoral
p21	Parada ciclo celular por dano DNA
p16	Bloqueio Progressão fase do ciclo G1-S
Cyclin D	Promove progressão fase do ciclo G1-S
EGFR	Regula proliferação e apoptose
COX-2	Regula proliferação e apoptose

Tabela 1 - Mutações Genéticas em Carcinoma Células Escamosas(18).

A carcinogênese esofágica, do esôfago normal ao carcinoma, a partir das exposições aos fatores de risco, inicia por mutações genéticas como no gene TP53, com detecção a partir de epitélio

com esofagite(17,19). Acentua o número de células mutadas nas neoplasias intraepiteliais de baixo e alto grau(17,19). Alcança detecção de no mínimo 60% de mutação das células no carcinoma de células escamosas(17,19, 20). (Figura 1)

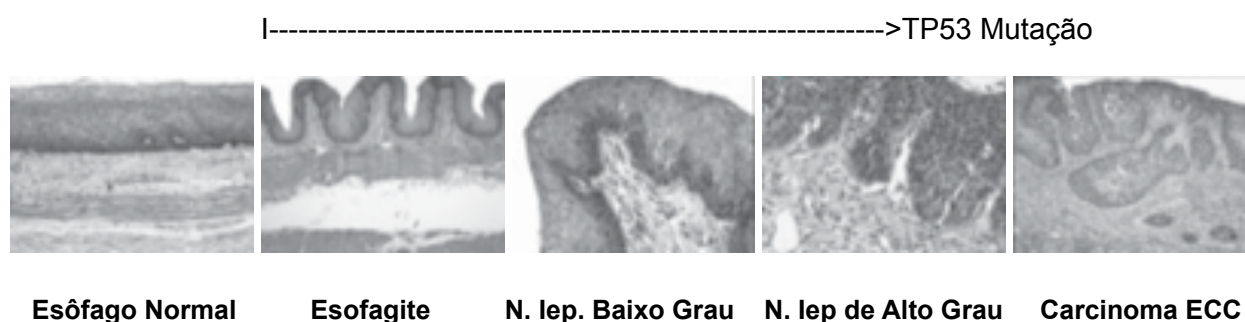


Figura 1. Mutação gene TP53 detectada a partir de esofagite na carcinogênese esofágica(21).

A associação entre o câncer de esôfago e dieta tem sido suspeitada desde 1961, quando Wynder e Bross observaram que uma dieta rica em leite e vitaminas reduziu o risco de câncer(22).

Citando os nitritos e nitrosaminas, como fatores de carcinogênese, estes são encontrados em quase todos as fontes alimentares e do hábito que tem os seres humanos, a partir de alimentos em conserva e preservados para cerveja e uísque, ao fumo do tabaco, e até mesmo simples vegetais e água(23). Além disso, esses compostos podem ainda ser formados por processos naturais corporais, como a redução salivar oral de nitrato. Ainda, as nitrosaminas podem ser formadas a partir de substâncias comuns, como as aminas secundárias, terciárias e quaternárias, mediante combinação destas com nitritos, reação chamada de nitrosação. Essa reação ocorre sob variadas condições de pH e temperatura, de modo que as nitrosaminas podem formar-se no solo, durante o armazenamento ou o preparo de alimentos ou, endogenamente, por ação de bactérias ou de macrófagos ativados que catalisam a união de aminas e nitritos ou reduzem nitratos a nitritos(24) .O Instituto Americano para Pesquisa do Câncer, concluiu que tanto a exposição exógena e endógena a estas substâncias podem aumentar o risco de câncer(25).



## 2.2 Carcinogênese Experimental

As pesquisas médicas utilizam-se de instrumentos para simular os achados das patologias humanas em animais de experimentação, com o objetivo de mensuração do comportamento tumoral, respostas a intervenção medicamentosa, resultado de técnicas cirúrgicas e avaliação molecular.

O carcinoma escamocelular de esôfago em humanos apresenta diversos fatores de risco/exposição para o seu desenvolvimento; citando-se a exposição a nitrosaminas(16).

Praticamente todos os órgãos são passíveis de indução de tumores pelas nitrosaminas, sendo os tecidos que destacam-se o esôfago, estômago e o hepático. A maioria dos estudos de carcinogênese química do aparelho digestivo foram realizados a partir da década de 70 e os animais de experimentação mais utilizados são o rato e camundongo. Embora diferentes fatores etiológicos, já mencionados, possam estar associados com o carcinoma de células escamosas, somente as nitrosaminas são capazes de induzir tumores no esôfago de animais e, experimentação(21).

O primeiro grande trabalho de indução experimental de câncer de esôfago foi conduzido por Druckey em 1961(26). Seguindo-se o primeiro estudo de carcinogênese em camundongos por Clapp e Craig em 1967(27).

Sabe-se que a ação da dietilnitrosamina está relacionada à presença tecidual do citocromo P450. Este é presente no fígado (na mitocôndria e sistema reticuloendotelial) e no esôfago (na células da mucosa no sistema reticuloendotelial), causando, inicialmente nestes, a maioria dos tumores.(28)

Existem diferentes posições no DNA capazes de sofrer ataques pelos produtos do metabolismo das nitrosaminas, mas a principal base pré-mutagênica formada é a O<sup>6</sup>-alquilguanina que, durante a divisão celular, leva à incorporação errônea de timina, ao invés de citosina, gerando assim uma mutação transicional de G-C: A-T. Quando esta mutação ocorre em certos códons de determinados genes responsáveis pelo crescimento celular (proto-oncogenes), como no caso do ras ou de genes responsáveis pelo controle do crescimento celular (genes supressores de tumor), como no caso do TP53, estes genes podem perder suas respectivas funções, gerando assim uma perda do controle da proliferação celular(26). Portanto, a susceptibilidade do esôfago de roedores a nitrosaminas deve-

se principalmente ao fato da conversão das nitrosaminas em carcinógenos finais ocorrer preferencialmente neste tecido(38).

A dose e o tempo de substância utilizada também influenciam na incidência e precocidade de órgão acometido. Sabe-se que a afinidade de uma enzima por seu substrato é determinado por seu  $K_m$ , qual determina a velocidade da reação química. No esôfago, o conjunto de enzimas P450 tem um baixo valor de  $K_m$  em relação ao tecido hepático. Logo, doses baixas de maneira prolongada de dietilnitrosamina, induzem uma preferência tumoral esofágica, e o contrário é verdadeiro para o fígado(28).

O modelo experimental de Rubio(29), com baixas doses de dietilnitrosamina por alguns dias consecutivos semanais e período prolongado, reproduzido por Gurski(30), Sallet(31), Velho(32), Castro Jr(19,33), é o que tem os melhores resultados quanto número de tumores, baixa mortalidade das espécimes e baixa hepatotoxicidade.

No presente estudo, adotou-se a dietilnitrosamina. Trata-se de uma substância química do grupo das nitrosaminas, de peso molecular 102,1g/mol, constituída de um radical nitroso ligado a quatro átomos de carbono e dez de hidrogênio –  $C_4H_{10}N_2O$ . A dietilnitrosamina é um carcinógeno completo, produzindo indução e promoção tumoral em vários espécimes animais, com preferência pelo sistema respiratório, sistema digestivo alto, fígado e rins. Administrada na água de beber, na concentração de 0,04mg/1000ml, durante três dias, tornou-se a dose preconizada em vários modelos experimentais. Tem ela a finalidade de diminuir a mortalidade pela ação hepatotóxica da DEN(29).

### **2.3 Câncer: Descontrole do Ciclo Celular**

A célula com mutação genética, propensa a desenvolver câncer, adquire a capacidade de proliferar sem estimulação exógena, a resistir aos sinais inibidores do crescimento, e evitar o disparo do mecanismo de morte celular programada (apoptose) que normalmente destrói células que adquirem grande dano genético. Muitas das alterações genéticas que dotam as células cancerosas de vantagens de crescimento, afetam diretamente os componentes dos pontos de checagem do ciclo celular, que é o mecanismo molecular essencial no núcleo da célula que controla se uma célula vai proliferar, diferenciar, manter repouso ou morrer(10).

O ciclo celular compreende eventos intracelulares que ocorrem durante o período compreendido entre duas divisões mitóticas. O ciclo é dividido em quatro fases chamado G1 (Gap 1), S (síntese de DNA), G2 (Gap 2) e M (mitose). O RNA e as proteínas necessárias para a replicação do DNA são sintetizados durante a fase G1. Há um ponto crítico, no final da fase G1, onde se decide por continuar e completar o ciclo celular ou sair do ciclo. Este é chamado de ponto de restrição (ponto-R). Replicação do DNA ocorre na fase S, durante o qual duplas de conteúdo de DNA da célula, a partir do valor diplóide de  $2n$ , geram produtos tetraplóides ( $4n$ ). Durante a fase G2, a célula se prepara para a divisão mitótica próxima. Finalmente, na fase M, a célula divide-se em duas células filhas, cada uma contendo um diplóide ( $2n$ ) de DNA. Após a mitose, as células podem entrar em um estado de repouso denominado  $G_0$ . Sob certas condições, tais células podem ser estimuladas para sair da fase  $G_0$  e re-entrar no ciclo celular(34). (Figura 2)

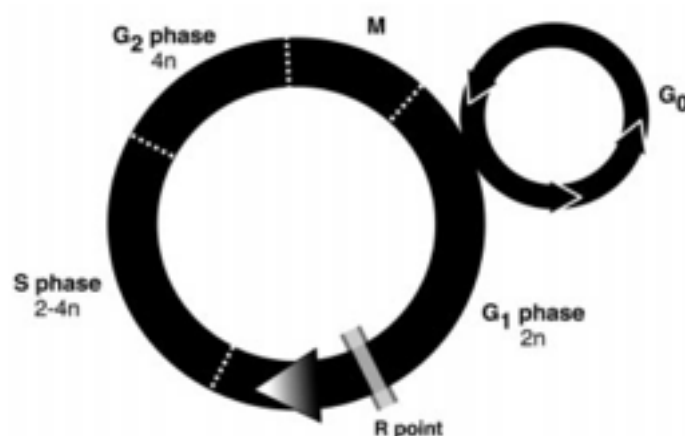


Figura 2. Representação esquemática do ciclo celular(35).

As fases do ciclo são impulsionadas a partir da formação de complexos de ligação entre ciclinas e CDK ("cyclin-dependent Kinases). A ciclina é a unidade reguladora e o seu parceiro, o CDK, tem ação catalítica. Estes complexos fosforilizam substratos proteicos específicos para mover a célula ao longo do ciclo e asseguram as transições bem delineadas entre as fases do ciclo celular(35).

O ponto R, de restrição, é o mais importante “checkpoint” do ciclo celular. Existem vários durante o ciclo, com objetivo de avaliar a integridade do DNA, prevenindo a progressão e propagação de células mutadas/lesadas e neste a participação do gene TP53 é importante(36).

No início do ciclo, existe aumento da expressão de ciclinas D. Esta associa-se com CDK4 e CDK6. Os complexos ativados então fosforilizam a proteína retinoblastoma (RB) que possui um papel crítico na regulação da progressão G1 através do ponto de restrição. Ao repouso, a proteína RB está ligada proteína E2F e hipofosforilada, com ação negativa sobre o ciclo. A partir da ação positiva do complexo ciclina D e CDK 4/6, a RB dissocia-se da E2F e fosforila-se liberando o ponto de restrição e mantém-se neste estado durante todo o ciclo. Ainda, a proteína E2F terá ação na transcrição gênica com interação da ciclina E(34).

Na presença de dano genômico celular, a p53 induz indiretamente a parada do ciclo para propiciar tempo para o reparo do DNA, efeito realizado pela inibição da fosforilação RB. Esta ação é realizada através do inibidor de CDK, a p21. A p53 promove a expressão do gene WAF1/Cip1, cujo produto protéico - p21 inibe atividade das CDKs 4,6 e 2. Quando o dano celular excede a capacidade da célula reparar-se, o gene TP53 induz a apoptose por expressão da proteína Bax(34).

Ainda existe o efeito do gene INK4 (inibidores de ciclina 4 dependente de quinase). Este codifica dois transcritos diferentes, o p19ARF e o p16INK4a. O inibidor de ciclina p16INK4a especificamente inibe CDK4/6; o p19ARF liga-se a MDM2, inibindo-a. A proteína MDM2 funciona como regulador do próprio TP53(37).

Como resultado da ação desses CKIs (p21 e as proteínas INK4), a fosforilação de RB é inibida e a célula permanece na fase G1(37,38). (Figura 3)

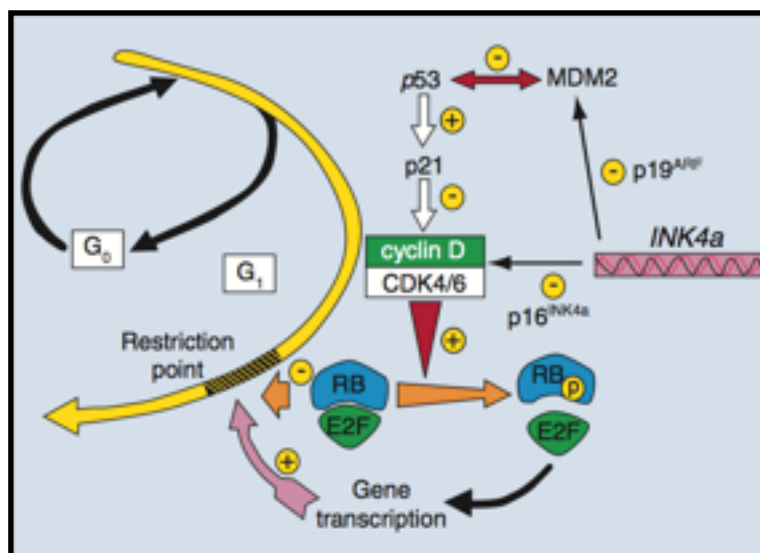


Figura 3. Representação esquemática do ciclo celular(38).

Ainda, de importância no ciclo, o Ki-67(MKI67) é uma proteína presente no núcleo, cuja função está relacionada com a proliferação celular. Esta proteína somente é expressa no ciclo de divisão celular: na interfase (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>); prófase; metáfase; anáfase e telófase, e está ausente na fase G<sub>0</sub>, quando a célula está quiescente; portanto, é um excelente marcador de divisão celular. Para evidenciar a expressão desta proteína nuclear é utilizado o anticorpo monoclonal Ki-67. Este anticorpo se liga ao seu antígeno-específico (MKI67) presente nos núcleos das células em proliferação, corando-os e evidenciando todas as células que entraram no ciclo de divisão.(39) Através da microscopia óptica é possível contar o número de células por campo ou áreas hot spots, que estão coradas, e calcular o Índice de proliferação (Ki-67 INDEX). A análise deste índice é o que nos permite caracterizar o grau de proliferação celular tumoral (taxa de crescimento) e, conseqüentemente, o seu grau de agressividade, maior risco de novos clones tumorais, mutações, o que dificulta a restrição do tumor pelo sistema imunológico(40,41).

A natureza complexa dessas sinalizações também comprometem a abordagem do uso de terapias específicas. A teoria “oncogene addiction” sugere que um tumor tem dependência na perturbação particular de um único gene da célula mutada. A realidade é que as células cancerosas são instáveis e têm muitas mutações. Por isso, o câncer escapa de terapias alvo. Isto reflete em resultados desapontadores em estudos clínicos, onde normalmente existe mudança na história

natural da doença, mas a cura não ocorre. A insistência de estudos sobre certos genes podem mudar esta realidade(10).

## 2.4 TP53: Reativando a p53.

O TP53 localiza-se no braço curto do cromossomo 17, mais precisamente na região 17, p.13.1, codificando uma fosfoproteína nuclear de 53kD que contém 393 aminoácidos e que é o principal regulador negativo do ciclo celular, estando envolvido na divisão, diferenciação celular e apoptos(42).

O TP53 tem o principal papel nas neoplasias humanas e mutações em carcinoma de células escamosas do esôfago foram primeiramente descritas por Hollstein(43).(Figura 4)

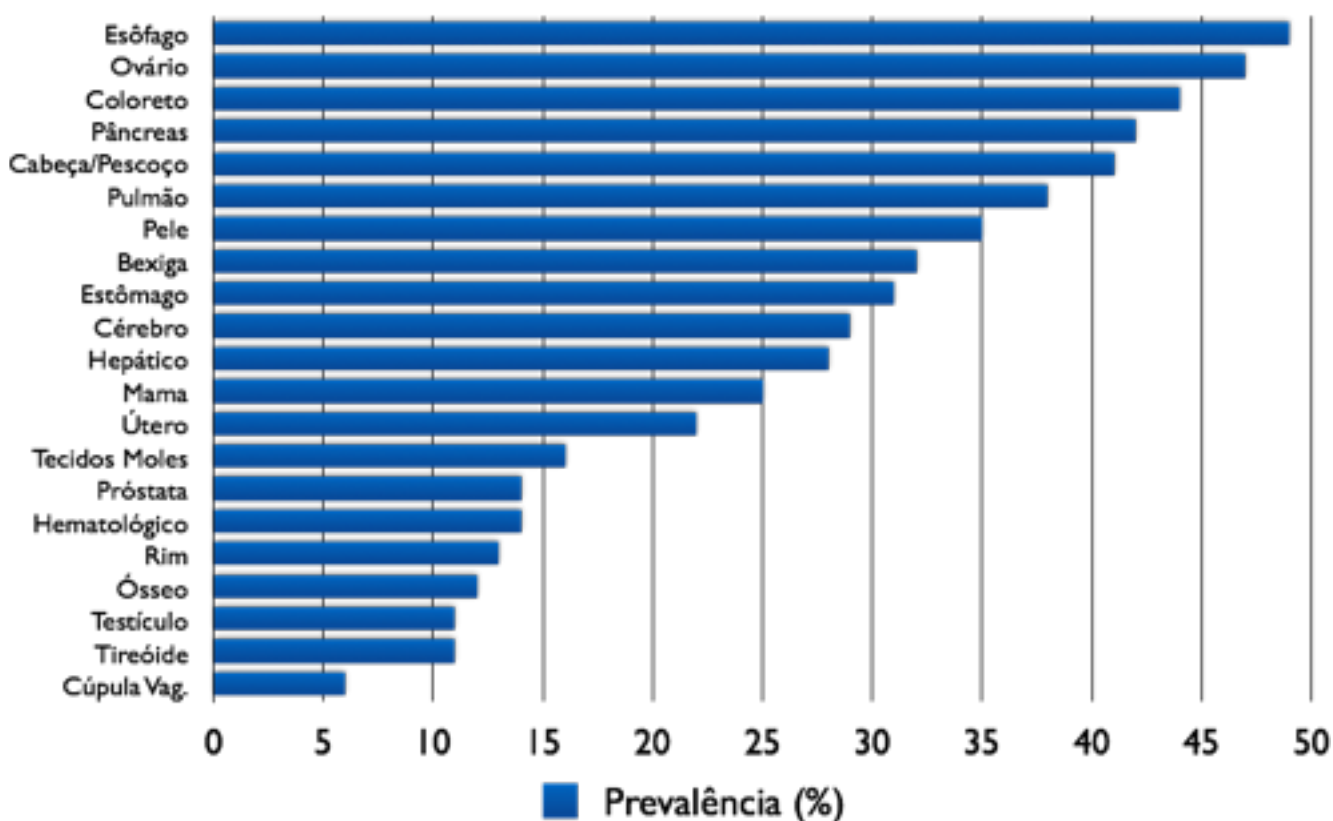


Figura 4. Percentual de mutações no Gene TP53 classificado por neoplasias(44).

Ao contrário dos outros genes supressores de tumor, que são inativos por perda hélica, o gene TP53 distingue-se pela alta frequência de mutações. A maioria destas mutações é do tipo missense (troca de nucleotídeo) e altera a ligação da proteína p53 ao DNA(45). Como resultado de mutações pontuais, a proteína tem sua meia vida aumentada e se acumula nas células tumorais. Também, embora em menor frequência, as mutações podem ser do tipo nonsense(46). Este tipo de mutação pode levar a um *stop códon* (parada da leitura do RNA mensageiro), alterando a proteína e, em última análise, a ocorrência de uma proteína truncada. Em síntese, a inativação da proteína p53 por mutação, perda, sequestração ou ligação a outras proteínas como proteínas virais, pode levar ao aumento da proliferação, à instabilidade genômica e à perda de importantes mecanismos de controle do ciclo celular(42).

A proteína p53 em condições fisiológicas é expressa em baixos níveis nas células, apresentando uma meia vida curta, de aproximadamente 20 min(12), sendo que mutações geralmente promovem a sua estabilização, permitindo a sua detecção por imuno-histoquímica, embora essa correlação não seja sempre verdadeira(47). Há evidências que a p53 selvagem ou *wild type* (wt) pode igualmente se acumular a níveis detectáveis, em parte devido a alterações na expressão de reguladores da p53, como, por exemplo, MDM2. Por outro lado, a ausência de acúmulo nuclear da p53 não descarta a possibilidade de mutação(20).

Logo, o gene TP53 produz uma proteína normal, que possui uma curta meia vida, o que dificulta a sua detecção. Enquanto, o gene TP53 mutado, produz proteína mutada, com maior estabilidade, maior meia-vida, acumulando-se no núcleo celular e passível de ser detectada pelos anticorpos monoclonais na análise imuno-histoquímica(48,49).

A inativação do TP53, seja por qualquer mecanismo de mutação, produzindo ou não proteína mutada/truncada, produz correspondência clínica. Utilizando-se a base de dados da IARC TP53, demonstrou-se diferença estatística na idade média de aparecimento de tumores em portadores de mutações missense e sem nenhuma atividade proteica comparada com funcionais normais e parciais(50). (Tabela 2).

<b>Local/Tipo de Câncer</b>	<b>Não Funcional (anos)</b>	<b>Funcional Total ou parcial(anos)</b>
Câncer de mama	33,3	42,7
Sarcoma tecidos moles	17,3	20,6
Câncer de cérebro	23,6	26,2
Sarcoma ósseo	16,9	17,7
Câncer de pulmão	46,1	48,8
Câncer de cólon/reto	36,3	52

Tabela 2. Idade média de aparecimento de câncer relacionado ao efeito da mutação sobre o gene TP53(50).

As mutações podem também servir como biomarcadores para terapias-alvo. Várias estratégias têm sido desenvolvidas para reativar as funções normais do gene TP53 em tumores p53 mutantes. Sendo, sempre o principal objetivo, ou a parada do ciclo e conseqüente regeneração ou indução a apoptose, protegendo o organismo(51).

Evidências que a p53 seria um alvo farmacológico promissor surgiram quando foi descrito que peptídeos derivados da região c-terminal da p53 foram capazes de restaurar a função do TP53 mutante com conseqüente indução de apoptose(52). Substâncias como Elipticina, CP-31398, WR1065, PRIMA-1 e MIRA-1 demonstram capacidade para reativar a p53 mutante e induzir a morte de células, preferencialmente em células portadoras de câncer TP53 mutantes. Nutlins, RITA e HLI98 inibem a degradação da p53 mediada por MDM2, resultando na ativação de p53 mutado e uma resposta biológica (regeneração ou apoptose) dependente de p53(53). (Figura 5)



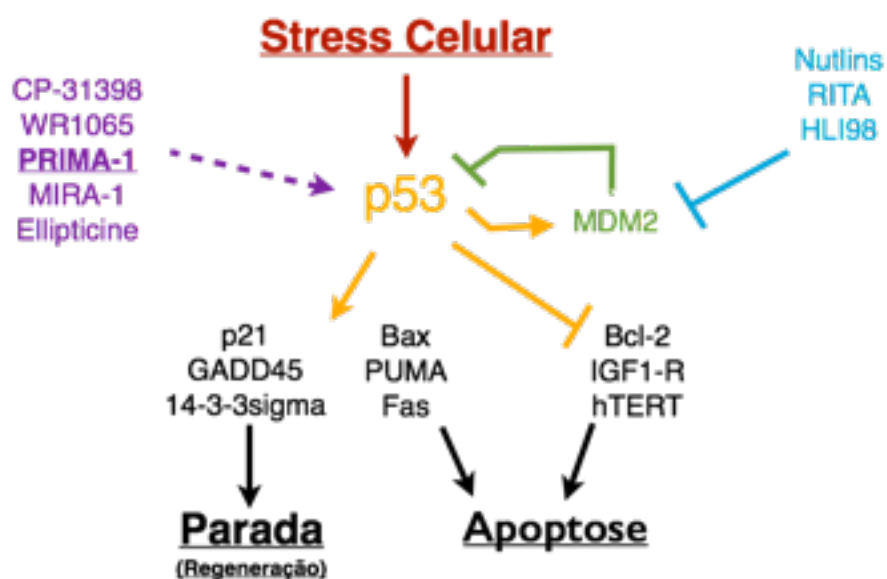


Figura 5 . Vias supressoras tumorais que são terapias-alvo com objetivo principal de induzir apoptose(53).

## 2.5 PRIMA-1

Em 2002, Bykov e cols. publicaram a identificação de um composto que suprimiu o crescimento de células de uma forma mutante p53-dependente. Este composto, 2,2-bis(hidroximetil)-1-azabicyclo[2,2,2]octan-3-one, foi designado PRIMA-1 (*p53 reactivation and induction of massive apoptosis*)(12).(Figura 6) Essa pequena molécula de peso molecular de 185 Da, restaura seqüências específicas de ligação da p53 com o DNA, recuperando a conformação funcional da p53 gerada pelo gene mutado, restaurando sua atividade transcricional(12,54).

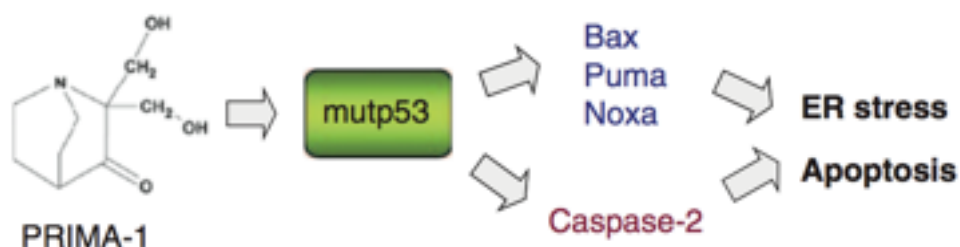


Figura 6. PRIMA-1 induz a apoptose por ativação do gene p53 mutado via mitocondrial. Reativação causa hipersensibilização apoptótica através de Bax, PUMA, Noxa e Caspase 2(55).

Publicação, do mesmo autor, demonstrou o desempenho da PRIMA-1 na linhagem de células tumorais usando o banco de dados do *Developmental Therapeutics Program of the National Cancer Institute (NCI)*. As linhagens celulares foram de neoplasias de cólon, ovário, renal, pulmão (não pequena células) e melanoma. Seu desempenho foi comparado com drogas quimioterápicas: adriamicina, metotrexate, cisplatina, 5-fluoracil e paclitaxel. Baseado nos resultados, os autores concluíram, que a atividade inibitória ao crescimento celular nestas células tumorais selecionadas, teve preferencialmente melhores resultados quando usada PRIMA-1. Sugerindo que novas drogas deveriam ser desenvolvidas a partir desta substância(47).

A PRIMA-1 não possui efeito sobre as células que produzem a p53 selvagem(51). A célula, por possuir produto proteico, a p53, com duração máxima intracelular de seis a vinte minutos e alto índice de degradação a partir da ação do MDM2, não é afetada. Ao contrário, o stress constituído da sinalização celular tumoral, por exemplo pela ativação de oncogenes, lesão do DNA, hipóxia pela má circulação intratumoral e acúmulo de proteína p53 pelo gene mutante TP53, é o alvo definitivo(56,57). (Figura 7)

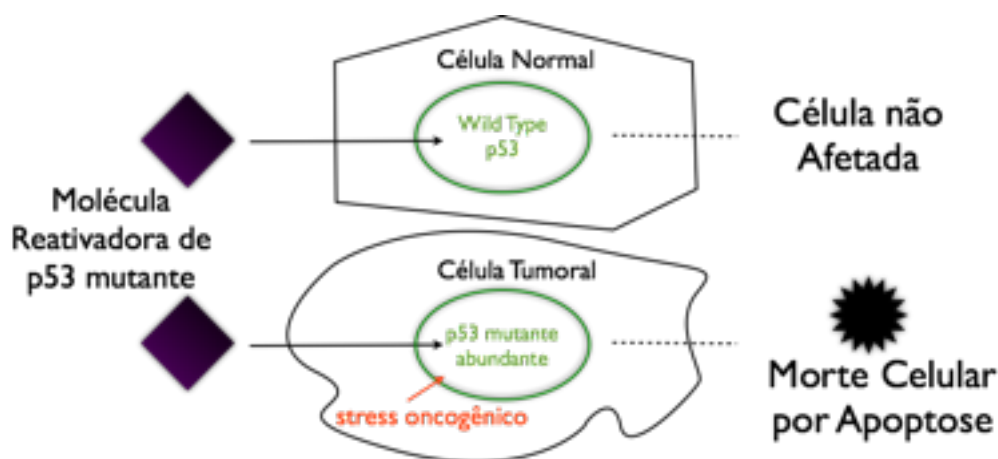


Figura 7. Indução seletiva da apoptose baseados nas características celulares. (56)

No aspecto dos estudos experimentais em camundongos, existem publicações com administração de PRIMA-1, pela via endovenosa, para avaliação de resposta em hepatocarcinoma e via intraperitoneal ,para osteosarcoma, os quais demonstraram inibição do crescimento tumoral, principalmente quando associado a quimioterápicos(58,59).

Zache e cols comparou o efeito da PRIMA-1 quando administrada intraperitoneal e endovenoso em um grupo de animais de experimentação inoculados com células tumorais de sarcomas e neoplasia de mama. Avaliou-se a resposta clínica de ascite e células tumorais viáveis. Houve diminuição da ascite e de células neoplásicas vinte vezes maior na forma de administração endovenosa e nove vezes maior na intraperitoneal, quando comparado com solução controle com relevância estatística. Demonstrando que ambas formas de administração, são eficientes(60).

O mecanismo de ação da PRIMA-1 até o momento aceito, foi publicado por Lambert em 2009(61). Aparentemente, PRIMA-1 liga-se a proteína p53 e modifica sua estrutura. Com isso, restaura a área de ligação entre a p53 e os genes por ela regulados que foi alterada pela mutação, permitindo a natural ativação da transcrição de genes como WAF1, Bclx, p21 e Puma que atuam na inibição do ciclo celular e na indução da apoptose(58,62). Para isso a PRIMA-1-1 é convertida em compostos que reagem com a proteína acumulada no núcleo. Esta interage no core do DNA a partir de cisteínas residuais ainda não totalmente elucidadas(61).

É preciso ressaltar que não há estudos na literatura da ação da PRIMA-1 em carcinogênese esofágica e neoplasia de esôfago. A substância PRIMA-1 só está autorizada, até o momento, em pesquisas experimentais sendo restrita a utilização em protocolos clínicos(63).

### **3 JUSTIFICATIVA**

O restabelecimento da apoptose a partir das funções do Gene T53, mutado no câncer de esôfago, perante a administração de substâncias como a PRIMA-1, apresentam amplo interesse clínico na busca do bloqueio ou suspensão do processo mutagênico e involução tumoral.

#### **4 QUESTÃO DE PESQUISA**

A PRIMA-1 tem a capacidade de prevenir e parar o processo carcinogênico esofágico induzido por dietilnitrosamina?

## **5 HIPÓTESE**

A intervenção com PRIMA-1 teria efeito de proteção no processo carcinogênico induzido por dietilnitrosamina e induziria a involução carcinogênica esofágica.

## **6 OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo Geral**

- Estudar o efeito da PRIMA-1 na carcinogênese esofágica experimental induzida por dietilnitrosamina.

### **6.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar os achados da análise histopatológica em amostras esofágicas com indução a carcinogênese esofágica pela dietilnitrosamina com ou sem o uso precoce de PRIMA-1
- Avaliar expressão imuno-histoquímica do p53 e Ki67 em amostras esofágicas com indução a carcinogênese esofágica pela dietilnitrosamina com ou sem o uso precoce de PRIMA-1.
- Avaliar os achados da análise histopatológica em amostras esofágicas com indução a carcinogênese esofágica pela dietilnitrosamina com ou sem o uso tardio de PRIMA-1
- Avaliar expressão imuno-histoquímica do p53 e Ki67 em amostras esofágicas com indução a carcinogênese esofágica pela dietilnitrosamina com ou sem o uso tardio de PRIMA-1.

## 7 MATERIAL E MÉTODOS

### 7.1 Delineamento:

Experimental.

### 7.2 Animais e Ambiente

Utilizado camundongos (*Mus musculus domésticus*, BALB/c), num total de 46 fêmeas, com 60 dias de vida e peso médio inicial de 30 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

A amostra foi arbitrada baseada em estudos experimentais da mesma linha de pesquisa(29-32).

Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Morfologia Experimental, do Setor de Anatomia, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande, em condições estáveis de umidade, temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), fluxo contínuo de ar e ciclo de 12 horas de claro e escuro (luz: 7:00h - 19:00h). Todos os animais foram adaptados a estas condições, sete dias antes de entrarem em experimento nesta mesma unidade. Mantidos em caixas em polipropileno autoclavável com tampa em aço galvanizado com separadores em aço inox, até dez por caixa, e fundo forrado com maravalha esterilizada. Estas foram higienizadas três vezes por semana, obedecidos todos os princípios éticos no tratamento dos animais, evitando-se dor e desconforto durante os procedimentos e supridas as necessidades básicas de alimentação e conforto, em consonância com os preceitos da literatura(64).

Este estudo foi aprovado conforme parecer nº P018/2011, Processo 23116.003787/2011-21 da Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA), Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESP), FURG.



### 7.3 Experimento

As gaiolas foram numeradas de acordo com a divisão dos animais entre os grupos de maneira individual, cada uma mostrando etiquetas plastificadas, em que constava o grupo a que pertenciam os animais. Os animais permaneciam na mesma gaiola até que ocorresse o óbito ou a eutanásia.

A partir do primeiro dia de experimento, foi acrescentado o carcinógeno DEN (ANEXO A), na concentração 0,04mg/1000ml, na água dos animais do Grupo Estudo, e oferecida semanalmente, por três dias consecutivos (terças, quartas e quintas-feiras), para indução de tumores, conforme modelo experimental(29), mantendo-se alimentação padrão. A água para beber e para preparo das soluções foi da rede pública de abastecimento. Os animais tinham livre acesso à ração (ANEXO B) e água potável durante todo o estudo.

A substância PRIMA-1 (ANEXO C) foi administrada aos animais, na dose de 100 mg/kg/dia(12) por 10 dias, por via intraperitoneal.(60)(Figura 8).

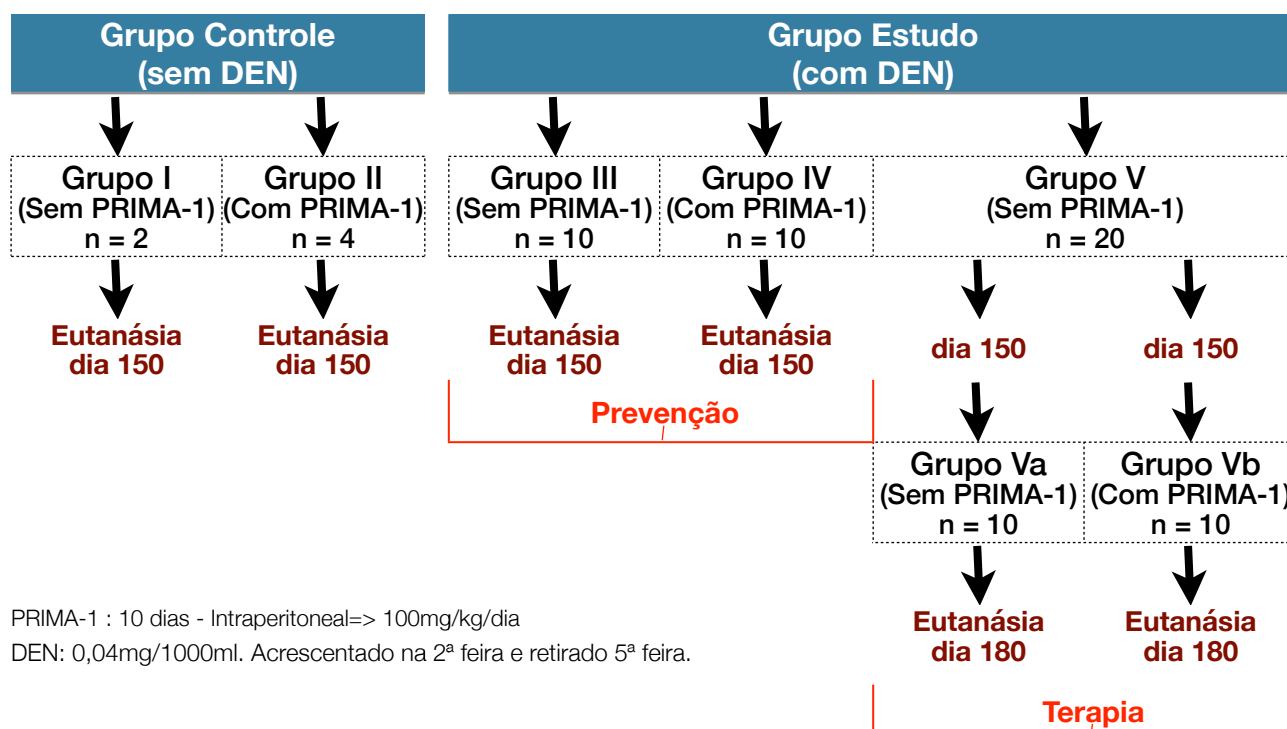


Figura 8. Fluxograma do experimento. Estudo experimental com dois grupos controles(sem DEN), grupo I(sem PRIMA-1) e grupo II(com PRIMA-1) e quatro estudos(com DEN), grupo III(sem PRIMA-1 inicial), grupo IV(com PRIMA-1 inicial), grupo Va(sem PRIMA-1 inicial após 150 dias) e grupo Vb(com PRIMA-1 inicial após 150 dias). (DEN: dietilnitrosamina; PRIMA-1: p53 reactivation and induction of massive apoptosis)

Constituição dos grupos:

- **Grupo I** recebeu água *ad libitum*, como única fonte hídrica, durante todo o experimento, renovada às terças e sextas-feiras. Sem exposição a DEN ou PRIMA-1. Eutanásia dia 150.
- **Grupo II** recebeu água *ad libitum*, como única fonte hídrica, durante todo o experimento, renovada às terças e sextas-feiras. Sem exposição a DEN e com administração de PRIMA-1, 100mg/kg/dia, intraperitoneal, pelos 10 dias iniciais de experimento. Eutanásia dia 150.
- **Grupo III** recebeu água *ad libitum*, como fonte hídrica, de sextas a terças-feiras; nas terças-feiras, a água foi substituída por uma solução de DEN, por 72 horas (terças, quartas e quintas-feiras). Sem Administração de PRIMA-1. Eutanásia dia 150.
- **Grupo IV** recebeu água *ad libitum*, como fonte hídrica, de sextas a terças-feiras; nas terças-feiras, a água foi substituída por uma solução de DEN, por 72 horas (terças, quartas e quintas-feiras). Administração de PRIMA-1, 100mg/kg/dia, intraperitoneal, pelos 10 dias iniciais de experimento. Eutanásia dia 150.
- **Grupo V** recebeu água *ad libitum*, como fonte hídrica, de sextas a terças-feiras; nas terças-feiras, a água foi substituída por uma solução de DEN, por 72 horas (terças, quartas e quintas-feiras). No dia 150 de experimento, suspendeu-se a administração semanal de DEN, e os animais foram divididos em **Grupo Va**: com acesso livre a água e ração; **Grupo Vb**: com acesso livre a água, ração e administração de PRIMA-1, 100mg/kg/dia, intraperitoneal, por 10 dias. Eutanásia dia 180.

#### 7.4 Eutanásia

No dia assinalado, cada animal do grupo foi submetido a eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>.(64)

#### 7.5 Necropsia

O animal foi posicionado em decúbito dorsal, sobre uma prancha, procedendo-se a fixação das patas. Abertura da pele foi feita por incisão mediana da região púbica a submentoniana.

A abertura do peritônio procedeu-se, sobre a linha média, iniciando ao nível do púbis até o apêndice xifóide, e após, lateralmente, margeando rebordos costais. A ressecção costal bilateral

iniciou nos gradeados costais inferiormente, ascendendo ao manúbrio, incluindo esterno, com conseqüente exposição da região toracoabdominal.

A dissecação esofágica foi realizada, sendo inicialmente aplicada, sobre o estômago, suave tração e identificação da extremidade inferior deste. Iniciada na região do cárdia, estendendo-se cranialmente pelo mediastino posterior. Realizando-se dissecação, ora romba, ora com secção de estruturas, incluindo ligamento pulmonar inferior, aorta, ázigos e, já na região cervical, onde traquéia e esôfago tornam-se uma estrutura única formando a hipofaringe, sendo o esôfago seccionado neste ponto. Este, em sua extremidade caudal, foi seccionado na porção diretamente inferior ao pré-estômago (Figura 9).

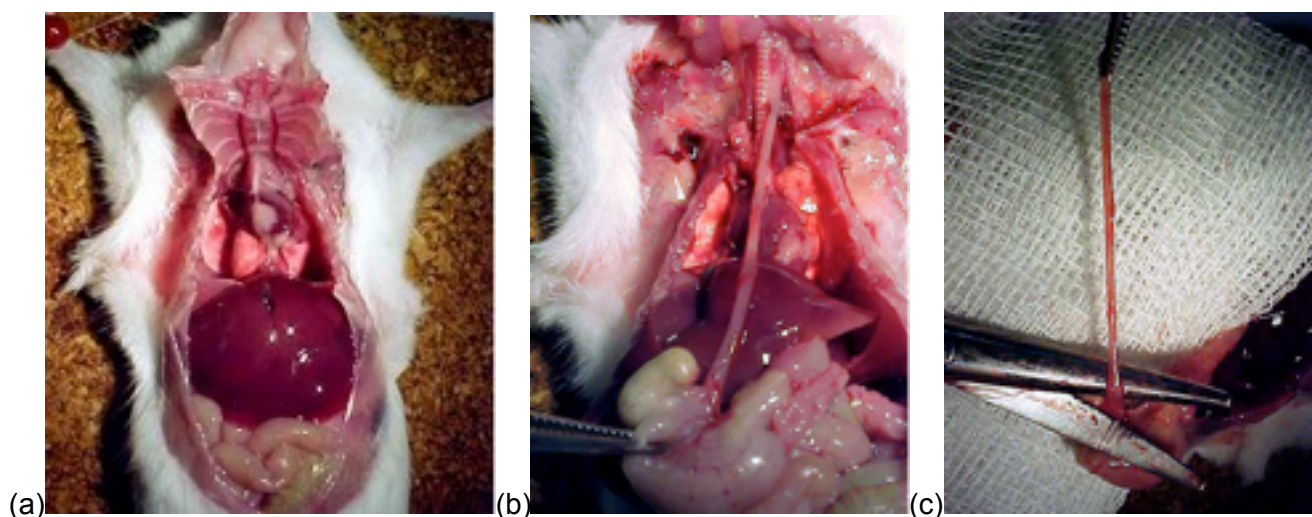


Figura 9. (a)Exposição toracoabdominal, seguindo-se (b)exposição esofágica com dissecação abdominal e torácica e, finalmente, (c)secção esofágica no hipofaringe e após secção na porção diretamente inferior ao pré-estômago.

As carcaças dos animais foram recolhidas e acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e acomodados em freezer, sendo o destino dos mesmos conforme as normas de rotina do Laboratório.

## 7.6 Preparo do Material

O esôfago foi, inicialmente, acomodado sobre uma superfície de vidro, sendo seccionado e aberto longitudinalmente, por sua luz, a partir da introdução de tesoura de ponta fina caudalmente, por toda sua extensão, deixando toda a mucosa à mostra. Enrolado sobre si mesmo, a partir da junção esofagogástrica e mantida nesta posição pela transfixação de alfinete. Acondicionado em potes plásticos, devidamente identificados pelo grupo, com formaldeído aquoso tamponado a 10%. As peças foram mantidas neste por três a seis dias.

Com objetivo de estudos histopatológico e imuno-histoquímico, as peças experimentais foram na seqüência, inicialmente desidratadas, passando por uma série gradativa de soluções alcoólicas, até 100%; diafanizadas em xilol e impregnadas por parafina Paraplast® (ANEXO D). A inclusão do esôfago em bloco de parafina foi feita mantendo-se o órgão enrolado sobre si mesmo, com a finalidade de gerar cortes histológicos, que atingissem todo o perfil longitudinal da víscera (Figura 10). Etapa realizada no laboratório do Centro Integrado de Patologia, na cidade de Rio Grande, Rio Grande do Sul, sob responsabilidade do Dr. Carlos Renan Varela Juliano. Esses foram codificadas por funcionário deste serviço, não havendo, inicialmente, conhecimento do autor ou dos patologistas.

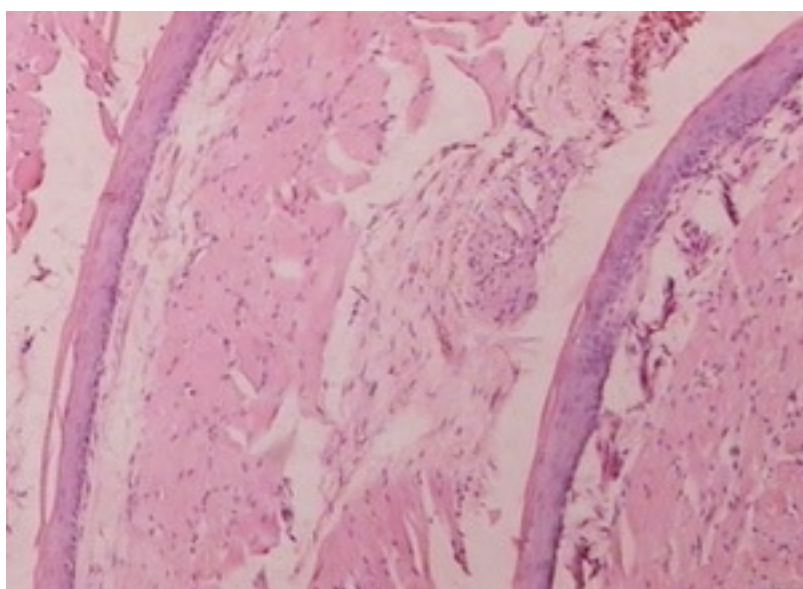


Figura 10. Fotomicrografia de esôfago normal com disposição de rolo sobre si mesmo. (HE 200x)

Com as peças emblocadas, foram realizados cortes de 5 µm em micrótomo modelo Spencer<sup>®</sup>, acondicionando-se 4 cortes por lâmina de vidro para estudo histopatológico; e a cada 10 lâminas, uma lâmina preparada com 4 cortes para estudo imuno-histoquímico. O objetivo deste protocolo de cortes, é alcançar pela histopatológica e em segundo momento, imuno-histoquímica, a análise máxima do segmento esofágico submetido a exposição carcinogênica e da PRIMA-1, com intervalos fixos, mas sem o risco de perda de achados que prejudiquem o estudo.

Para a análise histopatológica, as lâminas foram lavadas com xilol, para remoção da parafina e coradas com hematoxilina e eosina. Foram montadas com lamínulas, finalmente, com bálsamo sintético. O trabalho de corte dos blocos e coloração com hematoxieleosina, foi realizada no laboratório de Histologia do Instituto de Biologia, da FURG, sob responsabilidade do Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Junior.

As lâminas foram lidas por dois patologistas, dos Serviços de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande com experiência na avaliação de espécimes experimentais, com cegamento dos resultados e grupos.

Os cortes histológicos do esôfago foram analisados em microscópio ótico comum para identificação das alterações histopatológicas(21) e classificados:

- **Histologia Normal:** numa fileira de células basais, localizadas entre a borda do epitélio e a submucosa, com núcleos ovais ou arredondados. Apresenta um estrato córneo que ocupa um terço ou até a metade da espessura epitelial. Não se define a muscular da mucosa e são vistas algumas papilas rudimentares.
- **Esofagite:** o epitélio apresenta-se mais espesso, às custas de hiperplasia da camada basilar, hiperplasia papilar, hiperqueratose e infiltrado inflamatório composto por polimorfos nucleares e linfócitos.
- **Lesão Intraepitelial de Baixo Grau:** aumento das camadas celulares basais, atingindo um terço do epitélio, com células displásicas.
- **Lesão Intraepitelial de Alto Grau e Carcinoma *in situ*:** as alterações displásicas atingem toda a espessura do epitélio, que é composto de células marcadamente anormais. No entanto, pode ser observada alguma parakeratose na superfície epitelial.

- **Carcinoma Invasor:** as células malignas são encontradas abaixo da membrana basal, invadindo pelo menos a lâmina própria.

## 7.7 Avaliação Imuno-histoquímica

Para a análise imuno-histoquímica, as lâminas foram submetidas ao protocolo específico para marcador p53 e Ki67. O material foi preparado e interpretado na Unidade de Patologia Experimental do Centro de Experimentação Animal, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob responsabilidade da Profa. Dra. Luise Meurer. Foi utilizado um anticorpo primário monoclonal de camundongo da marca *DAKO Corporation* antiproteína p53 (Clone Pab240) (ANEXO E) e um anticorpo monoclonal primário de camundongo antiproteína Ki-67 (Clone MIB-5) (ANEXO F) da marca *DAKO Corporation*.

A técnica imuno-histoquímica constou da utilização dos cortes com espessura de 5  $\mu$ . Estes foram submetidos à rotina de imunohistoquímica, que consiste de desparafinização em estufa e rehidratação em álcool, recuperação antigênica em forno de microondas, inativação da peroxidase endógena através do peróxido de hidrogênio e bloqueio das reações inespecíficas. Os anticorpos primários foram incubados por 12 horas, a 4°C, nas diluições de 1:50 para Ki-67 e 1:50 para p53, seguidos da aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e revelação com diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako). As reações tiveram como controles positivos, carcinoma de cólon para p53 e linfonodo para Ki-67, sendo o controle negativo realizado sem a utilização do anticorpo primário.

Na análise imuno-histoquímica foi considerado como expressão proteica positiva, as lâminas que apresentaram mais de 10% de núcleos celulares intensamente corados, por campo microscópico de 400 aumento. A expressão proteica foi considerada negativa, quando ocorreu ausência de coloração imuno-histoquímica ou menos de 10% dos núcleos corados(20). As lâminas foram examinadas por patologista com experiência em imuno-histoquímica, que procedeu à contagem do total de células nas áreas de interesse, e à contagem das células positivas nesta área, estabelecendo sua proporção em termos de percentuais. Nos casos em que não havia lesão

delimitada e para as áreas sem lesão, efetuou-se a contagem de, pelo menos, 300 células, para estabelecer o percentual de positividade.

## **7.8 Análise Estatística**

Os dados coletados foram tabulados com auxílio do programa Numbers iworks 11.

As variáveis categóricas foram analisadas descritivamente utilizando as medidas descritivas: frequência absoluta (n) e relativa (%).

Os grupos de estudo foram comparados quanto à distribuição dos achados de patologia pelo teste exato de Fisher.

As expressões imuno-histoquímicas do p53 e do Ki67 foram agrupadas nas categorias negativo (expressões < 10%) e positivo ( $\geq$  10%). Para efeito de comparação entre os grupos, as categorias foram codificadas em 0 (negativo) e 1 (positivo) e esses escores foram analisados.

Os grupos de interesse foram comparados quanto à distribuição dos escores do p53 e do Ki67 pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Foi adotado o nível de significância de 0,05 ( $\alpha = 5\%$ ) em todos os testes estatísticos empregados e utilizado o programa estatístico SAS® versão 9.3 para todas as análises estatísticas.

## 8 RESULTADOS

Não foram observadas manifestações comportamentais de agressividade entre os camundongos, tampouco, não foi registrado nenhum óbito durante o experimento.

Não houveram prejuízos durante o estudo no que tange metodologia aplicada aos animais. Não foram evidenciadas complicações abdominais quanto aplicação intraperitoneal da PRIMA-1. Os animais apresentaram manifestações quanto ao diluente usado, no caso álcool etílico, conforme manual da PRIMA-1. Manifestações de aumento da frequência respiratória e cardíaca, e imobilidade com retorno em minutos ao padrão comportamental.

O índice kappa em relação aos resultados histopatológicos, dos dois patologistas, foi considerado excelente ( $\text{kappa}=0,92$ ; IC 95%: 0,90-0,94;  $p<000,1$ ).

Não foram detectadas alterações histopatológicas nos grupos controles, grupo I (DEN - e PRIMA -) e II (DEN - e PRIMA +), cujos esôfagos serviram como padrão de normalidade. Em especial atenção, ao grupo II, não foi observado nenhuma manifestação histopatológica inflamatória ou reacional na análise dos espécimes.

Achados histopatológicos dos grupos submetidos ao carcinógeno em 150 dias sem uso inicial de PRIMA-1 (grupo III) e com uso inicial de PRIMA-1 (grupo IV) são demonstradas na figura 11. Achados histopatológicos dos grupos submetidos a carcinogênese em 150 dias e observação de 30 dias sem uso de PRIMA-1 (grupo Va) e com uso de PRIMA-1 (grupo Vb) são demonstradas na figura 12. Enquanto não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos III e IV ( $p = 0,1312$ ), foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre grupo Va e Vb ( $p = 0,0387$ ).



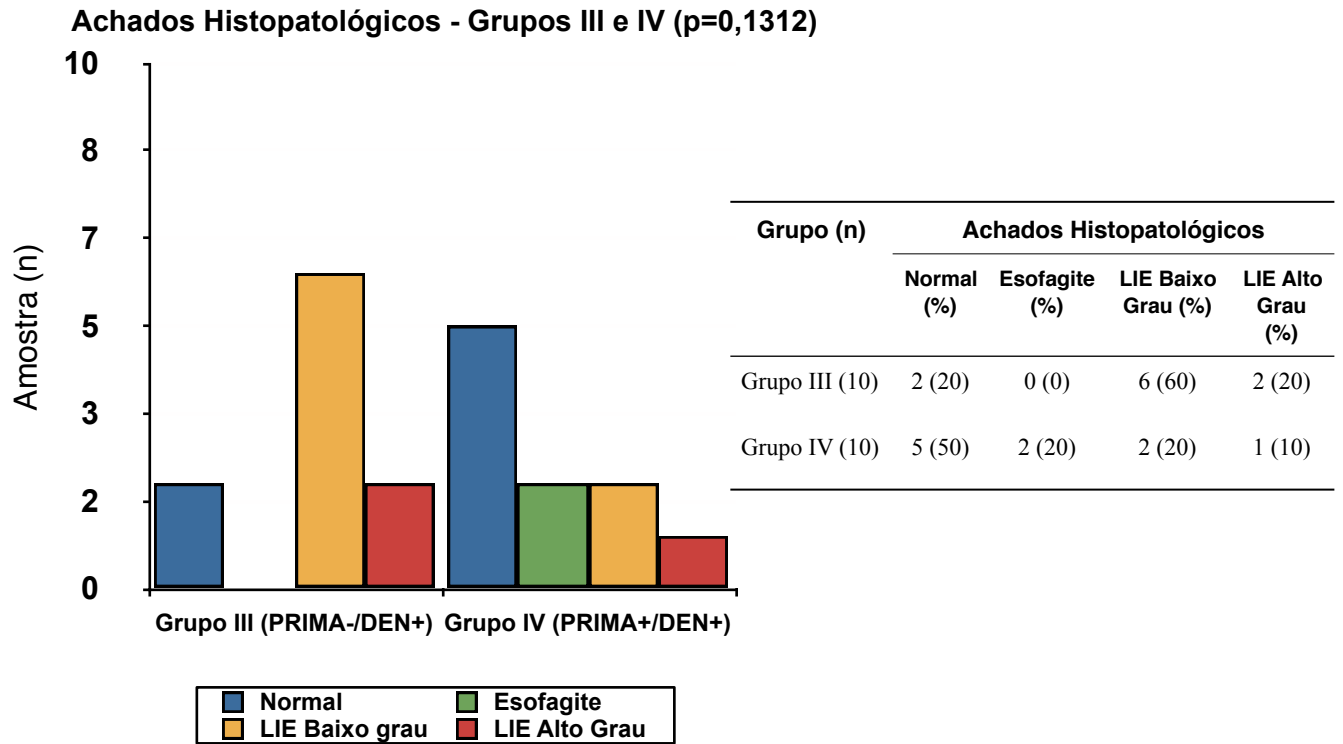


Figura 11. Gráfico de barras demonstrando achados histopatológicos dos grupos III e IV. (LIE baixo grau: lesão intraepitelial de baixo grau; LIE alto grau: lesão intraepitelial de alto grau)

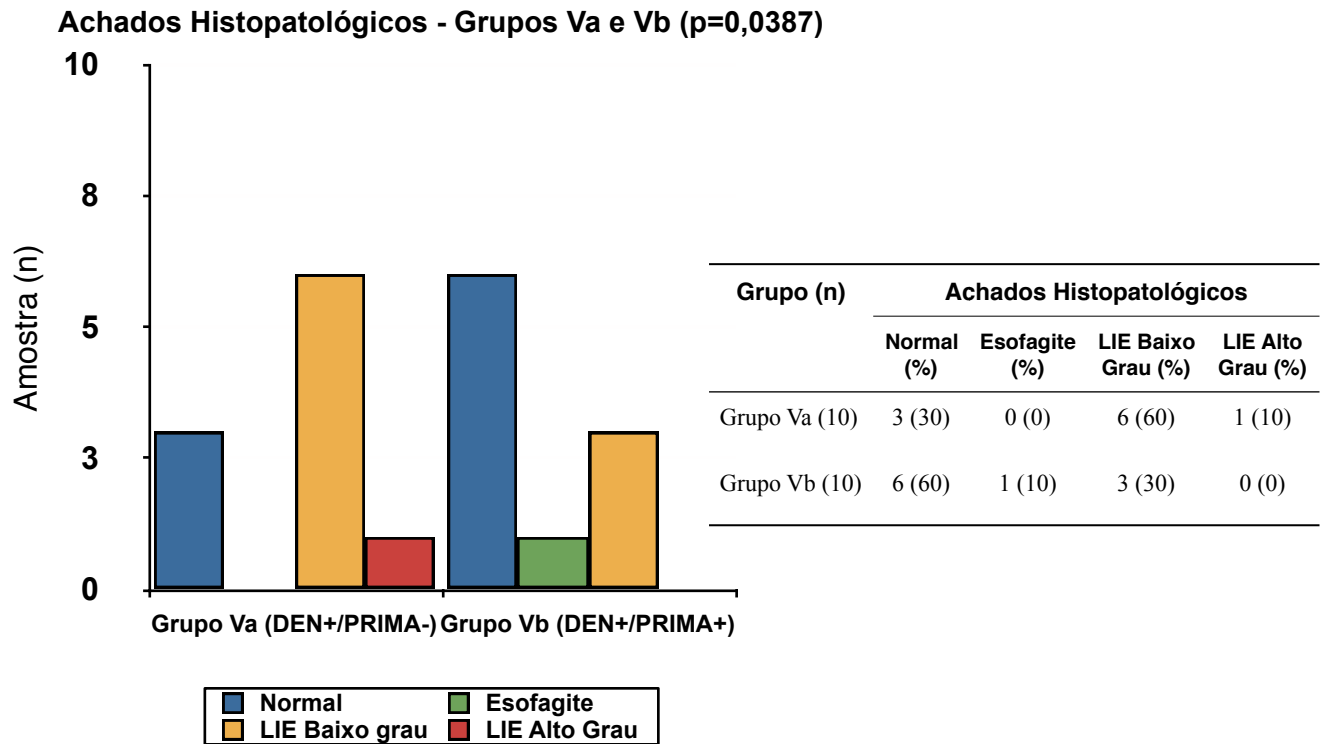


Figura 12. Gráfico de barras demonstrando achados histopatológicos dos grupos Va e Vb. (LIE baixo grau: lesão intraepitelial de baixo grau; LIE alto grau: lesão intraepitelial de alto grau)

O risco relativo de aparecimento de lesões intraepiteliais esofágica de baixo e alto grau, comparada a epitélio normal e esofagite com o uso de PRIMA-1 foi de 0,37 (redução de 63%) para comparação entre grupo III e IV e de 0,42 (redução de 58%) para comparação entre grupo Va e Vb.

A expressão imuno-histoquímica do p53 encontrada nos grupos I e II, grupos III e IV e grupos Va e Vb, são demonstradas, respectivamente, nas figuras 13, 14 e 15. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e II ( $p = 0,0001$ ), onde o grupo II apresentou maior quantidade de casos positivos de p53 do que o grupo I. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos III e IV ( $p = 0,0043$ ), onde o grupo IV apresentou maior quantidade de casos positivos de p53 do que o grupo III. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos Va e Vb ( $p = 0,0118$ ), onde o grupo Vb apresentou maior quantidade de casos positivos de p53 do que o grupo Va.

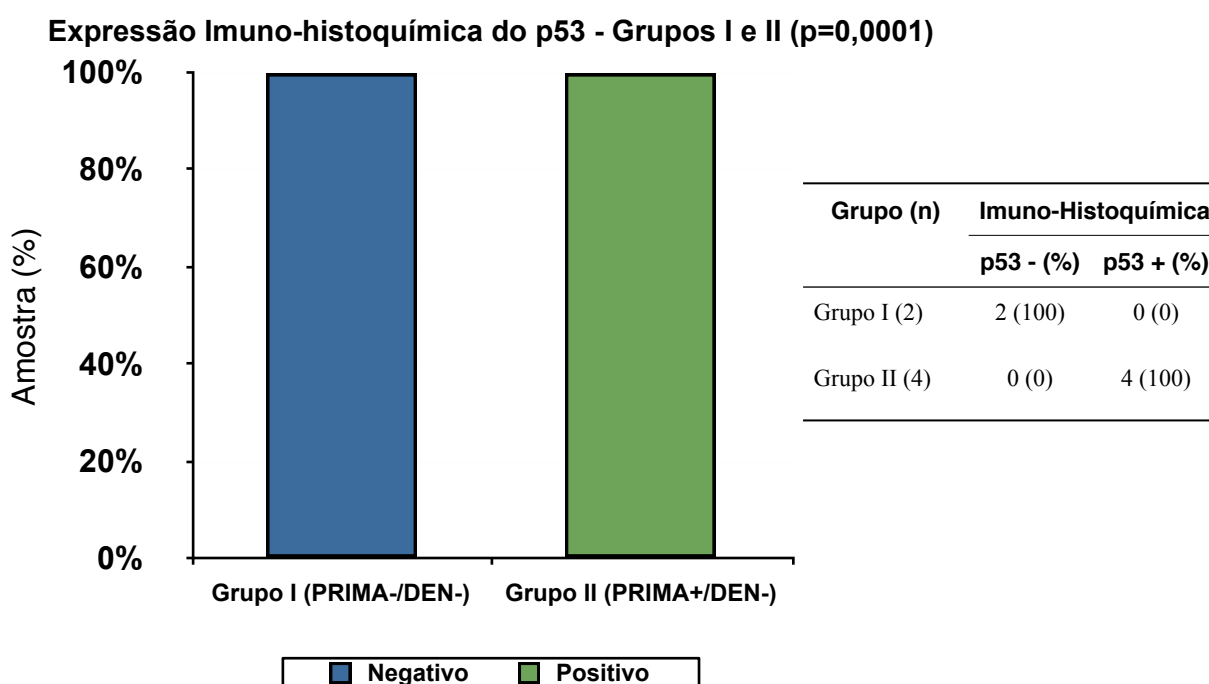


Figura 13. Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imuno-histoquímica do p53 dos grupos I e II.

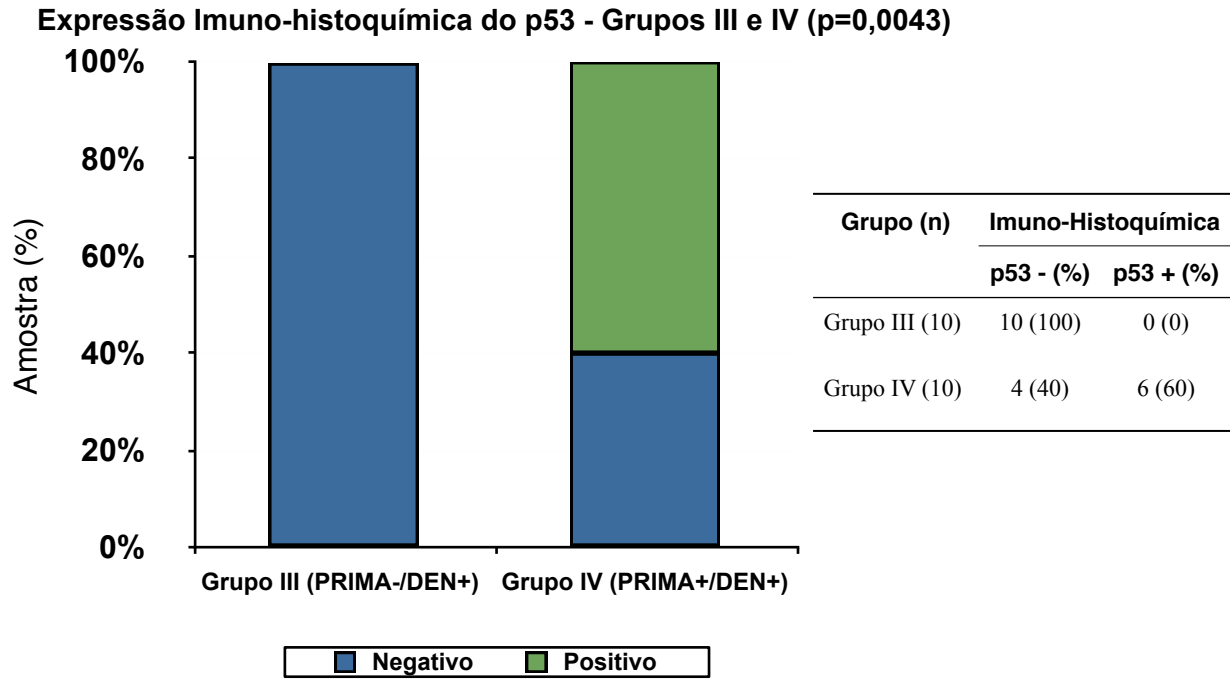


Figura 14. Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imuno-histoquímica do p53 dos grupos III e IV.

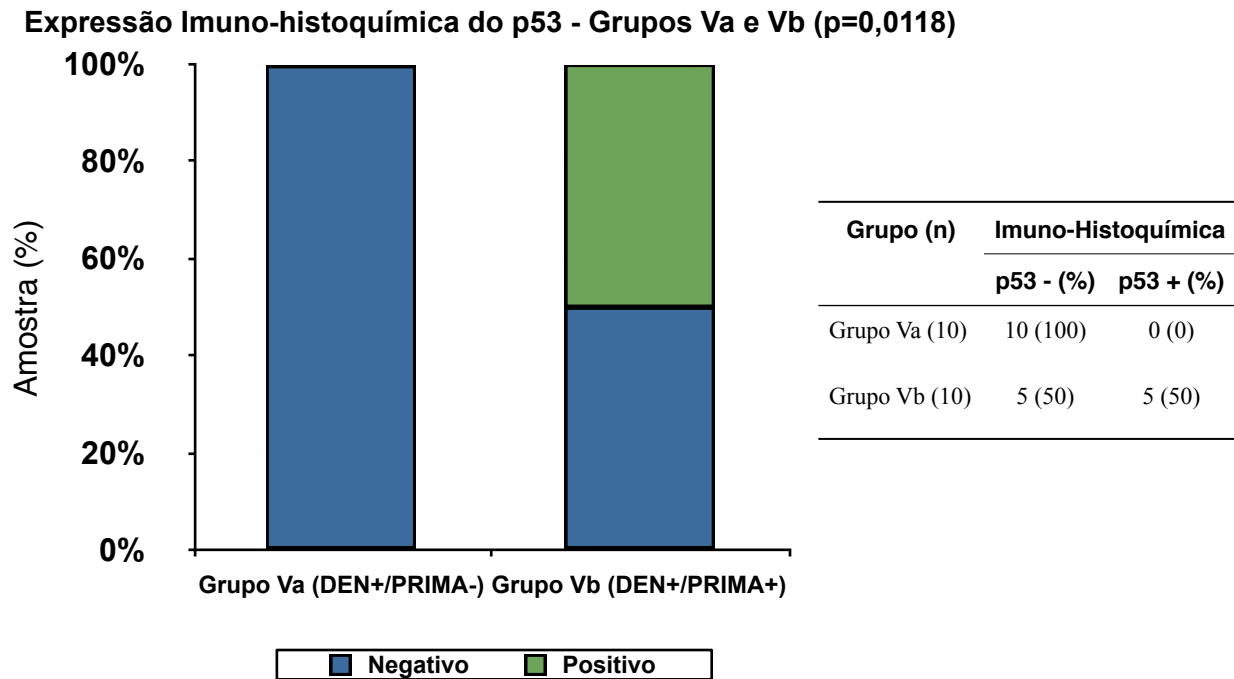


Figura 15. Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imuno-histoquímica do p53 dos grupos Va e Vb.

A expressão imuno-histoquímica do Ki67 encontrada nos grupos I e II, grupos II e IV e grupos Va e Vb, são demonstradas, respectivamente, nas figuras 16,17 e 18. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e II ( $p = 0,0001$ ), onde o grupo II apresentou maior quantidade de casos positivos de Ki67 do que o grupo I. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos III e IV ( $p = 0,2758$ ). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos Va e Vb ( $p = 0,3736$ ).

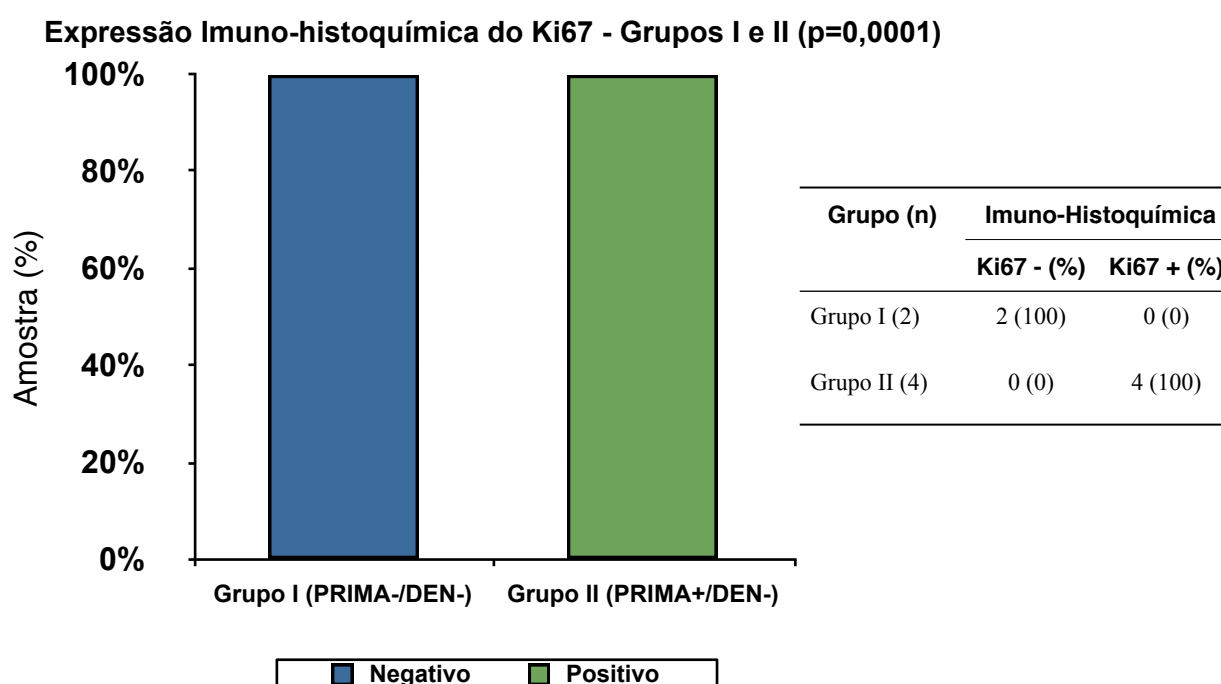


Figura 16. Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imuno-histoquímica do Ki67 dos grupos I e II.

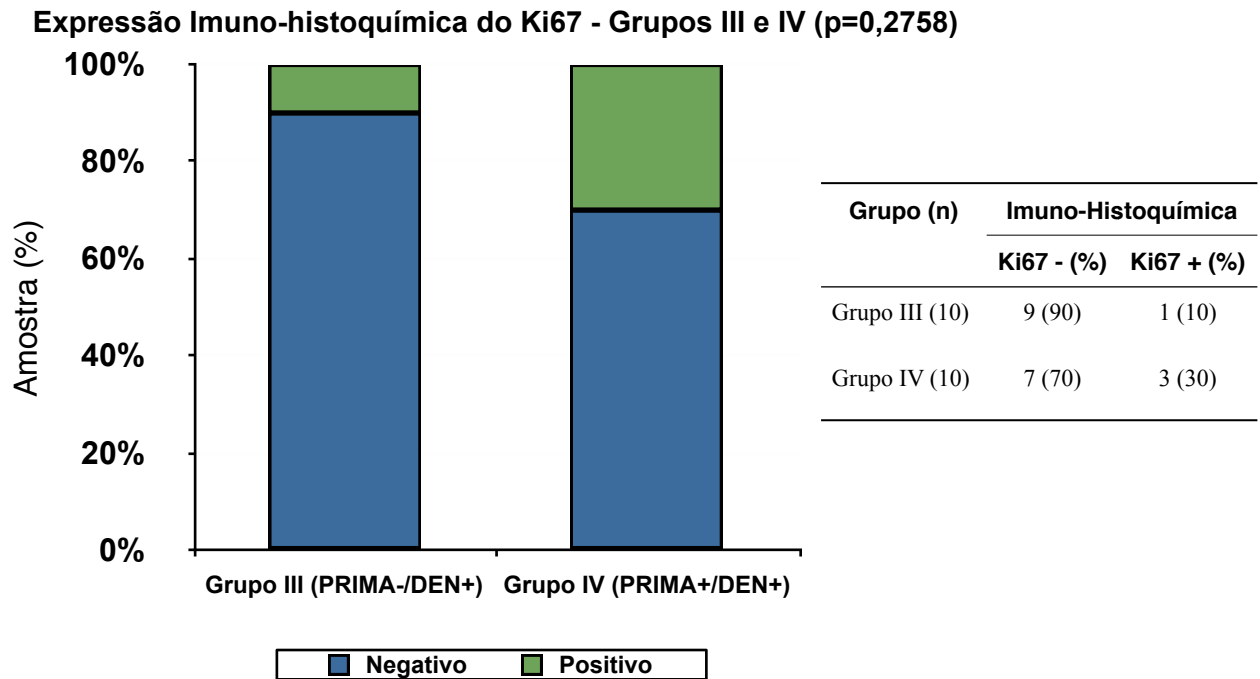


Figura 17. Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imuno-histoquímica do Ki67 dos grupos III e IV.

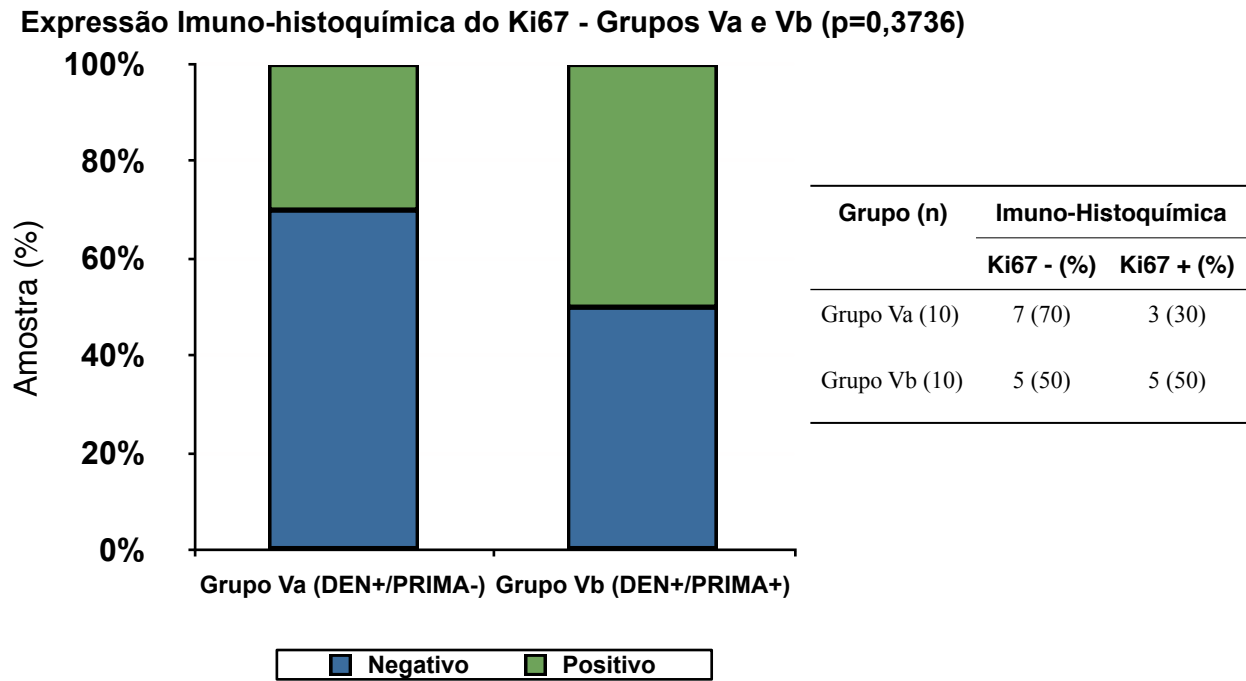


Figura 18. Gráfico de barras demonstrando achados de expressão imuno-histoquímica do Ki67 dos grupos Va e Vb.



## 9 DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos que a PRIMA-1 mostrou associação com redução da gravidade histopatológica em esôfago de camundongos previamente induzidos à carcinogênese com dietilnitrosamina e aumento da expressão imuno-histoquímica da proteína p53.

Não existem relatos na literatura de utilização de PRIMA-1 neste tipo de metodologia. Inexiste, também, avaliação de resposta *in situ* ou *in vivo* das neoplasias esofágicas experimentais expostas a esta substância.

A escolha de fêmeas, para constituir a amostra, contribuiu para que não se observe padrões de agressividade entre os animais e óbitos, com resultante diminuição da amostra, conforme evidenciado nos inúmeros estudos com camundongos sob carcinogênese esofágica(19,29-33,65).

A metodologia adotada durante o experimento, reproduziu os efeitos da carcinogênese esofágica sob dietilnitrosamina, conforme estudos prévios(33). Evidência de lesão intraepitelial de alto grau, como maior gravidade histopatológica neste trabalho, e ausência de carcinoma nas amostras induzidas, deve-se basicamente a dose utilizada, menor tempo de exposição e variabilidade das espécies. A dose utilizada de 0,04mg/1000ml, conforme Rubio(29), apresenta índice mais tardio de carcinoma (100% em 7 meses), mas com o benefício de menor número de perdas de animais, complicações locais, toxicidade, número de tumores sincrônicos e número de tumores em outros órgãos como hepático. Em contrapartida, a utilização de métodos com doses de 10mg/kg conforme estudo de Sallet (31) determina carcinomas na amostra mais precocemente, ao tempo 120 dias de exposição, mas com perdas potenciais e toxicidade, podendo inviabilizar o estudo. Os autores conduziram tal estudo baseado no objetivo de ter a menor perda possível, já que a amostra foi pequena, e observar os efeitos da PRIMA-1, onde doses elevadas de DEN, poderiam suplantam a capacidade de efeito da substância analisada.

Durante o estudo, as administrações intraperitoneais de PRIMA-1 diluídas, conforme orientações do fabricante, causaram taquicardia, taquipneia e imobilidade. Foram interpretadas como efeitos locais e sistêmicos do álcool. A análise da referência bibliográfica(60), não cita em nenhum momento tais efeitos, bem como não foram achados outras bibliografias. Entretanto, não se observou consequências sobre o comportamento, a alimentação ou morbidade durante o período

restante do estudo e ausência de complicações peritoneais visíveis no momento da laparotomia após eutanásia.

Nenhum dos animais expostos apenas a PRIMA-1 mostrou alterações histopatológicas (esofagite, lesão intraepitelial de baixo e alto grau). Demonstra-se a natureza inócua da substância. Estes achados estão em conformidade com o que é escrito por Selivanova(56), que a PRIMA-1 não induz a apoptose em células sem mutações. Este autor relata que na ausência de proteína truncada no núcleo, já que a proteína normal tem meia vida extremamente curta, a PRIMA-1 não acha locus para ação e não induz a apoptose. Nos animais, dos dois braços da pesquisa, grupos III e IV, referindo a carcinogênese esofágica sob DEN com e sem PRIMA-1, e grupos Va e Vb, referindo a período pós-carcinogênese, após DEN com e sem PRIMA-1, apresentaram achados histopatológicos alterados.

No primeiro braço da pesquisa, referindo-se a carcinogênese com e sem uso prévio de PRIMA-1, não foi possível demonstrar diferença estatística. Demonstra-se claramente achados patológicos menores em gravidade, bem como, maior número de esôfagos classificados como epitélio normal no grupo sob PRIMA-1, porém sem alcançar a significância. Embora seja tentador acreditar que o aumento do tamanho da amostra fosse tornar esses achados estatisticamente significantes, os autores, acreditam que este não seja o caminho. Baseados nos achados positivos, publicados até o momento, a maioria dos estudos utiliza diretamente a PRIMA-1 sobre tumores ou células tumorais e leitura dos efeitos em poucos dias. Particularmente, neste braço, foi pesquisado o efeito de uma dose inicial com intervalo de 5 meses, período extenso, no qual eventuais efeitos benéficos podem ter sido revertidos. No estudo inicial de Bykov(12), os animais inoculados com células tumorais no subcutâneo do flanco, foram reavaliados em 2 meses da dose inicial do medicamento. As vias de administração foram intratumoral ou endovenosa. Houve redução estatisticamente significativa do volume tumoral em ambas formas de administração, comparadas ao grupo controle. No estudo de Zache(60) os autores inocularam células tumorais intraperitoneais e avaliaram volume de ascite e viabilidade de células tumorais no líquido ascítico. A PRIMA-1 foi administrada por via endovenosa e intraperitoneal, com leitura dos efeitos em 21 dias. Houve diferença estatisticamente significativa nos dois itens.

No segundo braço do presente estudo, referindo-se à efeito pós-carcinogênese tumoral com ou sem uso prévio de PRIMA-1, houve diferença estatística entre os dois grupos no que tange a quantidade de lesões de alto e baixo grau. Observa-se claramente que a utilização de PRIMA-1 diminuiu a quantidade de lesões intraepiteliais de alto grau e aumento do número de casos nos quais não foi identificada qualquer lesão à histologia. Neste grupo, o intervalo entre administração da substância e leitura dos achados, foi de 20 dias.

O risco relativo de aparecimento de lesões intraepiteliais esofágica de baixo e alto grau, comparada a epitélio normal e esofagite com o uso de PRIMA-1 foi de 0,37 (redução de 63%) para comparação entre grupo III e IV e de 0,42 (redução de 58%) para comparação entre grupo Va e Vb.

Foram diferentes os achados da pesquisa conduzida por Watanabe(66), no qual, estudo experimental foi conduzido avaliando a resposta de tumores de bexiga. Após a inoculação tumoral, os animais foram tratados com curcumin, PRIMA-1 e associação de ambos, com instilação intravesical. A utilização isolada de PRIMA-1 não conseguiu efeitos benéficos quando foi mensurado o percentual de necrose e redução tamanho tumoral. Em contrapartida, o uso isolado de curcumin, demonstrou efeito positivo estatisticamente significativo.

TP53 é o gene mais estudado nos tumores de esôfago. A imuno-histoquímica é um bom método para avaliar a expressão de p53 como um indicador de mutações do gene TP53 nos tumores de epitélio esôfago. Embora a mutação de TP53 seja detectada mais fortemente em lesão intraepitelial de alto grau que em displasia de baixo grau (77% versus 29%,  $p < 0,01$ ), o acúmulo intranuclear de p53 revelado por imuno-histoquímica é detectado em 85% de lesões de alto grau e em 71% de lesões de baixo grau(20).

Nosso estudo demonstrou que todos os grupos que receberam PRIMA-1, apresentaram imuno-histoquímica para p53 mais detectável comparada aos seus grupos controle. É estreita a relação destes achados com a utilização da substância em estudo. Na avaliação em separado de cada caso, não há um padrão de apresentação entre patologia e imuno-histoquímica. Demonstra-se que a substância utilizada apresenta efeito de estabilização, prolongamento e perpetuação da proteína p53, qual é detectada pela imuno-histoquímica. Isto não traduz em evolução para apoptose, pois este fato depende da identificação de mutações genéticas irrecuperáveis, não esperada, por exemplo no grupo II. Este achado pode ter entendimento dificultado. Estudos como de Bykov(67),

Chen(68) e Brown(69) revisam extensamente os mecanismos pelo qual a PRIMA-1 ativa a cascata da apoptose utilizando-se a proteína p53 truncada produzida pelo gene p53 mutado, mas não há referencia de detecção imuno-histoquímica do p53 em achados de histologia normal e o quanto podem ser diretamente responsabilizados pela utilização de PRIMA-1.

A expressão imuno-histoquímica do Ki-67 tem sido útil na avaliação da proliferação celular em tecidos. Sua expressão é baixa em fases G1 e S do ciclo celular, mas chega a um nível muito alto durante a fase de mitose. Observando-se os achados imuno-histoquímicos de Ki67 nos dois braços do estudo, observa-se que a PRIMA-1 não alterou a proliferação celular.

Nas limitações deste estudo e perspectivas para novas pesquisas reporta-se para o alto custo da PRIMA-1, mesmo quando utilizados em animais de pequeno porte como os camundongos. Este é um fator limitador quanto uma possibilidade de aumento de amostra somando as restrições de legislação que regem as pesquisas com animais experimentais. Outra limitação foi os resultados negativos dos achados histopatológicos do primeiro braço desta pesquisa. Um provável prejuízo metodológico foi acreditar que a substância perpetuaria seu efeito ao longo de 5 meses de carcinogênese. Como perspectiva, poderia ser testado futuramente com doses mensais durante a carcinogênese, porém novamente com severas ressalvas ao custo. Outra perspectiva de pesquisa, seria a utilização direta por gavagem da PRIMA-1 tanto na carcinogênese, quanto no teste `a involução tumoral, os quais levantamento bibliográficos recentes em bases de pesquisa, não demonstram nenhuma publicação neste sentido. Quanto ao aspecto de expressão imuno-histoquímica, perspectiva de pesquisa seria a mensuração de p21, Ciclina D1 entre outros, para, principalmente, casos apenas de PRIMA-1 sem DEN (como o grupo II deste estudo), para respostas em aberto quanto ao aumento da expressão de p53 em células sem processo carcinogênico.

## 10 CONCLUSÕES

- Foi demonstrado que a PRIMA-1 não apresentou efeito preventivo, conforme achados histopatológicos, em esôfagos de camundongos induzidos à ação carcinogênica com dietilnitrosamina por 150 dias.
- Foi demonstrado que a PRIMA-1 apresentou associação com redução da gravidade histopatológica em esôfagos de camundongos induzidos previamente a ação carcinogênica com dietilnitrosamina por 150 dias.
- Foi demonstrado associação com expressão imuno-histoquímica da p53 entre amostras esofágicas com indução à carcinogênese esofágicas através da dietilnitrosamina com uso precoce e tardio de PRIMA-1.
- Não foi demonstrado associação com expressão imuno-histoquímica da Ki67 entre amostras esofágicas com indução à carcinogênese esofágicas através da dietilnitrosamina com uso precoce e tardio de PRIMA-1.

## 11 PERSPECTIVAS/CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Pesquisar expressão imuno-histoquímica de p21, Clinina D1 entre outras, para grupo experimentais apenas sobre efeito de PRIMA-1.
- Pesquisar o efeito da PRIMA-1, com utilização de dose mensal de 100mg/kg/dia, intraperitoneal por 10 dias, durante um período de 200 dias de carcinogênese esofágica com dietilnitrosamina. Com eutanásia progressiva mensal e grupo final.
- Pesquisar o efeito da PRIMA-1, com utilização de dose mensal de 100mg/kg/dia, por gavagem por 10 dias, durante um período de 200 dias de carcinogênese esofágica com dietilnitrosamina. Com eutanásia progressiva mensal e grupo final.
- Pesquisar o efeito da PRIMA-1, com utilização de dose mensal de 100mg/kg/dia, intraperitoneal por 10 dias, durante um período de 200 dias de carcinogênese gástrica com dietilnitrosamina. Com eutanásia progressiva mensal e grupo final.
- Pesquisar o efeito da PRIMA-1, com utilização de dose mensal de 100mg/kg/dia, por gavagem por 10 dias, durante um período de 200 dias de carcinogênese gástrica com dietilnitrosamina. Com eutanásia progressiva mensal e grupo final.

## 12 ANEXO

### ANEXO A – DIETILNITROSAMINA (DEN)

#### DIETHYLNITROSAMINE (DEN / N-NITROSODIETHYLAMINE)

Nitrosamina de peso molecular 102,1 formada por um radical nitroso ligado a quatro átomos de carbono e dez de hidrogênio ( $C_4H_{10} - N_2O$ )

FABRICANTE: Sigma Chemicals Company, United States of America

### ANEXO B – RAÇÃO PARA CAMUNDONGOS GERMANI

COMPOSIÇÃO BÁSICA : farelo de trigo, farelo de soja, farinha de ostras, farinha de ossos, milho moído(54%), farinha de carne, sal e caulin.

EVENTUAIS SUBSTITUTIVOS: Calcáreo moído (farinha de ostras), bentonita(caulin), farelo de aveia(farelo de trigo), sorgo moído(milho moído).

NÍVEIS DE GARANTIA: umidade (máx.) 12,0%; proteína bruta (mín.) 20,5%; extrato etéreo (min.) 4,0%; matéria fibros (máx.) 6,0%; matéria mineral (máx.) 9,7%; cálcio (Ca) (min.) 2,0%; fósforo(P) (min.) 0,6%.

ENRIQUECIMENTO POR KG DE RAÇÃO: Vitamina A (8000 UI); Vitamina D3 (1498,5 UI); Vitamina K (2mg); Vitamina E (5 UI); Riboflavina (3,3mg); Ac. Pantotênico

(10 ng); Ac Nicotínico (2 mg); Vitamina B6 (2 mg); Vitamina B12 (10 mg); Coliona(300 mg); Antioxidante (100 mg); Metionina (0,7g); Ferro (20 mg); Manganês (81 mg); Zinco (48 mg); Cobre (2 mg); Cobalto (0,2mg); Iodo (2 mg); Farinha de ostras (1 g); Sal (5 g); Pigmentador (20 mg); Antibiótico (10 mg); Coccidiostático (1 g).

### ANEXO C - PRIMA-1

Catalog. No:63520

CAS Registry No.: 5608-24-2

Formal Name: 2,2-bis(hydroxymethyl)-3-quinuclidinone

MF: C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>

FW: 185.2

Purity:  $\geq 95\%$

Stability:  $\geq 1$  year at  $-20^{\circ}\text{C}$

Supplied as: A crystalline solid

#### ANEXO D – PARAPLAST PLUS®

Tissue Embedding Medium

FABRICANTE: Tyco/Healthcare Kendeall.

COMPOSIÇÃO: D-metilSulfóxido (DMSO)

EMBALAGEM: 1Kg

#### ANEXO E – Anticorpo p53

(Monoclonal Mouse Anti-Murine p53)

(Clone Pab240)

(Code No. M3566)

FABRICANTE: DAKO Corporation

#### ANEXO F – Anticorpo Ki-67

*(Monoclonal Mouse Anti-Rat Ki-67 Antigen)*

*(Clone MIB-5)*

*(Code No. M7248)*

FABRICANTE: DAKO Corporation



### 13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893–917.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar;61(2):69–90.
3. Maranhão AGK, Vasconcelos AMN, Aly CMC, Neto D de LRN, Porto DL, Oliveira H de, et al. Como morrem os brasileiros: caracterização e distribuição geográfica dos óbitos no Brasil, 2000, 2005 e 2009. *Saúde Brasil 2010: uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde*. 1st ed. Brasília - DF: Ministério da Saúde; 2011. pp. 51–78.
4. Silva APR, Noronha CP, Silva JL de OS, Ferreira JM de OF, Oliveira JFP, Santos M de OS, et al. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde; 2011. 122 p.
5. Brown LM, Devesa SS, Chow W-H. Incidence of adenocarcinoma of the esophagus among white Americans by sex, stage, and age. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2008 Aug 20;100(16):1184–7.
6. Cook MB, Chow W-H, Devesa SS. Oesophageal cancer incidence in the United States by race, sex, and histologic type, 1977-2005. *Br J Cancer*. 2009 Sep 1;101(5):855–9.
7. Bosetti C, Levi F, Ferlay J, Garavello W, Lucchini F, Bertuccio P, et al. Trends in oesophageal cancer incidence and mortality in Europe. *Int J Cancer*. 2008 Mar 1;122(5):1118–29.
8. Fagundes RB, de Carli D, Xaubet RV, Cantarelli JC Jr. Unchanging pattern of prevalence of esophageal cancer, overall and by histological subtype, in the endoscopy service of the main referral hospital in the central region of Rio Grande do Sul State, in Southern Brazil. *Diseases of the Esophagus*. 2015 May 13;n/a–n/a.
9. Olivier M, Hussain SP, Caron de Fromentel C, Hainaut P, Harris CC. TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. *IARC Sci Publ*. 2004; (157):247–70.
10. Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *J Pathol*. 2012 Jan;226(2):352–64.
11. Zuckerman V, Wolyniec K, Sionov RV, Haupt S, Haupt Y. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J Pathol*. 2009 Sep;219(1):3–15.
12. Bykov VJN, Issaeva N, Shilov A, Hultcrantz M, Pugacheva E, Chumakov P, et al. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med*. 2002 Mar;8(3):282–8.
13. Messina RL, Sanfilippo M, Vella V, Pandini G, Vigneri P, Nicolosi ML, et al. Reactivation of p53 mutants by p53 reactivation and induction of massive apoptosis in thyroid cancer cells. *Int J Cancer*. 2012 May 15;130(10):2259–70.
14. Piantino CB, Reis ST, Viana NI, Silva IA, Morais DR, Antunes AA, et al. Prima-1 induces apoptosis in bladder cancer cell lines by activating p53. *Clinics*. 2013 Mar 31;68(3):297–303.
15. Wheeler JB, Reed CE. Epidemiology of Esophageal Cancer. *Surgical Clinics of NA*. Elsevier Inc; 2012 Oct 1;92(5):1077–87.

16. Palladino-Davis AG, Mendez BM, Fisichella PM, Davis CS. Dietary habits and esophageal cancer. *Dis Esophagus*. 2013 Jun 24.
17. Fagundes RB, Mello CR, Tollens P, Pütten AC, Wagner MB, Moreira LF, et al. p53 protein in esophageal mucosa of individuals at high risk of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esophagus*. 2001;14(3-4):185–90.
18. MD CED, MD RKT. *Molecular Basis of Esophageal Cancer Development and Progression*. Surgical Clinics of NA. Elsevier Inc; 2012 Oct 1;92(5):1089–103.
19. de Castro Junior MAM, Krueel CDP, Meurer L, de Castro AP. [Immunohistochemical expression of P53 and Ki-67 in diethylnitrosamine-induced carcinomas esophageal: experimental model]. *Rev Col Bras Cir*. 2010 Apr;37(2):128–34.
20. Chava S, Mohan V, Shetty P, Manolla M, Vaidya S, Khan I, et al. Immunohistochemical evaluation of p53, FHIT, and IGF2 gene expression in esophageal cancer. *Dis Esophagus*. Wiley Online Library; 2011.
21. Hamilton SR, Aaltonen LA, World Health Organization. WHO classification of tumors. Pathology and genetics. Tumours of the digestive system. Lyon: IARC. 2000.
22. Wynder EL, Bross IJ. A study of etiological factors in cancer of the esophagus. *Cancer*. 1961 Mar;14:389–413.
23. Jakszyn P, Gonzalez C-A. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. *World J Gastroenterol*. 2006 Jul 21;12(27):4296–303.
24. Mani H, Zander DS. Immunohistochemistry: applications to the evaluation of lung and pleural neoplasms: part 1. *Chest*. 2012 Nov;142(5):1316–23.
25. Wiseman M. The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *Proc Nutr Soc*. 2008 Aug;67(3):253–6.
26. Druckrey H. Carcinogene Wirkung von N-Methyl-N-Nitroso-Anilin. *Naturwissenschaften*; 1961. 2 p.
27. Clapp NK, Craig AW. Carcinogenic effects of diethylnitrosamine in RF mice. *J Natl Cancer Inst*; 1967. 14 p.
28. Luch A. Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2005 Feb;5(2):113–25.
29. Rubio CA, Liu FS, Chejfec G, Sveander M. The induction of esophageal tumors in mice: dose and time dependency. *In Vivo*. 1987 Jan;1(1):35–8.
30. Gurski R, Schirmer C, Krueel C. Induction of esophageal carcinogenesis by diethylnitrosamine and assessment of the promoting effect of ethanol and N-nitrosornicotine: experimental model in mice. *Diseases of the Esophagus*. 1999;12:99–105.
31. Sallet JA, Zilberstein B, Andreollo NA, Eshkenazy R, Pajecki D. Experimental esophageal carcinogenesis: technical standardization and results. *Dis Esophagus*. 2002;15(4):278–81.
32. Velho AV, Hartmann AAB, Krueel CDP. Effect of black tea in diethylnitrosamine-induced esophageal carcinogenesis in mice. *Acta Cir Bras*. 2008 Jul 1;23(4):329–36.

33. Castro Junior MAM, Kruehl CDP, Meurer L, Castro AP, Zimmermann BS. Experimental model of esophageal carcinogenesis. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões. SciELO Brasil*; 2007;34(3):153–6.
34. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Publishing Group*. 2009 Mar;9(3):153–66.
35. Souza RF, Morales CP, Spechler SJ. Review article: a conceptual approach to understanding the molecular mechanisms of cancer development in Barrett's oesophagus. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001 Aug;15(8):1087–100.
36. Guo G, Cui Y. New perspective on targeting the tumor suppressor p53 pathway in the tumor microenvironment to enhance the efficacy of immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2015;3(1):9.
37. Fåhræus R, Olivares-Illana V. MDM2's social network. *Oncogene*. 2014 Aug 28;33(35):4365–76.
38. Israels ED, Israels LG. The cell cycle. *The Oncologist*. 2000;5(6):510–3.
39. Scoazec J-Y. [When to use Ki67]. *Ann Pathol*. 2011 Nov;31(5 Suppl):S52–4.
40. Herlin P. [How to evaluate Ki67]. *Ann Pathol*. 2011 Nov;31(5 Suppl):S49–51.
41. Mertani HC, Belin S, Diaz J-J. [Ki67, nucleolus and cancer]. *Ann Pathol*. 2011 Nov;31(5 Suppl):S46–8.
42. Klumb CE, Cavalcanti Júnior GB. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. *Rev Bras Hematol Hemoter. SciELO Brasil*; 2002;24(2):111–25.
43. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science (New York, NY)*. 1991;253(5015):49.
44. International Agency of Research on Cancer, World Health Organization. IARC TP53 Database. Topography Prevalence. 2013 ed. p53.iarc.fr. www.p53.iarc.fr.
45. Pflaum J, Schlosser S, Müller M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol*. 2014;4:285.
46. Bykov VJN, Wiman KG. Mutant p53 reactivation by small molecules makes its way to the clinic. *FEBS Letters. Federation of European Biochemical Societies*; 2014 Aug 19;588(16):2622–7.
47. Bykov VJN, Issaeva N, Selivanova G, Wiman KG. Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anticancer drugs: a statistical analysis of information in the National Cancer Institute database. *Carcinogenesis*. 2002 Dec;23(12):2011–8.
48. Wang S-J, Gu W. To be, or not to be: functional dilemma of p53 metabolic regulation. *Curr Opin Oncol*. 2014 Jan;26(1):78–85.
49. Junttila MR, Evan GI. p53--a Jack of all trades but master of none. *Nature Publishing Group*. 2009 Nov;9(11):821–9.
50. Petitjean A, Achatz MIW, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*. 2007 Apr 2;26(15):2157–65.

51. Saha T, Kar RK, Sa G. Progress in Biophysics and Molecular Biology. Progress in Biophysics and Molecular Biology. Elsevier Ltd; 2015 Mar 1;117(2-3):250–63.
52. Selivanova G, Kawasaki T, Ryabchenko L, Wiman KG. Reactivation of mutant p53: a new strategy for cancer therapy. *Semin Cancer Biol.* 1998;8(5):369–78.
53. Wiman KG. Strategies for therapeutic targeting of the p53 pathway in cancer. *Cell Death Differ.* 2006 Jun;13(6):921–6.
54. Izetti P, Hautefeuille A, Abujamra AL, de Farias CB, Giacomazzi J, Alemar B, et al. PRIMA-1, a mutant p53 reactivator, induces apoptosis and enhances chemotherapeutic cytotoxicity in pancreatic cancer cell lines. *Invest New Drugs.* 2014 May 20;32(5):783–94.
55. Wiman KG. Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. *Oncogene.* 2010 Jul 29;29(30):4245–52.
56. Selivanova G, Wiman KG. Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene.* 2007 Apr 2;26(15):2243–54.
57. Cui B, Yang Q, Guan H, Shi B, Hou P, Ji M. PRIMA-1, a Mutant p53 Reactivator, Restores the Sensitivity of TP53Mutant-Type Thyroid Cancer Cells to the Histone Methylation Inhibitor 3-Deazaneplanocin A. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2014 Jun;99(6):E962–70.
58. Shi H, Lambert JMR, Hautefeuille A, Bykov VJN, Wiman KG, Hainaut P, et al. In vitro and in vivo cytotoxic effects of PRIMA-1 on hepatocellular carcinoma cells expressing mutant p53ser249. *Carcinogenesis.* 2008 Jul;29(7):1428–34.
59. Bykov VJN, Zache N, Stridh H, Westman J, Bergman J, Selivanova G, et al. PRIMA-1(MET) synergizes with cisplatin to induce tumor cell apoptosis. *Oncogene.* 2005 May 12;24(21):3484–91.
60. Zache N, Lambert JMR, Wiman KG, Bykov VJN. PRIMA-1MET inhibits growth of mouse tumors carrying mutant p53. *Cell Oncol.* 2008;30(5):411–8.
61. Lambert JMR, Gorzov P, Veprintsev DB, Soderqvist M, Segerback D, Bergman J, et al. PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell.* 2009 May 5;15(5):376–88.
62. Wang T, Lee K, Rehman A, Daoud SS. PRIMA-1 induces apoptosis by inhibiting JNK signaling but promoting the activation of Bax. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2007 Jan 5;352(1):203–12.
63. Duffy MJ, Synnott NC, McGowan PM, Crown J, O'Connor D, Gallagher WM. Cancer Treatment Reviews. *Cancer Treatment Reviews.* Elsevier Ltd; 2014 Dec 1;40(10):1153–60.
64. Albus U. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edn). *Laboratory Animals.* 2012.
65. Sallet JA, Andreollo NA, Venco FE, Brandalise NA, Leonardi LS. Carcinoma epidermóide de esôfago induzido pela dietilnitrosamina (DEN). *Acta Cir Bras.* 1996;11(3):138–43.
66. Watanabe FT, Chade DC, Reis ST, Piantino C, Dall'Oglio MF, Srougi M, et al. Curcumin, but not Prima-1, decreased tumor cell proliferation in the syngeneic murine orthotopic bladder tumor model. *Clinics. SciELO Brasil;* 2011;66(12):2121–4.
67. Bykov VJN, Lambert JMR, Hainaut P, Wiman KG. Mutant p53 rescue and modulation of p53 redox state. *Cell Cycle.* 2009 Aug 15;8(16):2509–17.

68. Chen F, Wang W, El-Deiry WS. Current strategies to target p53 in cancer. *Biochemical Pharmacology*. 2010 Sep 1;80(5):724–30.
69. Brown CJ, Lain S, Verma CS, Fersht AR, Lane DP. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nature Publishing Group*. 2009 Dec;9(12):862–73.

**14 ARTIGO EM INGLES**

TARGET JOURNAL: [www.biomedcentral.com/authors/choosejournal](http://www.biomedcentral.com/authors/choosejournal)

Molecular Cancer. <http://molecular-cancer.com>

BMC Cancer. <http://biomedcentral.com/bmccancer>

Diseases of the Esophagus. [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1442-2050](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1442-2050)

Acta Cirúrgica Brasileira. <http://www.scielo.br/acb>

**EFFECT OF PRIMA-1 ON ESOPHAGEAL CARCINOGENESIS INDUCED BY  
DIETHYLNITROSAMINE**

Miguel Angelo Martins de Castro Junior<sup>+</sup>

Angela Potter de Castro<sup>++</sup>

Susi Heliene Lauz Medeiros<sup>++</sup>

---

\*Graduate project in Gastroenterology and Hepatology, College of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), to obtain the PhD Degree. Conducted in the Sectoral Vivarium of the Experimental Morphology Laboratory, Anatomy Sector, College of Medicine, Federal University of Rio Grande (FURG) and Experimental Pathology Unit of the Animal Experimentation Center, Hospital de Clínicas de Port Alegre, UFRGS.

<sup>+</sup>Doctoral candidate of the Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology, College of Medicine, UFRGS.

<sup>++</sup>Federal University of Rio Grande - FURG.

<sup>+++</sup>Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS.

## SUMMARY

Squamous Cell Carcinoma of the esophagus is the most common histological type in the world. It has its origins in the squamous epithelium of the esophagus and is found most often in the middle third of the organ. Esophageal carcinogenesis is a process that results from the accumulation of mutations involving different genes, such as TP53. This has mutated in more than 50% of esophageal tumors. Numerous studies have been aimed at restoring the function of the p53 protein, which resulted in the discovery of PRIMA-1. In this study, there were surveyed possible protective effects of PRIMA-1 on the epithelium of the esophagus under a chemical carcinogenic effect preventing neoplastic development and inducing regression of the carcinogenesis. To test this hypothesis, we conducted a study using PRIMA-1 in an experimental model for esophageal carcinogenesis by diethylnitrosamine with induction of squamous cell carcinoma. The experimental study was conducted with six groups of animals, where groups I and II were considered controls, being distinguished by the use of PRIMA-1. Groups III and IV, and Va and Vb were considered studies group, which received diethylnitrosamine for three consecutive days each week. While groups III and IV were distinguished by the use of PRIMA-1 prior to the start of the carcinogenesis, groups Va and Vb were distinguished by the use of PRIMA-1 at the end of the carcinogenesis. The study presented euthanasia data with collection of esophageal parts at 150 days for groups I, II, III, and IV, and at 180 days for groups Va and Vb, due to the observation period after late use of PRIMAA-1. No histopathological changes were detected in the control groups, group I (DEN-/PRIMA-) AND II (DEN-/PRIMA+). No differences were detected in the statistically significant histopathological changes among groups III (DEN+/PRIMA-) and IV (DEN+/PRIMA+ initial). Differences were detected in the statistically significant histopathological changes among groups Va (DEN+/PRIMA-) and Vb (DEN+/PRIMA+ late). The immuno-histochemical analysis of p53 showed statistical difference in the groups that used PRIMA-1 in relation to their controls. The immuno-histochemical analysis of Ki-67 showed statistical difference only between the two control groups. It is concluded that PRIMA-1 had the effect of reducing histopathological severity in the esophagi of mice previously induced to carcinogenesis with diethylnitrosamine and increase of the immuno-histochemical expression of protein p53.

**Key words:** PRIMA -1. Esophagus. Diethylnitrosamine. Squamous cell carcinoma. p53. Ki67

## INTRODUCTION

Cancer of the lining of the esophagus, including its two most common histological types, squamous cell carcinoma (SCC) and adenocarcinoma (ACE), is the eighth most common type of cancer in the world, with an estimated 482,000 new cases in 2008 and 407,000 deaths in the same year.(1) Developing countries contribute 83% of new cases and 86% of deaths.(2) In Brazil, the neoplasms are the second most common cause of death (3) and the SCC is the eighth cause of cancer deaths in 2010, behind lung, stomach, colon and breast, prostate, CNS and liver.(3) The highest incidence is in the southern region of Brazil, with 18.1 cases per 100 thousand inhabitants.(4)

SSC is also the most common histological type in the world, even after the increase of 400% in the incidence of ACE in the US(5,6) and some countries of Western Europe, where up to 80% of the cases are ACE.(7) The predominance of SCC persists due to its high prevalence in Western Asia, such as in some provinces of China, the northeast of Iran, the coast of the Caspian Sea, and the plains of Turkistan, where 120 to 175 new cases are diagnosed per 100,000 inhabitants per year(2). Zones of intermediate prevalence include France(7), southern and western Africa, and some areas of South America, such as Uruguay, southwest Argentina, and Rio Grande do Sul, where SSC still accounts for more than 80% of the new cases of SCC(1,8).

The association between esophageal cancer and diet has been suspected since 1961, when Wynder and Bross observed that a diet rich in milk and vitamins reduced the risk of cancer(9). Squamous cell carcinoma of the esophagus in humans has several factors of risk/exposure, with exposure to nitrosamines cited(10).

Nitrosamines are found in almost all food sources and habits of humans. From canned and preserved foods to beer and whiskey, from tobacco smoke to even simple vegetables and water, and during storage or preparation of foods(11). In addition, nitrosamines can also be formed by natural bodily processes, such as oral salivary nitrate reduction(12). The American Cancer Research Institute concluded that both exogenous and endogenous exposure to these substances may increase cancer risk(13).

Only nitrosamines are capable of inducing tumors in the esophagus of laboratory animals(14). The action of diethylnitrosamine (DEN) is related to the tissue presence of cytochrome P450. This is



present in the liver and esophagus (in the cells of the mucosa and in the reticuloendothelial system), causing the majority of tumors in them(15). The principal pre-mutagenic basis formed by DEN is O<sup>6</sup>-alkylguanine, which, during cell division, leads to erroneous incorporation of thymidine instead of cytosine, thus generating a transitional G-C mutation: A-T. When this mutation occurs in certain codons of genes, as in the case of TP53, these can lose control of cell proliferation (14,15).

The experimental model of Rubio(16), with low doses of DEN for a few consecutive days a week for a prolonged period, reproduced by Gurski(17), Sallet(18), Velho(19), Castro Jr.(20,21), and by other authors is what has the best results with regard to number of tumors, low mortality of the specimens, and low hepatotoxicity.

Gene TP53 codifies protein p53, which has important action in the cellular cycle(22). Gene TP53 receives signaling of the presence of mutations and indirectly provides for repair or apoptosis, trying to prevent the development of tumor cells(22). This gene is mutated in more than 50% of esophageal tumors, where either it does not produce the protein that would act to signal the halt of the cycle, or it produces a truncated protein that does not present any action(21,23,24,25).

Numerous studies have been aimed at restoring the function of protein p53(26-29). In 2002, Bykov et al. published the identification of a compound that suppressed the growth of cells of a mutated p53 form. This compound, 2,2-bis(hydroxymethyl)-azabicyclo[2,2,2]octan-3-one, was designated as PRIMA-1 (*p53 reactivation and induction of massive apoptosis*)(27). This small molecule with a molecular weight of 185 kd restores specific bond sequences of p53 with the DNA, recovering the functional conformity of p53 generated by the mutated gene, restoring its transcriptional activity(27,30).

In a recent study, Piantino(31) evaluated the effect of PRIMA-1 on the induction of apoptosis mediated by p53 after induction of the damage to the DNA in lines of bladder carcinoma. PRIMA-1 was evaluated in two cellular lines of bladder cancer, T24, which has characteristic mutation of TP53, and RT4, which has intact TP53. It was capable of reactivating the function of the p53 in the line of bladder cancer with mutated TP53, promoting apoptosis through the expression of Bax and Puma, activation of the Caspase cascade and rupture of the mitochondrial membrane, independent of Bax, in cellular line T24 (p53 mt).

Zache et al. compared the effect PRIMA-1 when administered intraperitoneally and intravenously in a group of laboratory animals inoculated with tumor cells of sarcomas and breast neoplasia. The clinical response of ascites and viable tumor cells was evaluated. There was twenty time greater reduction in ascites and neoplastic cells in the intravenous form of administration and nine times greater in the intraperitoneal form, when compared with control solution with statistical relevance. This demonstrated that both forms of administration are efficient(32).

PRIMA-1's action mechanism accepted thus far was published by Lambert in 2009(33). Apparently, PRIMA-1 bonds with protein p53 and modifies its structure. In doing so, it restores the area for bonding between p53 and the genes regulated by it, which was altered by the mutation, allowing for the natural activation of transcription of genes such as WAF1, Bclx, and Puma which act in the inhibition of the cellular cycle and in induction of apoptosis(34,35). For this, PRIMA-1 is converted into compounds that react with the protein accumulated in the nucleus. This interacts in the core of the DNA from residual cysteines not yet fully known(33).

Also of importance in the cycle, Ki-67 (MKI67) is a protein present in the nucleus, whose function is related to cellular proliferation. This protein is only expressed in the cycle of cell division: in the interphase (G1, S, G2); prophase; metaphase; anaphase, and telophase, and is absent in phase G0, when the cell is quiescent; therefore, it is an excellent marker of cell division. The analysis of the proliferation rate is what allows us to characterize the degree of tumor cell proliferation (rate of growth), and consequently, its degree of aggressivity, greater risk of new tumor clones, mutations, which hinders the restriction of the tumor by the immune system(36,37).

In this study, we studied possible protective effects of PRIMA-1 on the epithelium of the esophagus under a chemical carcinogenic effect by DEN, preventing the development and halt of the carcinogenic process after chemical induction. To test this hypothesis, we conducted a study, using PRIMA-1, in an experimental model of esophageal carcinogenesis by DEN with evaluation by histopathology and immunohistochemistry of p53 and Ki67.

## **MATERIAL AND METHODS**

This experimental study was approved according to the report no. P018/2011, Process 23116.003787/2011-21 of the Commission on Ethics in Animal Use (CEUA), Dean of Research and Graduate Studies (PROPESP), FURG.

We used mice (*Mus musculus domesticus*, BALB/c), with a total of 46 females at 60 days of age and average initial weight of 30 grams, originating from the central vivarium of FURG.

The sample was calculated based on experimental studies of the same line of research(16-19).

The animals were kept in the Vivarium, in stable, controlled conditions of humidity, temperature, and lighting. All the animals were adapted to these conditions, seven days before entering into the experiment in this same unit, with up to ten animals kept per box. Following all the ethical principles for treatment of the animals, avoiding pain and discomfort during the procedures and supplying the basic needs of food and comfort, in line with the precepts of the literature(38).

### **Experiment**

Starting on the first day of the experiment, DEN was added, at a concentration of 0.04mg/1000mL, to the water of the animals in the Study Group, and offered each week for three consecutive days, for induction of tumors, according to the experimental model(16), maintaining the standard feeding. The water for drinking and for preparation of the solutions was from the public water supply network. The animals had free access to feed and drinking water throughout the study.

The substance PRIMA-1 was administered to the animals, in the dose of 100 mg/kg/day(27) for 10 days, by intraperitoneal route(32)(Figure 1).

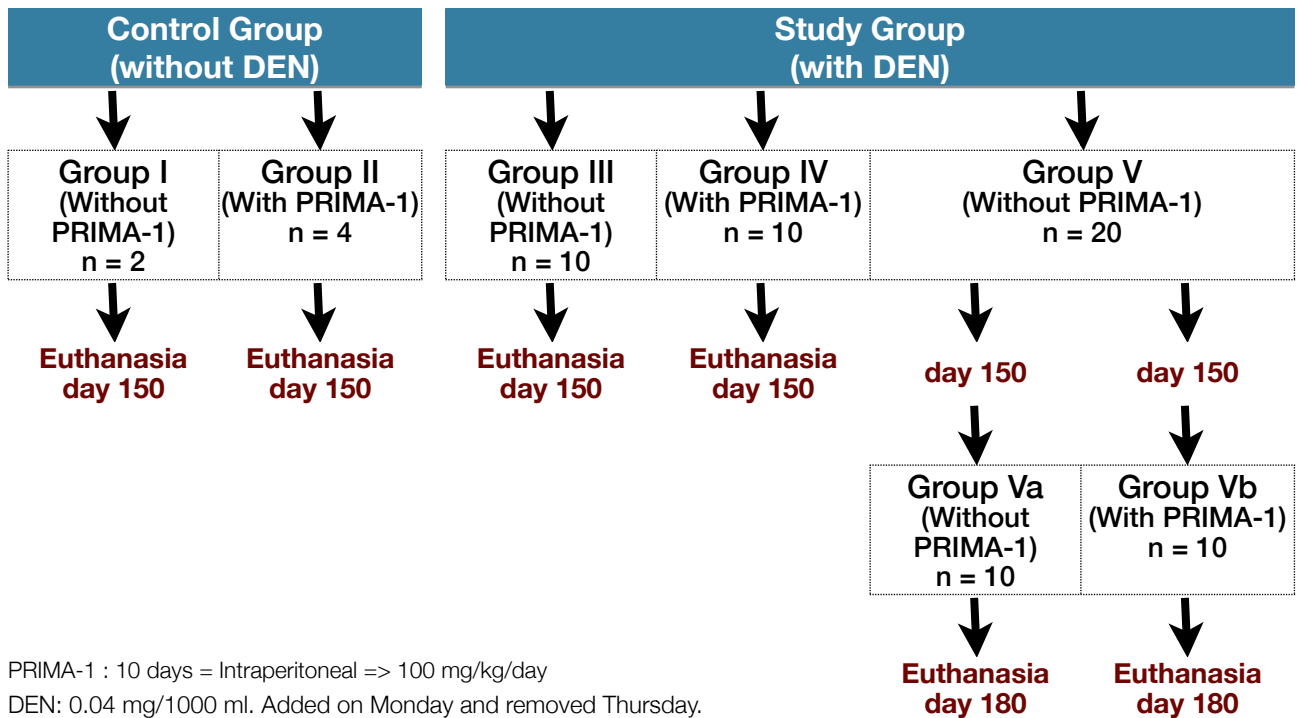


Figure 1 Flowchart of the experiment. Experimental study with two control groups (without DEN), group I (without PRIMA-1), and group II (with PRIMA-1), and four studies (with DEN), group III (without initial PRIMA-1), group IV (with initial PRIMA-1), group Va (without initial PRIMA-1 after 150 days) and group Vb (with initial PRIMA-1 after 150 days). (DEN: diethylnitrosamine; PRIMA-1: p53 reactivation and induction of massive apoptosis)

Make-up of the groups:

- **Group I** received water *ad libitum*, renewed twice a week. No exposure to DEN or PRIMA-1. Euthanasia day 150.
- **Group II** received water *ad libitum*, renewed twice a week. No exposure to DEN and with administration of PRIMA-1, 100 mg/kg/day, intraperitoneal, for the first 10 days of the experiment. Euthanasia day 150.
- **Group III** received water *ad libitum*. The water was replaced with a solution of DEN, for 72 hours a week. No Administration of PRIMA-1. Euthanasia day 150.
- **Group IV** received water *ad libitum*. The water was replaced with a solution of DEN, for 72 hours a week. Administration of PRIMA-1, 100 mg/kg/day, intraperitoneal, for the first 10 days of the experiment. Euthanasia day 150.

- **Group V** received water ad libitum. The water was replaced with a solution of DEN, for 72 hours a week. On day 150 of the experiment, the administration of DEN was suspended, and the animals were divided into **Group Va**: with free access to water and feed; **Group Vb**: with free access to water, feed, and administration of PRIMA-1, 100 mg/kg/day, intraperitoneal, for 10 days. Euthanasia day 180.

### Sample Preparation

Each animal of the group was euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber(38). The esophagus was dissected by making a thoracoabdominal xyphopubic midline incision, and the lumen was opened longitudinally, exposing the mucosa. Curled in on itself from the esophagogastric junction and held in this position by a pin. They were placed in plastic jars, properly identified by the group, with 10% buffered aqueous formaldehyde, for three to six days. Finally, they were blocked in paraffin and coded by a lab employee, with no initial knowledge of the author or pathologists. 5- $\mu$ m cuts were made, fitting four cuts per glass slide for histopathological study; and after every 10 slides, one slide was prepared with four cuts for immuno-histochemical study, until reaching the end of the block.

### Histopathology

For the histopathological analysis, the slides were colored with hematoxylin and eosin. The slides were examined by two pathologists, and their results were compared against a statistical test.

The histological cuts of the esophagus were analyzed under a common optical microscope for identification of the histopathological changes(15) and classified:

- **Normal Histology:** in a row of basal cells located between the edge of the epithelium and the submucosa, with oval and rounded nuclei. It presents a stratum corneum that occupies one third or up to half of the epithelial thickness. The muscular is not distinguished from the mucosa and some rudimentary papillae are seen.

- **Esophagitis:** the epithelium is thicker, at the expense of hyperplasia of the basilar layer, papillary hyperplastic, hyperkeratosis, and inflammatory infiltrated composed of nuclear polymorphs and lymphocytes.
- **Low Grade Intraepithelial Lesion:** increase of the basal cell layers, reaching a third of the epithelium, with dysplasic cells.
- **High Grade Intraepithelial Lesion and Carcinoma *in site*:** the dysplasic changes affect the entire thickness of the epithelium, which is composed of markedly abnormal cells. However, some parakeratosis can be observed on the epithelial surface.
- **Invasive Carcinoma:** the malignant cells are found below the basal membrane, invading at least the particular slide.

### Immuno-histochemistry

For the immunohistochemical analysis, the slides were subjected to the specific protocol for marker p53 and Ki67. We used a mouse p53 anti-protein monoclonal primary antibody of the *DAKO Corporation* brand (Pab240 Clone) and mouse Ki-67 anti-protein primary monoclonal antibody (MIB-5 Clone) of the *DAKO Corporation* brand.

The immunohistochemical technique was maintained as previously published. (21)

In the immunohistochemical analysis, slides with 10% intensely colored cellular nuclei for a microscopic field of 400x magnification were considered as a positive protein expression (25). The slides were examined by a pathologist with experience in immuno-histochemistry from UFRGS, who carried out the count of the total of cells in the areas of interest, and the count of the positive cells in this area, establishing its proportion in terms of percentages. In the cases where there was no delimited lesion and for areas with no lesion, the count was done for at least 300 cells, to establish the percentage of positivity.

## Statistical Analysis

The data collected was tabulated with the aid of the Number iworks 11 program. The categorical variables were analyzed descriptively using the descriptive measurements: absolute frequency (n) and relative frequency (%). The study groups were compared with regard to the distribution of the findings of pathology through the Fisher exact test. The immuno-histochemical expressions of p53 and Ki67 were grouped into the negative (expressions <10%) and positive ( $\geq 10\%$ ) categories. For purposes of comparison between the groups, the categories were coded with 0 (negative) and 1 (positive), and these scores were analyzed. The interest groups were compared with regard to the distribution of the scores of p53 and Ki67 using the Mann-Whitney non-parametric test. The significance level of 0.05 ( $\alpha = 5\%$ ) was adopted in all the statistical tests employed and the SAS<sup>®</sup> statistical program, version 9.3, was used for all the statistical analyses.

## RESULTS

No behavioral manifestations of aggressivity were observed among the mice, nor was any death recorded during the experiment.

There was no impairment during the study with regard to the methodology applied to the animals. No abdominal complications were found with regard to the intraperitoneal application of PRIMA-1. The kappa index in relation to the histopathological results, from both pathologists, was considered excellent (kappa=0.92; IC 95%: 0.90-0.94;  $p < 0.0001$ ).

No histopathological changes were detected in the controls, group I (DEN - and PRIMA -) and II (DEN - and PRIMA +), whose esophagi served as a normality standard. With particular regard to group II, no inflammatory or reactionary histopathological manifestation was observed in the analysis of the specimens.

Histopathological findings for the groups subjected to carcinogenesis at 150 days without initial use of PRIMA-1 (group III) and with initial use of PRIMA-1 (group IV) and for the groups subjected to carcinogenesis at 150 days and observation of 30 days without use of PRIMA-1 (group Va) and with

use of PRIMA-1 (group Vb) are shown, respectively, in figure 2. While no statistically significant difference was found between groups III and IV ( $p = 0.1312$ ), a statistically significant difference was found between groups Va and Vb ( $p = 0.0387$ ).

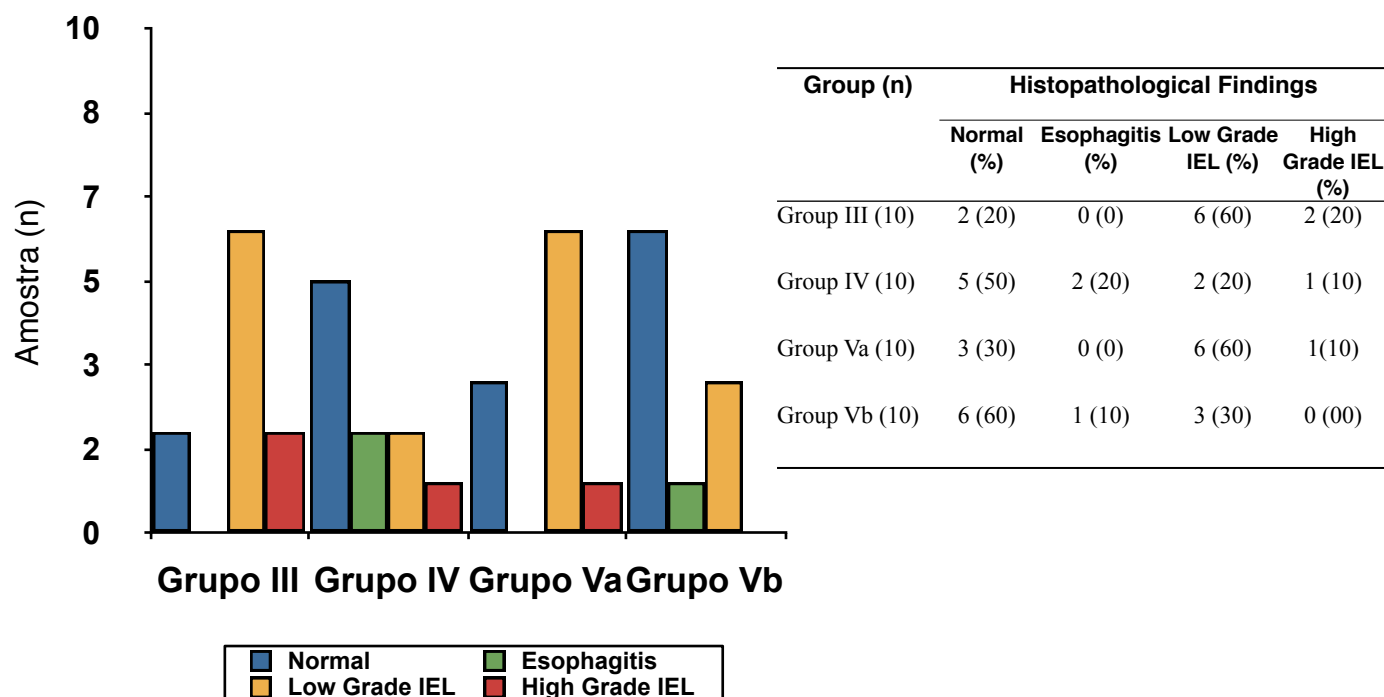


Figure 2. Bar graph showing histopathological findings of groups III and IV ( $p=0.1312$ ) and groups Va and Vb ( $p=0.00387$ ). (Low grade IEL: low grade intraepithelial lesion; high grade IEL: high grade intraepithelial lesion)

The immuno-histochemical expression of p53 found in groups I and II, groups III and IV, and groups Va and Vb, are shown, respectively, in figure 3. A statistically significant difference was found between groups I and II ( $p = 0.0001$ ), where group II had a higher number of positive cases of p53 than group I. A statistically significant difference was found between groups III and IV ( $p = 0.0043$ ), where group IV had a higher number of positive cases of p53 than group III. A statistically significant difference was found between groups Va



and Vb ( $p = 0.0118$ ), where group Vb had a higher number of positive cases of p53 than group Va.

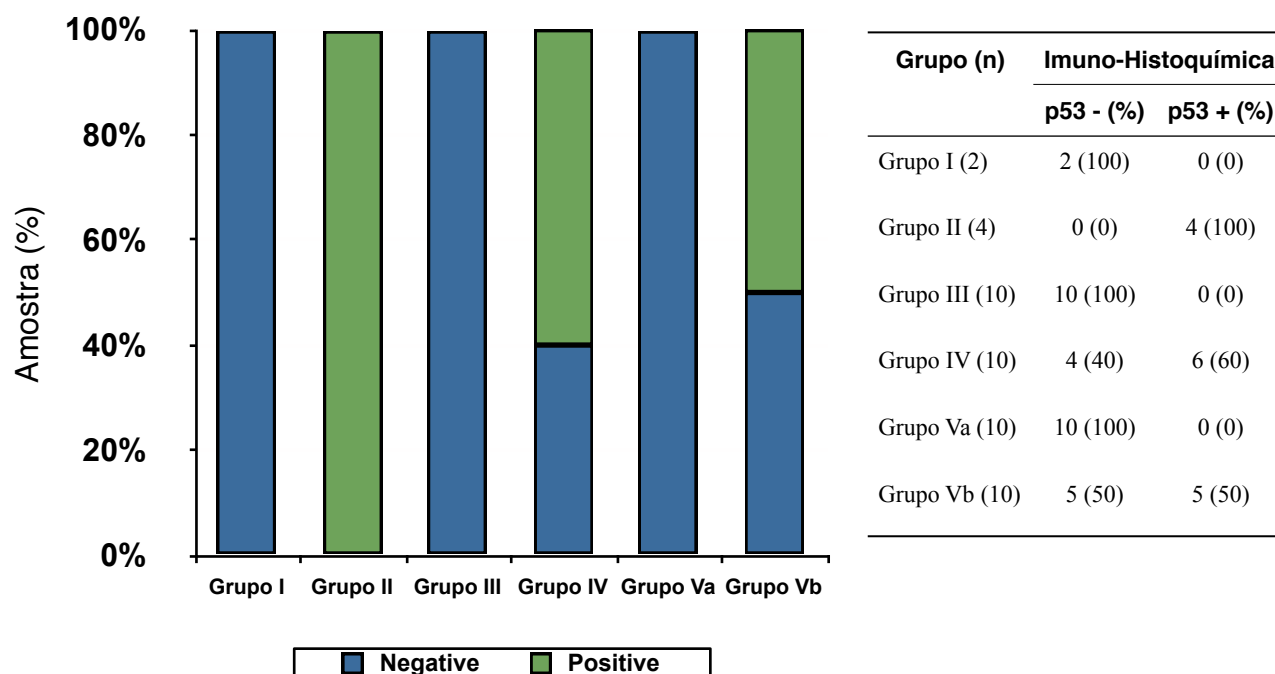


Figure 3. Bar graph showing findings of immuno-histochemical expression of p53 for groups I, II, III, IV, Va, and Vb.

The immuno-histochemical expression of Ki 67 found in groups I and II, groups II and IV, and groups Va and Vb are shown, respectively, in figure 4. A statistically significant difference was found between groups I and II ( $p = 0.0001$ ), where group II had a higher number of positive cases of Ki67 than group I. No statistically significant difference was found between groups III and IV ( $p = 0.2758$ ). No statistically significant difference was found between groups Va and Vb ( $p = 0.3736$ ).

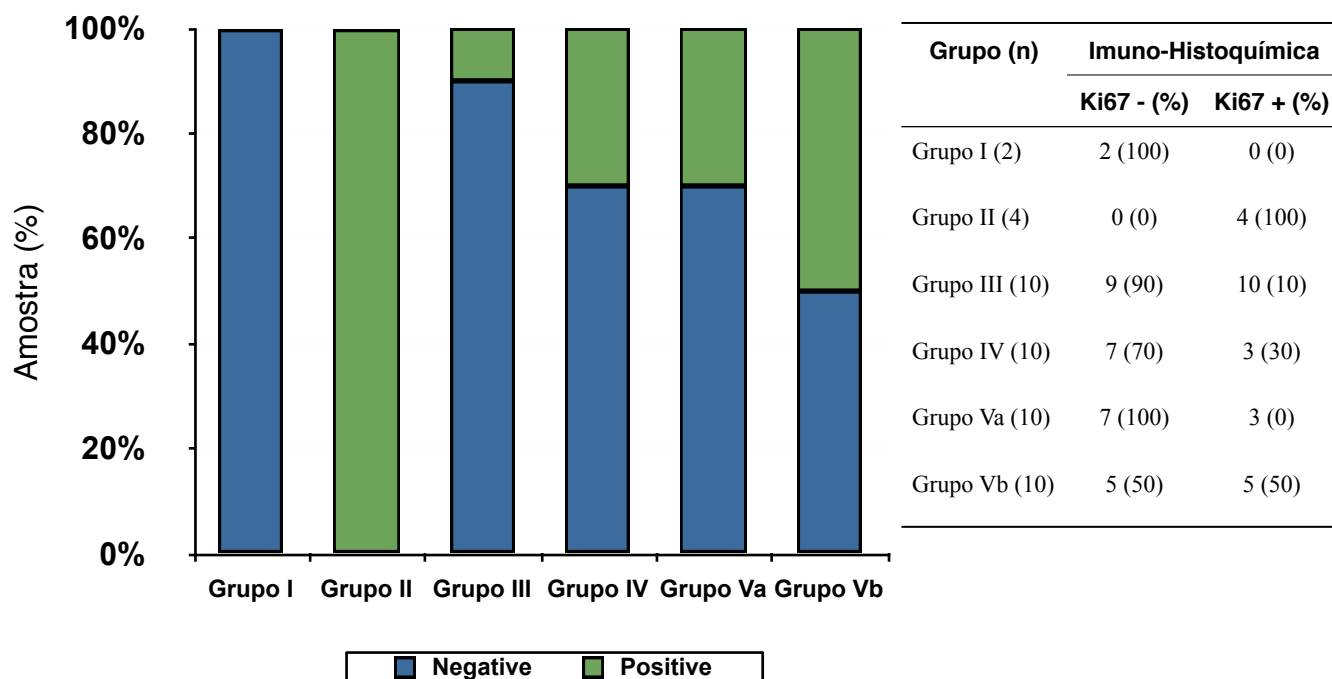


Figure 4. Bar graph showing findings of immuno-histochemical expression of Ki67 for groups I, II, III, IV, Va, and Vb.

## DISCUSSION

It is concluded that PRIMA-1 had the effect of reducing histopathological severity in the esophagi of mice previously induced to carcinogenesis with diethylnitrosamine and increase of the immuno-histochemical expression of protein p53.

There are no reports in the literature on the use of PRIMA-1 in this type of methodology. There also is no evaluation of in situ or in vivo response of the experimental esophageal neoplasms exposed to this substance.

The choice of females to constitute the sample contributes to the non-observance of patterns of aggressivity among the animals and deaths, with a resulting decrease of the sample(16-21,39).

The methodology adopted during the experiment reproduced the effects of esophageal carcinogenesis due to diethylnitrosamine, according to previous studies (20). Evidence of high-grade intraepithelial lesion, such as the greater histopathological severity in this study, and absence of carcinoma in the samples induced, is basically due to the dose used, the shorter exposure time, and variability of the species. The dose of 0.04 mg/1000mL used, according to Rubio(16), as a later carcinoma index (100% in 7 months), but with the benefit of a lower number of losses of animals, local complications, toxicity, number of synchronic tumors, and number of tumors in other organs such as the liver. On the other hand, the use of methodologies with doses of 10 mg/kg, in accordance with the Sallet study(18), brings benefits of earlier carcinomas in the sample, at the time of 120 days of exposure, but with potential losses and toxicity, and may derail the study. The authors conducted such a study based on the goal of having the lowest possible loss, since the sample was small, and observing the effects of PRIMA-1, where high doses of DEN could supplant the effective capacity of the substance analyzed.

None of the animals exposed only to PRIMA-1 showed histopathological changes (esophagitis, low and high-grade intraepithelial lesion). This demonstrates the innocuous nature of the substance. These findings are in accordance with what is written by Selivanova(40), that PRIMA-1 does not induce apoptosis in cells without mutations. This author reports that in the absence of the truncated protein in the nucleus, since the normal protein has an extremely short half-life, PRIMA-1 finds no locus for action and does not induce apoptosis.

In the first leg of the study, referring to the carcinogenesis with and without prior use of PRIMA-1, it was not possible to demonstrate a statistical difference. Findings are clearly demonstrated to be lower in severity, and there are a greater number of esophagi classified as normal epithelium in the group under PRIMA-1, but without attaining significance.

Although it is tempting to believe that the increase in size of the sample would make these findings statistically significant, the authors believe that this is not the case. Based on the positive findings published so far, the majority of the studies directly use PRIMA-1 on tumors or tumor cells and read the effects after a few days. In particular, in this leg of the study, the effect of an initial dose was studied with an interval of 5 months, an extended period in which any beneficial effect may have been reverted. In the initial study by Bykov(27), the animals inoculated with tumor cells in the subcutaneous tissue of the flank were re-evaluated in 2 months after the initial dose of the medication. The routes of administration were intra-tumor or intravenous. There was a statistically significant reduction in the tumor volume with both forms of administration, compared to the control group. In the study by Zache(32), the authors inoculated tumor cells intraperitoneally and evaluated the volume of ascites and the viability of tumor cells in the ascitic fluid. PRIMA-1 was administered by intravenous route and intraperitoneally, with reading of the effects after 21 days. There was a statistically significant difference between the two items.

In the second arm of this study, referring to the post-carcinogenesis tumor effect with or without prior use of PRIMA-1, there was a statistically significant difference between the two groups regarding the number of high and low grade lesions. It can be clearly seen that the use of PRIMA-1 reduced the number of high grade intraepithelial lesions and increased the number of cases in which no lesion was identified at all in the histology. In this group, the interval between administration of the substance and reading of the findings was 20 days.

Findings were different for the study conducted by Watanabe(41), where an experimental study was conducted, evaluating the response of bladder tumors. After the tumor inoculation, the animals were treated with curcumin, PRIMA-1, and a combination of both, with intravesical instillation. The isolated use of PRIMA-1 failed to achieve beneficial

effects when the percentage of necrosis and tumor size reduction were measured. On the other hand, the isolated use of curcumin showed a statistically significant positive effect.

TP53 is the gene most studied in esophageal tumors. Immuno-histochemistry is a good method for evaluating the expression of p53 as an indicator of mutations of the TP53 gene in esophageal epithelium tumors. Although the mutation of TP53 is detected more strongly in a high grade intraepithelial lesion than in low grade dysplasia (77% versus 29%, 0.01), the intranuclear accumulation of p53 revealed by immuno-histochemistry is detected in 85% of high grade lesions and in 71% of low grade lesions(25).

Our study showed that all the groups that received PRIMA-1 had more detectable immuno-histochemistry for p53 than the control groups. There is a close relationship between these findings and the use of the test substance. In a separate evaluation of each case, there is no presentation pattern between pathology and immuno-histochemistry. This shows that the substance used has an effect of stabilization, prolongation, and perpetration of protein p53, which is detected by the immuno-histochemistry. This does not translate into evolution to apoptosis, as this fact depends on the identification of irrecoverable, unexpected genetic mutations, for example, in Group II. This finding may be difficult to understand. Studies such as those by Bykov(42), Chen(43), and Brown(44) extensively reviewed the mechanisms by which PRIMA-1 activates the cascade of apoptosis by using the truncated p53 protein, produced by the mutated p53 gene, but there is no reference to immuno-histochemical detection of p53 in findings of normal histology and how much they might be directly attributable to the use of PRIMA-1.

The immuno-histochemical expression of Ki-67 has been useful in the evaluation of the cellular proliferation in tissues. Its expression is low in phases G1 and S of the cellular cycle, but reaches a very high level during the mitosis phase. Observing the immuno-

histochemical findings of Ki67 in the two legs of the study, it is noted that PRIMA-1 did not change the cellular proliferation.

Regarding the limitations of this study and prospects for new studies, the high cost of PRIMA-1 is reported, even when used in small animals like mice. This is a limiting factor with regard to the possibility of increased sample size, in addition to the restrictions of legislation that governs studies with laboratory animals. Another limitation was the negative results of the histopathological findings of the first leg of this study. One probable methodological liability was to believe that the substance would perpetuate its effect over 5 months of carcinogenesis. As a prospect, it could be tested in the future with monthly doses during the carcinogenesis, but again with severe caveats related to the cost. Another research prospect would be the direct use of PRIMA-1 through gavage both during carcinogenesis and in the retrogressive tumor development; a recent bibliographical survey of research databases turned up no publication in this sense. With regard to the aspect of immuno-histochemical expression, a research prospect would be measurement of p21, Cyclin D1, among others, mainly for cases with only PRIMA-1 without DEN (like group II of this study), to obtain pending answers with regard to the increase in p53 expression in cells with no carcinogenic process.

It is concluded that PRIMA-1 was associated with the reductive of histopathological severity in the esophageal of mice previously induced to carcinogenesis with diethylnitrosamine and increase of the immunohistochemical expression of protein p53.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893–917.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar;61(2):69–90.

3. Maranhão AGK, Vasconcelos AMN, Aly CMC, Neto D de LRN, Porto DL, Oliveira H de, et al. Como morrem os brasileiros: caracterização e distribuição geográfica dos óbitos no Brasil, 2000, 2005 e 2009. Saude Brasil 2010: uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde. 1st ed. Brasília - DF: Ministério da Saúde; 2011. pp. 51–78.
4. Silva APR, Noronha CP, Silva JL de OS, Ferreira JM de OF, Oliveira JFP, Santos M de OS, et al. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde; 2011. 122 p.
5. Brown LM, Devesa SS, Chow W-H. Incidence of adenocarcinoma of the esophagus among white Americans by sex, stage, and age. JNCI Journal of the National Cancer Institute. 2008 Aug 20;100(16):1184–7.
6. Cook MB, Chow W-H, Devesa SS. Oesophageal cancer incidence in the United States by race, sex, and histologic type, 1977-2005. Br J Cancer. 2009 Sep 1;101(5):855–9.
7. Bosetti C, Levi F, Ferlay J, Garavello W, Lucchini F, Bertuccio P, et al. Trends in oesophageal cancer incidence and mortality in Europe. Int J Cancer. 2008 Mar 1;122(5):1118–29.
8. Fagundes RB, de Carli D, Xaubet RV, Cantarelli JC Jr. Unchanging pattern of prevalence of esophageal cancer, overall and by histological subtype, in the endoscopy service of the main referral hospital in the central region of Rio Grande do Sul State, in Southern Brazil. Diseases of the Esophagus. 2015 May 13;:n/a–n/a.
9. WYNDER EL, BROSS IJ. A study of etiological factors in cancer of the esophagus. Cancer. 1961 Mar;14:389–413.
10. Palladino-Davis AG, Mendez BM, Fisichella PM, Davis CS. Dietary habits and esophageal cancer. Dis Esophagus. 2013 Jun 24.
11. Jakszyn P, Gonzalez C-A. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. World J Gastroenterol. 2006 Jul 21;12(27):4296–303.
12. Mani H, Zander DS. Immunohistochemistry: applications to the evaluation of lung and pleural neoplasms: part 1. Chest. 2012 Nov;142(5):1316–23.
13. Wiseman M. The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Proc Nutr Soc. 2008 Aug;67(3):253–6.
14. Hamilton SR, Aaltonen LA, World Health Organization. WHO classification of tumors. Pathology and genetics. Tumours of the digestive system. Lyon: IARC. 2000.
15. Luch A. Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. Nat Rev Cancer. 2005 Feb;5(2):113–25.
16. Rubio CA, Liu FS, Chejfec G, Sveander M. The induction of esophageal tumors in mice: dose and time dependency. In Vivo. 1987 Jan;1(1):35–8.
17. Gurski R, Schirmer C, Krueel C. Induction of esophageal carcinogenesis by diethylnitrosamine and assessment of the promoting effect of ethanol and N-nitrosornicotine: experimental model in mice. Diseases of the Esophagus. 1999;12:99–105.
18. Sallet JA, Zilberstein B, Andreollo NA, Eshkenazy R, Pajecki D. Experimental esophageal carcinogenesis: technical standardization and results. Dis Esophagus. 2002;15(4):278–81.

19. Velho AV, Hartmann AAB, Kruehl CDP. Effect of black tea in diethylnitrosamine-induced esophageal carcinogenesis in mice. *Acta Cir Bras*. 2008 Jul 1;23(4):329–36.
20. Castro Junior MAM, Kruehl CDP, Meurer L, Castro AP, Zimmermann BS. Experimental model of esophageal carcinogenesis. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias*. SciELO Brasil; 2007;34(3):153–6.
21. de Castro Junior MAM, Kruehl CDP, Meurer L, de Castro AP. [Immunohistochemical expression of P53 and Ki-67 in diethylnitrosamine-induced carcinomas esophageal: experimental model]. *Rev Col Bras Cir*. 2010 Apr;37(2):128–34.
22. Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *J Pathol*. 2012 Jan;226(2):352–64.
23. Olivier M, Hussain SP, Caron de Fromentel C, Hainaut P, Harris CC. TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. *IARC Sci Publ*. 2004; (157):247–70.
24. Fagundes RB, Mello CR, Tollens P, Pütten AC, Wagner MB, Moreira LF, et al. p53 protein in esophageal mucosa of individuals at high risk of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esophagus*. 2001;14(3-4):185–90.
25. Chava S, Mohan V, Shetty P, Manolla M, Vaidya S, Khan I, et al. Immunohistochemical evaluation of p53, FHIT, and IGF2 gene expression in esophageal cancer. *Dis Esophagus*. Wiley Online Library; 2011.
26. Zuckerman V, Wolyniec K, Sionov RV, Haupt S, Haupt Y. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J Pathol*. 2009 Sep;219(1):3–15.
27. Bykov VJN, Issaeva N, Shilov A, Hultcrantz M, Pugacheva E, Chumakov P, et al. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med*. 2002 Mar;8(3):282–8.
28. Messina RL, Sanfilippo M, Vella V, Pandini G, Vigneri P, Nicolosi ML, et al. Reactivation of p53 mutants by p53 reactivation and induction of massive apoptosis in thyroid cancer cells. *Int J Cancer*. 2012 May 15;130(10):2259–70.
29. Saha T, Kar RK, Sa G. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. Progress in Biophysics and Molecular Biology. Elsevier Ltd; 2015 Mar 1;117(2-3):250–63.
30. Izetti P, Hautefeuille A, Abujamra AL, de Farias CB, Giacomazzi J, Alemar B, et al. PRIMA-1, a mutant p53 reactivator, induces apoptosis and enhances chemotherapeutic cytotoxicity in pancreatic cancer cell lines. *Invest New Drugs*. 2014 May 20;32(5):783–94.
31. Piantino CB, Reis ST, Viana NI, Silva IA, Morais DR, Antunes AA, et al. Prima-1 induces apoptosis in bladder cancer cell lines by activating p53. *Clinics*. 2013 Mar 31;68(3):297–303.
32. Zache N, Lambert JMR, Wiman KG, Bykov VJN. PRIMA-1MET inhibits growth of mouse tumors carrying mutant p53. *Cell Oncol*. 2008;30(5):411–8.
33. Lambert JMR, Gorzov P, Veprintsev DB, Söderqvist M, Segerback D, Bergman J, et al. PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell*. 2009 May 5;15(5):376–88.
34. Wang T, Lee K, Rehman A, Daoud SS. PRIMA-1 induces apoptosis by inhibiting JNK signaling but promoting the activation of Bax. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007 Jan 5;352(1):203–12.



35. Shi H, Lambert JMR, Hautefeuille A, Bykov VJN, Wiman KG, Hainaut P, et al. In vitro and in vivo cytotoxic effects of PRIMA-1 on hepatocellular carcinoma cells expressing mutant p53ser249. *Carcinogenesis*. 2008 Jul;29(7):1428–34.
36. Herlin P. [How to evaluate Ki67]. *Ann Pathol*. 2011 Nov;31(5 Suppl):S49–51.
37. Mertani HC, Belin S, Diaz J-J. [Ki67, nucleolus and cancer]. *Ann Pathol*. 2011 Nov;31(5 Suppl):S46–8.
38. Albus U. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edn)*. Laboratory Animals. 2012.
39. Sallet JA, Andreollo NA, Venco FE, Brandalise NA, Leonardi LS. Carcinoma epidermóide de esôfago induzido pela dietilnitrosamina (DEN). *Acta Cir Bras*. 1996;11(3):138–43.
40. Selivanova G, Wiman KG. Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene*. 2007 Apr 2;26(15):2243–54.
41. Watanabe FT, Chade DC, Reis ST, Piantino C, Dall'Oglio MF, Srougi M, et al. Curcumin, but not Prima-1, decreased tumor cell proliferation in the syngeneic murine orthotopic bladder tumor model. *Clinics*. *SciELO Brasil*; 2011;66(12):2121–4.
42. Bykov VJN, Lambert JMR, Hainaut P, Wiman KG. Mutant p53 rescue and modulation of p53 redox state. *Cell Cycle*. 2009 Aug 15;8(16):2509–17.
43. Chen F, Wang W, El-Deiry WS. Current strategies to target p53 in cancer. *Biochemical Pharmacology*. 2010 Sep 1;80(5):724–30.
44. Brown CJ, Lain S, Verma CS, Fersht AR, Lane DP. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nature Publishing Group*. 2009 Dec;9(12):862–73.