

PATOGENESIS MOLECULAR DEL CARCINOMA DE ESOFAGO

ALEJANDRA M. GIMENEZ¹, SILVIA B. COPELLI¹, ALFREDO H. SPERONI², ROBERTO P. MEISS¹¹Departamento de Patología y ²Servicio de Gastroenterología, Instituto de Estudios Oncológicos Fundación Maissa, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Resumen El carcinoma de esófago existe en dos formas principales: el carcinoma de células escamosas o pavimentoso y el adenocarcinoma. En este artículo se describen las principales alteraciones genéticas halladas en ambos tipos de carcinomas y la implicancia de éstas en la patogénesis de los mismos. La secuencia de estas alteraciones se correlaciona con la histogénesis, lo que permite comprender la progresión tumoral desde el epitelio normal al carcinoma invasor. Se establece también una comparación entre la patogénesis molecular del cáncer de esófago y del desarrollo de estos carcinomas con el modelo de la patogénesis molecular del cáncer colorrectal.

Palabras claves: carcinoma escamoso, adenocarcinoma, esófago, secuencia molecular

Abstract *Molecular pathogenesis of carcinoma of the esophagus.* Carcinoma of the esophagus is present in two distinct morphological cell types: squamous or pavementous cell carcinoma and adenocarcinoma. In this article, the main genetic alterations found in both types of carcinomas and their implications are described. The sequence of these alterations is related to histogenesis, making it possible to understand tumor progression from normal epithelium to invasive carcinoma. A comparison is attempted between the molecular development of esophagus carcinomas and that of colorectal carcinoma.

Key words: squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, esophagus, molecular sequence.

El cáncer de esófago es la 6^a causa de muerte por cáncer a nivel mundial ocupando el 8^o lugar en incidencia, con una distribución geográfica muy heterogénea^{1,2}. Sus tasas de incidencia y mortalidad varían considerablemente no solo entre diferentes áreas geográficas sino también entre poblaciones de un mismo país^{1,2}. El 80% de las muertes por cáncer de esófago ocurren en países en vías de desarrollo².

Las hipótesis sobre el origen de los carcinomas esofágicos se sustentan en evidencias epidemiológicas, clínicas y morfológicas. Se han identificado áreas de alto riesgo en distintas partes del mundo¹. Los factores de riesgo varían según las regiones geográficas, los hábitos de las poblaciones estudiadas y el tipo histológico del carcinoma desarrollado. El tipo histológico más frecuente de carcinoma corresponde, en todo el mundo, al de células escamosas o pavimentoso seguido por el adenocarcinoma¹.

El carcinoma escamoso se relaciona con el consumo de alcohol y tabaco en las poblaciones occidentales y con la ingesta de alimentos enmohecidos, vegetales salados, carnes asadas e infusiones calientes, sumado al consumo de alcohol y tabaco, en las poblaciones de otras áreas geográficas^{3,4}. El adenocarcinoma está asociado a la obesidad con desarrollo de enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), especialmente en individuos caucásicos de países desarrollados³.

Histogénesis del carcinoma

Del epitelio normal al carcinoma

La morfología de los epitelios en su transformación carcinomatosa sigue una postulada secuencia desde el epitelio normal al carcinoma invasor, reconociéndose una secuencia epitelio normal-displasia-carcinoma⁵.

En forma sintética, la histogénesis del carcinoma de esófago y de las lesiones precursoras (Fig. 1) muestra que todas estas lesiones se desarrollan a partir de un epitelio pavimentoso estratificado no queratinizado que normalmente tapiza el esófago y que presenta en la submucosa glándulas que se abren a la luz por conductos tapizados por células cilíndricas cuboides⁶.

Recibido: 28-VIII-2002

Aceptado: 8-I-2003

Dirección postal: Dr. Roberto Meiss, Instituto de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina, Pacheco de Melo 3081, 1425 Buenos Aires, Argentina.

FAX: (54 - 11) 4805-0712

e - mail : meiss@ house.com.ar

Influencia genética

- *género masculino
- *raza negra/asiática

Influencias ambientales

- *tabaco
- *infección por *Helicobacter pylori* ?
- *carcinógenos de la dieta
- *alcohol
- *infusiones / temperaturas

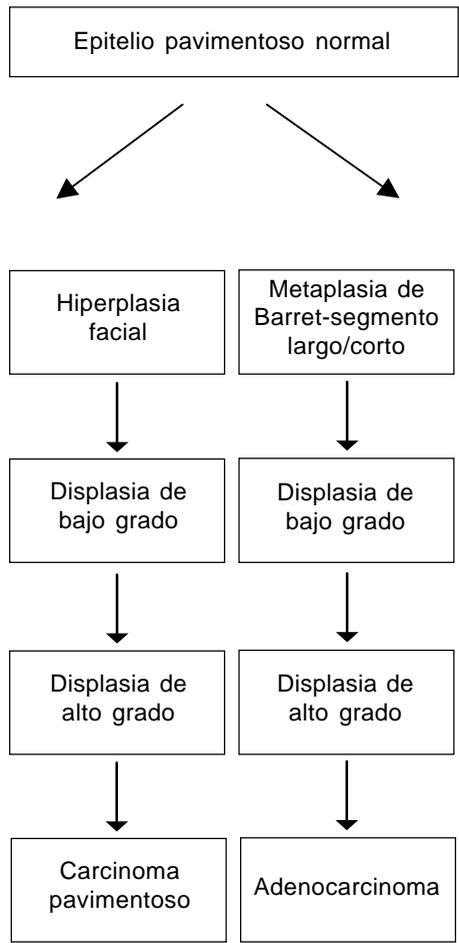
- *mutaciones en p53

- *inestabilidad genética
- *pérdida de heterocigocidad en cromosomas 3p,17p
- *G@ T transversiones en gen p53
- *no se observan mutaciones en p16,ciclina D1.
- *no hay LOH APC

- *No hay aumento de expresión de p63
- *no se observa fosforilación de las cateninas

- *amplificación/sobreexpresión de ciclina D1 y EGFR vía TGF β -SMAD
- *aumento de COX2
- *mutaciones en p16
- *ausencia de mutaciones en K-ras

- *ausencia de mutaciones en p73
- *ausencia LOH de p73 en polimorfismo AT/GC
- *pérdidas alélicas múltiples en cromosomas 3p,5q,9p,9q,13q,17p, 17q y 18q.



Influencia genética

- *género masculino
- *raza caucásica
- *posible herencia familiar

Influencias ambientales

- *reflujo gastroesofágico
- *inflamación
- *AINEs,quimio y radioterapia

- *células detenidas en G2
- *aumento de COX2

- *aumento % células en S
- *mutaciones en p53,p16 y ciclina D
- * LOH APC

- *IMS
- *fosforilación de cateninas
- *aumento expresión de p63

- *no se observa amplificación/ sobreexpresión de ciclina D1 y de EGFR vía TGF β -SMAD
- *no se observan pérdidas alélicas múltiples en cromosomas

- *LOH de p73 en polimorfismo AT/GC
- *falta unión APC-catenina-e cadenina
- menor adhesividad célula-célula
- metástasis

Fig 1.- Evolución histológica y molecular de la secuencia epitelio pavimentoso-displasia-carcinoma pavimentoso / adenocarcinoma en esófago

Formas de reacción del epitelio pavimentoso

Cuando el epitelio pavimentoso esofágico es sometido a procesos de irritación crónica ya sean de origen químico, físico o biológico, éste desarrolla formas de respuesta reactivas. Por un lado puede producirse una "hiperplasia de células de reserva", definida como una hiperplasia de la zona basal del epitelio pavimentoso. Este cambio se halla normalmente presente en los 3 a 5 cm distales de un esófago adulto⁷.

Otra forma de reacción del epitelio pavimentoso esofágico ante una irritación crónica como la producida por la ERGE es el desarrollo del denominado esófago de Barrett (EB), ésta es una condición adquirida en donde el esófago, por encima del esfínter inferior, se encuen-

tra tapizado por un epitelio cilíndrico glandular metaplásico que semeja al epitelio gástrico e intestinal, en una extensión variable, lo que permite distinguir un EB de "segmento corto" y otro de "segmento largo" con implicancias en cuanto a su potencial de transformación maligna⁸.

El mecanismo de reemplazo por epitelio metaplásico es aún controvertido; se cree que luego de la erosión del epitelio pavimentoso normal, células indiferenciadas troncales multipotenciales migrarían de los conductos de las glándulas submucosas a las zonas demudadas⁹.

Hay un espectro de patrones epiteliales que incluyen: epitelio tipo cilíndrico especializado, considerado como una forma de metaplasia intestinal incompleta, tipo gástrico fúndico y un tipo de la unión que semeja al epitelio del

cardias gástrico. El término "epitelio cilíndrico especializado" fue introducido para áreas con superficie vellosiforme formadas por una mezcla de células cilíndricas mucosas gástricas e intestinales, siendo éste el tipo epitelial más característico y el más frecuentemente hallado⁸.

De la "hiperplasia basal" al carcinoma pavimentoso

Entre el epitelio hiperplásico y el carcinoma pavimentoso invasor se puede observar un espectro continuo de lesiones de carácter preneoplásico⁵⁻⁷. Estas lesiones se tienden a agrupar, desde un punto de vista diagnóstico, terapéutico y pronóstico, bajo la denominación de "displasias de bajo y alto grado de malignidad" correspondiendo el "alto grado" de malignidad a las formas intensas de displasia y al llamado carcinoma *in situ* (CIS) o "neoplasia intraepitelial esofágica" (NIE)⁵⁻¹⁰.

Las displasias y la NIE del epitelio pavimentoso pueden presentarse como lesiones únicas de la mucosa esofágica no asociadas a carcinomas invasores; más frecuentemente representan el componente periférico, y posiblemente preexistente, de un carcinoma invasor¹⁰. Cuanto más severo es el grado de displasia más estrecha es la relación o contigüidad con la NIE; sin embargo la mayoría de las lesiones displásicas aparecen sin contigüidad con una NIE y la propia NIE solo tiene un bajo porcentaje de contigüidad con displasias lo que, morfológicamente, sugeriría la posibilidad de una carcinogénesis *de novo*⁵.

En cuanto a la NIE contigua al cáncer invasor está presente en casi un 30 a un 95% de los casos¹⁰; este amplio rango de contigüidad obedece a que, cuanto menos infiltrante el carcinoma principal, mayor presencia de NIE en la mucosa adyacente^{10, 11}.

El carcinoma de células escamosas invasor de esófago presenta formas iniciales que se definen según la profundidad de las estructuras histológicas normales infiltradas: así existen formas "intramucosa", "superficial" o "microinvasora" y "diseminativa superficial". Estas lesiones superficiales presentan una alta incidencia de multicentricidad¹².

Existen lesiones clasificadas como carcinomas esofágicos sincrónicos (CES), independientes del carcinoma invasor principal y que se detectan en casi un tercio de los casos, asociadas, principalmente, a lesiones superficiales (NIE y carcinoma microinvasor). En casi un 60% de los casos se ven imágenes de displasia en sitios independientes del CES y el carcinoma invasor principal; esta alta prevalencia en pacientes con carcinomas invasores principales sustenta el concepto que considera a toda la mucosa esofágica como una entidad única para la "teoría de campo" en la génesis de los carcinomas¹¹.

Histológicamente las formas de carcinoma pavimentoso avanzadas suelen ser de moderada a pobremente

diferenciadas con extensión, en general, a ganglios regionales y estructuras vecinas al momento del diagnóstico inicial.

Desde el esófago de Barrett al adenocarcinoma

Desde un punto de vista histogenético, la asociación entre "esófago de Barrett" y carcinoma sustenta la secuencia: metaplasia-displasia del epitelio cilíndrico- adenocarcinoma¹³. La mucosa de tipo especializado o intestinal aparece como la de más alto riesgo de transformación y donde se desarrollan la mayoría de las displasias¹³. El diagnóstico de displasia en el EB se realiza siguiendo criterios similares a aquellos usados en epitelios glandulares, reconociéndose displasias de bajo y alto grado de malignidad, así como la existencia del adenocarcinoma *in situ*¹⁴.

El EB predispone al desarrollo de un adenocarcinoma. Este riesgo es elevado en especial para la displasia de alto grado¹⁵. La incidencia del EB ha ido aumentando y consecuentemente la del adenocarcinoma de esófago originado en el EB, siendo el cáncer que más se ha incrementado en las dos últimas décadas. Se estima que los pacientes con EB tienen hasta 30 y 40 veces incrementado el riesgo de desarrollar un adenocarcinoma con respecto a la población normal¹⁶.

El adenocarcinoma desarrollado en el esófago de Barrett puede ser múltiple y tiene los mismos caracteres morfológicos de los tumores gástricos e intestinales, con tendencia a ser multifocales y con un amplio rango de diferenciación. Generalmente está acompañado por un espectro multifocal de cambios premalignos que incluye: hiperplasia mucosa, grados variable de displasia epitelial y adenocarcinoma *in situ*¹⁷.

Patogénesis molecular del carcinoma

De los genes involucrados en la patogénesis de los carcinomas de esófago se pueden distinguir dos grandes grupos: los involucrados en la regulación del ciclo celular y aquellos involucrados en la reparación del ADN (Tabla 1).

1. Genes involucrados en la regulación del ciclo celular

El control del ciclo celular consiste en controles positivos y negativos basados en dos familias claves de proteínas, por un lado las ciclinas y kinasas ciclina dependientes (CDK), y por otro las INK (inhibidores específicos de las kinasas ciclina dependientes) y otros reguladores negativos como el gen RB y p53¹⁸.

Asimismo, los genes regulatorios más involucrados en las preneoplasias y neoplasias de esófago son: p53,

TABLA 1.- Genes involucrados en la patogénesis de los carcinomas de esófago

I. Genes involucrados en la regulación del ciclo celular

1. Reguladores positivos
 - Genes que codifican para las ciclinas.
 - Genes que codifican para CDKs (quinasas ciclina dependientes).
2. Reguladores negativos
 - Genes que codifican para INKs (inhibidores específicos de las quinasas ciclina dependientes).
 - Familia de genes p53: p53, p63 y p73.
 - Genes para el complejo APC-beta catenina.
 - Genes para la vía TGF beta - SMAD.
 - Gen K-ras.
 - Gen COX-2.

II. Genes involucrados en la reparación del ADN

- Genes hMSH y hMLH.
- Microsatélites

APC/*b*-cateninas, los genes de factores de crecimiento que incluyen a la vía TGF β -SMAD, los genes K-ras y COX-2. Todos ellos serán analizados posteriormente con más detalle.

1. Reguladores positivos de la división celular

Genes que codifican para las ciclinas y para CDKs (quinasas ciclina dependientes)

Ellos son las ciclinas y las quinasas ciclina dependientes (CDK), de las que existen varias formas de ambos tipos de proteínas. Las ciclinas se inactivan en cada ciclo celular y existen 5 clases de ciclinas: A, B, C, D, y E. Estas ciclinas regulan el ciclo celular actuando en diferentes momentos del mismo; por lo tanto podemos distinguir las ciclinas G1, S, y ciclinas mitóticas¹⁹.

Las ciclinas G1 actúan en la etapa G1 del ciclo celular, hasta el límite G1-S. Ellas son 3 ciclinas de tipo D (D1-D2 y D3) y una ciclina E, que se expresan en distintos tejidos. Son moduladas por factores de crecimiento (GFs-*Growth Factors*) exógenos, TGF- β , por ejemplo. Las ciclinas D para ser activas deben unirse a CDK-4 y CDK-6 y dependen de la estimulación mitogénica. En ausencia de estímulo mitogénico cesa la síntesis de ciclinas que por ser proteínas lábiles, determina que las células salgan rápidamente del ciclo celular. La unión de las ciclinas con las CDK respectivas forma un complejo proteico funcional. Estas proteínas en forma individual son inactivas.

Desde el punto de vista génico, lo más observado en patologías neoplásicas de esófago son las alteraciones en el gen que codifica para la ciclina D y que está codificada por el gen CCND1 en el cromosoma 11q13. Su alteración actuaría en la síntesis proteica durante G1,

en la inestabilidad genómica y en la estabilización y /o sobreproducción de células tumorales. Asimismo, se ha detectado una sobreexpresión de la ciclina D1 y una amplificación con sobreexpresión en el carcinoma escamoso de esófago, razón por la cual se sugiere que esta ciclina juega un rol importante en la proliferación celular anómala²⁰.

2. Reguladores negativos del ciclo celular

Genes que codifican para INKs (inhibidores específicos de las quinasas ciclina dependientes)

Son los polipéptidos inhibidores específicos de las CDK4 y CDK6. Estas proteínas se denominan INK4 (inhibidoras de quinasas); dentro de este grupo se encuentran las proteínas p15, p16, p18 y p19, que bloquean la actividad de las CDK y producen la detención del ciclo celular en la fase G1. Asimismo, se ha observado que la proteína RB es el mayor regulador negativo que reprime la expresión genética mediada por una familia de reguladores transcripcionales heterodiméricos (E2Fs) que transactivan genes importantes para la entrada en S de la interfase celular. Boyton *et al.* han observado una frecuente pérdida de heterocigocidad en el *locus* para el gen RB en el cáncer de esófago humano²¹.

Las CDK (relacionadas con las ciclinas D, E y A) son también reguladas negativamente por una familia de inhibidores que incluye 3 proteínas: p21, p27 y p57. Se ha observado que la proteína p53 induce la expresión del gen C1P1 que codifica a p21 y este evento podría vincularse con el desarrollo de cáncer porque a su vez provocaría una detención en G1 inhibiendo a las CDK.

La INK4 más estudiada en neoplasias de esófago es la INK4a también llamada p16 y que está codificada por el gen CDKN2. Se ha identificado una alta frecuencia de pérdida de la expresión de p16, por delección en homocigosis dentro del tejido tumoral, en carcinomas de células escamosas de esófago. La pérdida de la expresión de P16 es un hecho infrecuente en los adenocarcinomas; cuando esto sucede implicaría una menor sobrevida²². Por el contrario, cuando hay una sobreexpresión de p16 (detectada por métodos inmunohistoquímicos) en carcinomas de células escamosas de esófago, se observa un aumento en la sobrevida de los pacientes²³. Esto último podría estar relacionado con la acción de p16, ya que la misma colabora junto a p53 en la detención del ciclo celular y en la apoptosis de las células anómalas²³.

Wong *et al.* han informado que la mayoría de los pacientes con metaplasia de Barrett presentan mutaciones puntuales en el gen CDKN2, o que el mismo sufre una pérdida de heterocigocidad o una hipermetilación²⁴. La presencia de estas lesiones génicas en p16 permitirían que las células del tejido metaplásico sufran una expan-

sión clonal, creando así un entorno adecuado donde puedan aparecer otras anomalías en otros genes que lleven al estadio de adenocarcinoma esofágico.

Familia de genes p53

Gen p53

La proteína p53 es el regulador del ciclo celular que con más frecuencia se halla involucrado en el desarrollo del cáncer debido a que se han detectado, por un lado, alteraciones en el gen que codifica a esta proteína y, por otro, se ha observado sobreexpresión de la misma.

En algunos tipos celulares p53 induce apoptosis cuando es sobreexpresada y su presencia es necesaria en respuesta a serios daños al ADN inducidos por radiación y quimioterapia. El desarrollo de este programa celular no depende de p21, ya que p53 puede activar directamente genes suicidas como el BAX (*bcl2-associated X protein*) o disminuir la expresión de genes de supervivencia como BCL-2 y por lo tanto producir la detención en G1 y la apoptosis²⁵.

El gen está localizado en el cromosoma 17p13.1. La proteína p53 codificada por este gen es una proteína de unión al ADN (*DNA binding-protein*). La proteína p53 normalmente forma oligómeros y es sumamente inestable²⁶. Se ha propuesto un modelo en el cual p53 se une al ADN como tetrámero y activa la expresión de genes que inhiben el crecimiento o la invasión. Presenta cinco regiones conservadas y tres dominios terminales: a) de transactivación, b) de unión al ADN y c) de tetramerización²⁶.

Otra manera de actuar de la proteína p53 es a través de un inhibidor universal de todas las CDK, llamada proteína p21. Cuando p53 inhibe el ciclo celular, hay apoptosis o muerte programada. La actividad supresora de p53 impide a las células con daño en el ADN progresar durante la fase G1 a S, en la cual se procedería a la reparación del ADN dañado. De este modo, se evitaría la propagación de células con mutaciones génicas. A diferencia de la proteína p53 normal que presenta una vida media muy corta (20 a 35 minutos) con un bajo nivel celular, lo que impide su detección por métodos inmunohistoquímicos, la proteína mutada presenta aumento de la estabilidad y prolongación de su vida media (llegando a horas) lo que permite su acumulación nuclear.

Con respecto a la función génica se han descrito varios mecanismos para la inactivación del gen p53: a) la delección de uno o ambos alelos de p53 reduce la expresión de los tetrámeros resultando en una disminución de la expresión de los genes que inhiben el crecimiento y/o la invasión, hecho que se observa en algunos tumores; b) mutaciones sin sentido o en los sitios de *splicing* (empalme) lo que da como resultado una proteína trun-

cada que no permite la oligomerización, resultando en la disminución de la formación de los tetrámeros de p53; las mutaciones de este tipo son muy comunes en cáncer de esófago y pulmón; c) mutaciones *missense* que originan una gran disminución en la formación de tetrámeros activos; estas mutaciones se observan con frecuencia en tumores de colon, cerebro, pulmón, mama, piel y vejiga, y d) el camino de p53 también puede ser interrumpido por alteración del gen MDM2 (*the human homologue of the murine double minute 2*); se ha visto que la expresión de este gen está amplificada en los sarcomas humanos, y el aumento de la expresión de MDM2 es probable que interfiera con la actividad de p53.

Otra proteína capaz de unirse a p53 formando complejos es la JNK (*Jun -N (amino)-terminal kinase*). Fuchs *et al.* observaron que los complejos JNK-p53 se detectan en la fase G0/G1 y MDM2-p53 se detectan en S/G2-M, es decir, estos complejos se detectan en momentos diferentes del ciclo celular²⁷.

Las mutaciones en p53, se suelen encontrar en el 35 al 80% de los cánceres de esófago y se localizan fundamentalmente en los exones 5 al 8 dentro del dominio de unión al ADN²⁸. Marin *et al.* encontraron que, en determinadas líneas celulares, algunos mutantes de p53 podían unirse e inactivar a p73 pero dependían del polimorfismo del codón 72 presente en el exón 4 de p53; el mismo puede codificar para arginina o prolina. Si codifica para arginina, p53 es capaz de unirse a p73 y así neutralizar a la apoptosis y transformar a las células en cooperación con el oncogen EJ-Ras (oncogen ras detectado en una línea celular "EJ" heteroploide de carcinoma de vejiga)²⁹.

Blount *et al.* demostraron que la pérdida de heterocigocidad en p53 origina una sobreexpresión de p53 en el adenocarcinoma de esófago²⁸.

En la patogénesis del carcinoma de esófago, las mutaciones puntuales en diferentes genes se originan típicamente durante la conversión de una displasia a un adenocarcinoma invasor. Existen en la actualidad bases de datos de todas las mutaciones conocidas detectadas en el gen p53, en las que se hacen correlaciones fenotipo-genotipo que incluyen al cáncer de esófago³⁰.

Genes p63 y p73

Como ha sido comentado, el gen p53 es el gen más frecuentemente mutado en cáncer y juega un importante rol en mantener la integridad del genoma. Se han identificado dos genes homólogos, el p63 y el p73, lo que revela que p53 es miembro de una familia de genes cuya función es la regulación de otros genes a nivel de regiones promotoras, ya que sus estructuras tienen una alta homología con factores de transcripción (se considera que forman parte de una superfamilia de factores regulatorios de la transcripción). Debido a que compar-

ten un 63% de sus secuencias de aminoácidos en el dominio de unión al ADN, p53, p63 y p73 deberían compartir funciones redundantes en la regulación de la expresión génica³¹.

Asimismo, p73 también puede activar a los mismos genes que regula p53, es decir suprimir el crecimiento e inducir apoptosis. Otro hecho observado fue que tanto p53 como p63 son inducidos por el daño del ADN, aunque por diferentes mecanismos. Otras evidencias sugieren que p63 y p73 son importantes para la regulación del desarrollo normal durante la embriogénesis debido a que las proteínas codificadas por ambos genes presentan en común una región C terminal muy extensa ausente en p53, la cual puede ser cortada y empalmada durante la síntesis de su ARNm. Dentro de esta región C-terminal existe un motivo proteico de unión al ADN de tipo SAM (*sterile alpha motif*) previamente encontrado en otras proteínas que regulan el desarrollo³¹.

El gen p63

Este gen está altamente expresado en las capas basales de tejidos epiteliales de la epidermis, cérvix, útero y próstata, y en las superficies epidérmicas de los miembros, en los arcos branquiales y en los apéndices epidérmicos que están bajo la señalización recíproca del patrón de diseño morfogénico del mesodermo³². Augustin *et al.* han mapeado a p63 en el cromosoma 3q27³³.

Este gen codifica múltiples isotipos con divergentes capacidades para transactivar genes blancos de p53 e inducir apoptosis. Está constituido por 15 exones y codifica una proteína de 448 aa. Las isoformas de p63 son debidas a la presencia de promotores alternativos en los exones 1 y 3 y a *splicing* alternativos en la región 3'. Estas variedades truncadas de p63 pueden regular negativamente a la transactivación por p53 y p63. De esta manera, se sugiere la posibilidad de interacciones fisiológicas entre miembros de la familia p53³².

Recientemente, Flores *et al.* demostraron que la pérdida combinada de p63 y p73 da como resultado una falla de las células que contienen un gen p53 funcional a sufrir apoptosis en respuesta al daño del ADN³⁴.

En relación a p63, en estudios recientes sobre la secuencia metaplasia de Barrett -displasia-adenocarcinoma de esófago se ha observado que existe una exacta concordancia entre la expresión de p53 y p63 en las formas más avanzadas de neoplasia (displasia de alto grado y adenocarcinoma invasor) mientras que isoformas de p63, como por ejemplo Delta Np63alfa, y no p53, fueron detectadas en el compartimento no proliferativo del epitelio escamoso de esófago y en epitelio glandular meta-plásico no neoplásico. Las implicancias de estos hallazgos no son aún comprendidas en su totalidad³⁵.

El gen p73

Este gen se encuentra localizado en 1p36 que comúnmente está delecionado en los neuroblastomas, y se cree que podría codificar un gen supresor del neuroblastoma. Como las mutaciones en p53 son muy raras en estos tumores, se hipotetiza que p73 actuaría en forma semejante a p53 en las células precursoras que originan los neuroblastomas, consecuentemente podría ser que p73, más que p53, estuviera inactivado en estos tumores³⁶.

Al estudiar el rol de p73 en la malignización no se puede reconocer claramente su función. En algunos aspectos parece actuar como antioncogén y en otros como oncogén aunque la importancia del mismo en la malignización es cuestionable. La sobreexpresión de p73 puede activar a los genes que normalmente responden a p53 pero esta sobreexpresión no siempre es debida a mutaciones en el gen. Por otro lado, se ha observado que la inducción de la apoptosis por niveles aumentados de p73 puede ser bloqueada por proteínas p53 mutantes e isoformas de p73 truncadas a nivel N-terminal, a las cuales recientemente se les atribuyó acciones oncogénicas, por ejemplo Delta Np73³⁷.

Nimura *et al.* analizaron al gen p73 en 48 pacientes con carcinoma de esófago por PCR/SSCP y no hallaron mutaciones³⁸.

Por otra parte, se ha observado en el gen p73 un polimorfismo en la región no codificante que puede ser AT o GC y se observó en pacientes con carcinoma de esófago la presencia de homocigotas AT/AT que parecen estar protegidos contra el desarrollo del cáncer de esófago. Clínicamente, esta observación podría tener implicaciones en la identificación de pacientes de alto riesgo que presenten metaplasia de Barrett. Por otra parte, el 37.8% de los pacientes con cáncer de esófago analizados que eran heterocigotas AT/CG presentaron pérdida de heterocigocidad en el *locus* 1p36 donde está localizado el gen p73³⁹.

Genes para el complejo APC-beta-cateninas

El APC (*adenomatous poliposis coli*) es un gen supresor de tumores o antioncogen, que controla la entrada de la célula en G1 y la cantidad de células que están en división mitótica. Este gen codifica para una proteína que se asocia a las a y b cateninas, las cuales son proteínas de unión celular que se adhieren a la molécula e-cadherina⁴⁰.

El complejo APC-catenina regula también la adhesión célula-célula. Cuando este complejo no es capaz de unirse a la proteína e-cadherina, mediadora de la adhesión, es cuando se pierde la adhesión celular, situación esta que puede llevar a la producción de metástasis⁴¹.

El producto del gen APC es una larga proteína con dominios funcionales múltiples y que interactúan por

oligomerización y unión con las proteínas intercelulares que incluye a: β -cateninas, γ -cateninas, kinasa glucógeno sintetasa (GSK-3 β), axina, tubulina, y hDLG (*human homologue of the drosophila letal discs-1 tumor suppressor*).

Cuando la proteína APC está truncada no puede formar complejo con las β -cateninas, aumentando de esta manera los niveles citoplasmáticos de β -catenina libre. Este aumento en el esófago de Barrett podría activar a genes encargados de la transformación celular, cumpliendo un rol esencial en la tumorigénesis temprana⁴¹. En el esófago de Barrett sin displasia no se observa pérdida de heterocigocidad (LOH) o pérdida de un alelo pero, en presencia de una displasia y en estadios más avanzados como el adenocarcinoma, comienza a detectarse con mayor frecuencia la pérdida de heterocigocidad. Asimismo, esta LOH aparece con la misma frecuencia en displasias y adenocarcinomas, tanto si la metaplasia de Barrett se originó en un segmento corto como en un segmento largo del esófago⁴². Por otra parte, se ha detectado una muy baja frecuencia de mutaciones puntuales del gen APC en los adenocarcinomas de esófago⁴³. Un fenómeno epigenético observado habitualmente en la progresión metaplasia-displasia-adenocarcinoma es la hipermetilación del gen APC que quizás provocaría una expansión clonal de las células en la metaplasia⁴⁴. Sin embargo, la ausencia de alteraciones genéticas en el esófago de Barrett y en el epitelio con displasia de bajo grado sugieren que las mutaciones en los genes APC, e-cadherinas y α y β cateninas, se desarrollan en forma tardía en la progresión de la metaplasia a adenocarcinoma⁴³. La desregulación del ciclo celular y de la adhesión intercelular podría ser debida a la disminución de la expresión de las cadenas y al aumento de la fosforilación de las cateninas, como ha sido observado en la secuencia metaplasia de Barrett- displasia-adenocarcinoma a partir de una displasia de alto grado de esófago⁴⁵.

Genes para la vía TGF beta-SMAD

Además de los factores de crecimiento con regulación positiva y negativa en el crecimiento tumoral, existen otras vías que pueden suprimir el crecimiento celular, tales como los factores de crecimiento de la vía TGF β -SMAD. (TGF: *transforming growth factor*-SMAD: *Small Body Size Protein C* of *C. elegans* and *Mother Against Decapentaplegic protein* of *Drosophila*).

La superfamilia de los factores de crecimiento tumoral (TGF) consiste en subgrupos de proteínas, las cuales tienen diferentes isoformas. TGF- α produce efectos mitogénicos a través de la interacción con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y promueve el crecimiento de células de cáncer de esófago en cultivo,

de una manera autócrina⁴⁶. TGF- β 1 es el miembro más abundante de esta superfamilia. Inhibe el crecimiento de las células epiteliales pero estimula la proliferación de células del mesénquima y la migración celular⁴⁷. TGF- β y otros miembros de la superfamilia que median la misma variedad de efectos biológicos, tienen la característica de ser potentes inhibidores de la proliferación. TGF- β inicia un amplio espectro de respuestas celulares cuando se une al receptor TGF- β RII. El TGF- β está entre los factores de crecimiento implicados casi universalmente con la supresión del crecimiento del tumor⁴⁷. La interacción del TGF- β con su receptor normalmente da lugar a un aumento de reguladores negativos del ciclo celular (por ej. p15, p16/INK4a) y detención en G1-S. La unión al TGF- β RII refuerza y activa la acción del receptor de tipo I a través de la fosforilación de residuos de serina específica y de treonina. Para que dicha señal llegue al núcleo se debe activar una proteína llamada SMAD, la cual es fosforilada por el receptor de tipo I (TGF- β RI)⁴⁷.

Se han identificado nueve proteínas SMAD que forman complejos heterooligoméricos que se traslocan al núcleo. Luego de la traslocación al núcleo modulan la transcripción de los siguientes genes específicos: el inhibidor I-activador de plasminógeno, p15 y p21 (inhibidores de CDK's), ciclina D1 y al mismo TGF- β , entre otros⁴⁸.

Las alteraciones en los genes que codifican para estas proteínas podrían ser la causa de la transformación maligna del esófago de Barrett⁴⁹. Por otra parte, se ha observado un aumento significativo en la expresión de TGF- α en células neoplásicas presentes en vasos sanguíneos y linfáticos y en localizaciones metastásicas de adenocarcinomas de la unión gastroesofágica. Por lo tanto, este aumento en la expresión estaría asociado con la metástasis en ganglios linfáticos y su detección en biopsias periendoscópicas, permitiría identificar pacientes con tumores más agresivos que podrían necesitar terapia adicional⁴⁹. Por último, en el carcinoma pavimentoso de esófago, se ha observado una amplificación génica y sobreexpresión de los EGFR. Hasta el momento se desconoce el valor de este hallazgo⁵⁰.

Gen K-ras

El gen K-ras forma parte de una familia de oncogenes (H, N-, K-ras) en los que frecuentemente se detectan mutaciones en cánceres humanos, las que están asociadas con la agresividad de los tumores⁵¹. Los genes ras codifican proteínas de 21KDa las cuales están localizadas en la superficie interna de la membrana plasmática; estas proteínas unen nucleótidos de guanina y tienen una actividad GTPasa, y son moléculas transductoras de señales que afectan la proliferación celular⁵².

En los genes ras se ha detectado la presencia de mutaciones principalmente en los codones 12, 13 y 61 de los mismos^{51,52}.

A través del camino de K-ras se transducen señales desde los factores de crecimiento extracelulares para regular la progresión del ciclo celular y la proliferación⁵². La presencia de mutaciones en K-ras está asociada a la transcripción de los genes que codifican para la metiltransferasa, ciclina D1, gastrina, y otras proteínas que podrían ser importantes en la patogenia del cáncer⁵³.

Las mutaciones de K-ras están asociadas con un incremento en el riesgo de sufrir recidivas y menor supervivencia en cáncer siendo algunas mutaciones más agresivas que otras⁵¹.

En el carcinoma escamoso de esófago se detectaron mutaciones en el gen p53 que contribuyen a la malignidad pero no hay mutaciones de genes ras, tal como ha sido observado en otros tumores con el mismo grado de agresividad⁵⁴.

Gen COX-2

Las prostaglandinas endoperoxidasas H sintetasas 1 y 2 más conocidas como ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1, y COX-2) están involucradas en la síntesis de prostaglandinas y son el blanco de drogas anti-inflamatorias no esteroideas como la aspirina y de inhibidores de COX-2. La acción de estas drogas podrían tener importancia en la detención del desarrollo tumoral⁵⁵. Algunos tipos tumorales humanos sobreexpresan COX-2 pero no COX-1⁵⁶ y experimentos de transfección en ratones *knock-out* (sin el gen COX-2) demuestran el rol central de COX-2 en la tumorigénesis⁵⁷. COX-2 produce prostaglandinas que inhiben la apoptosis y estimulan la angiogénesis y la invasión de los tejidos⁵⁸. COX-2 es un gen de respuesta temprana y puede ser inducido por una variedad de promotores tumorales; citoquinas, factores de crecimiento e hipoxia. La sobreexpresión de COX-2 está ligada a todos los estadios de la carcinogénesis y ha sido comprobado por análisis de ratones transgénicos⁵⁹.

La proteína COX-2 está involucrada en la progresión del cáncer de esófago⁶⁰, siendo un marcador sensible de displasia de alto grado del epitelio pavimentoso de esófago y esto sugiere que la misma podría estar involucrada en estadios tempranos de la carcinogénesis del carcinoma pavimentoso de esófago⁶⁰. Se ha observado que la proteína COX-2 está presente en la mayoría de los carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas de esófago. Así como existe un proceso de evolución metaplasia-displasia-carcinoma, de igual forma aumentan los niveles de la proteína COX-2, existiendo una fuerte correlación entre los niveles de esta proteína y los cambios morfológicos⁶¹.

El persistente incremento de la expresión de COX-2 en la displasia y en el carcinoma, indicaría que la esti-

mulación de este gen sería necesaria para mantener el fenotipo de malignidad⁵⁶⁻⁵⁷.

La proteína COX-2 está involucrada también en la regulación de la supervivencia celular y en el mantenimiento del crecimiento en el tejido esofágico, dado que los inhibidores de COX-2 son los que inducen la apoptosis e inhiben el crecimiento de las células del carcinoma de esófago⁶⁰.

La inhibición farmacológica de COX-2 podría ser efectiva en los dos principales tipos histológicos de cáncer de esófago: se ha observado que la ingesta de inhibidores reduce sustancialmente la incidencia de ambas neoplasias⁶².

Por último, se proponen tres usos potenciales de los inhibidores selectivos de la COX-2: quimiopreención del cáncer en pacientes con metaplasia de Barrett⁶², agente regresivo en adenocarcinomas de esófago y terapia adyuvante en el tratamiento quimioterapéutico del cáncer⁶¹.

II. Genes involucrados en la reparación del ADN

Genes hMSH y hMLH y microsatélites

El sistema de reparación del ADN humano está compuesto por una familia de genes homologados a proteínas bacterianas MutS y MutL, también llamadas en humanos proteínas MMR (*MisMatch Repair System*): los homólogos de MutS son hMSH2, hMSH3, hMSH6 y los homólogos de MutL son hMLH1, hPMS2 y hPMS1. Mutaciones germinales de hMSH2 y hMLH1 explicarían aproximadamente el 50% de los casos de HNPCC⁶³ (*Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*), mientras que mutaciones germinales de hMSH3, hMSH6, hPMS1 y hPMS2 son raras o no están presentes en estos genes. Las proteínas MMR interactúan como heterodímeros: hMSH2-hMSH3; hMSH2-hMSH6; hMLH1-hPMS1 y hMLH1-hPMS2. Los dímeros hMSH2-hMSH3 y hMSH2-hMSH6 reconocerían al ADN mal apareado resultante de errores espontáneos que se producen durante la replicación del ADN por el mecanismo de ensamble del nucleótido adenosina⁶⁴.

Los huéspedes preferidos de estos errores de replicación espontáneos son simples secuencias repetitivas llamadas microsatélites. Los microsatélites son hereditarios con un patrón único para cada individuo y tienen un bajo grado de mutación heredado.

Defectos en el sistema de reparación del ADN producen el fenómeno conocido como inestabilidad de los microsatélites (MSI) en el cual la longitud de éstos, normalmente con repeticiones estables, varía considerablemente⁶⁴. Se ha pensado que el cáncer se produce también por defectos y errores en estos sistemas de reparación y en la replicación de las secuencias repetitivas contenidas en genes relevantes en el control de crecimiento

y diferenciación, como por ejemplo: TGF β RII, BAX y IGFRII⁶³.

Se ha observado que cuando existen alteraciones de los microsatélites se produce el fenómeno de la inestabilidad genómica. Los genes con secuencias simples repetitivas como polyA o repeticiones CA (microsatélites) son susceptibles de tener mutaciones⁶⁵.

La inestabilidad de estos microsatélites fue estudiada en cánceres colorrectales y de esófago. La frecuencia de MSI es mayor en el cáncer de colon que en el de esófago⁶⁶. Esta variación en la longitud de la repetición del microsatélite representa un proceso mutacional de escisión o delección en el ADN tumoral⁶⁶. Es importante saber en qué lesiones, tanto preneoplásicas como neoplásicas, aparece inestabilidad de microsatélites. En las lesiones preneoplásicas puede ser indicador pronóstico y en las neoplásicas podría tener relación con la respuesta a la quimioterapia⁶⁷.

En humanos, el mecanismo de reparación del ADN (MMR) es similar al de hongos y bacterias. Los genes involucrados son hMSH2, hPMS1 y hPMS2. La MSI puede deberse a mutaciones germinales en los genes hMSH2 o en hMLH1⁶⁴.

La inactivación de ambos alelos de hMSH2 o de hMLH1 es necesaria para obtener un fenotipo MSI-H (alta inestabilidad de microsatélites) y puede ocurrir a través de varios caminos: a) pérdida de heterocigocidad (LOH) por mutaciones puntuales de hMSH2 o hMLH1 constituyendo un modelo de inactivación del gen supresor; b) por mecanismos epigenéticos en donde el gen hMLH1 puede ser silenciado a través de la hipermetilación de islas CpG en su promotor y c) por un tercer mecanismo de inactivación génica que causa mutaciones germinales que truncan a la proteína hPMS2 en el codón 134⁶⁸; en esta instancia, la inestabilidad de microsatélites (MSI) se ha observado en células que aún contienen el alelo normal de hPMS2.

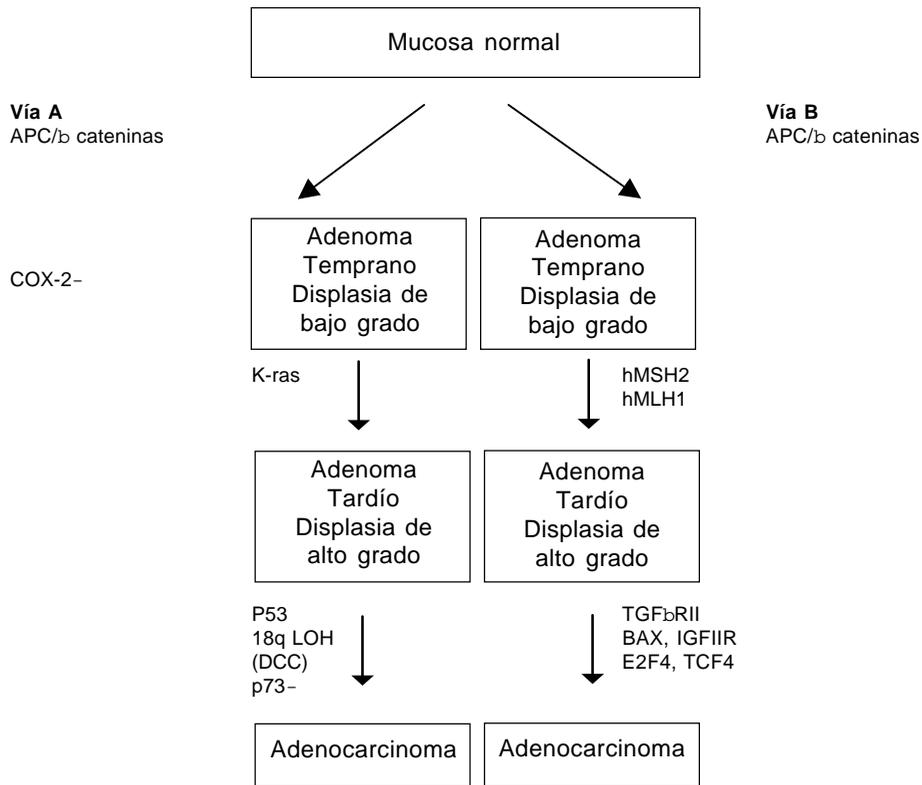
En 1994, Mori *et al.*, estudiaron por PCR diferentes microsatélites en el ADN de 11 displasias de esófago y en 21 carcinomas de células escamosas tempranos, y encontraron LOH en la región 3p21.3 y 9q31, aun en displasias de bajo grado⁶⁹. En contraste, observaron solamente LOH en 9p22 y 17p13 (que luego se confirmó como *locus* de p53) en displasias de alto grado y en carcinomas. Recientemente se ha descubierto, cercano a las regiones donde previamente se halló LOH tales como 9q y 3p, el gen DEC1 (*Deleted in Esophageal Cancer 1*)⁷⁰ en 9q32 y el gen DLEC1 (*Deleted in Lung and Esophageal Cancer 1*)⁷¹ en 3p22-p21.3. Al analizar al gen DEC se observó que la expresión del mismo estaba reducida en el carcinoma de células escamosas de esófago pero no se pudieron detectar anomalías génicas en ninguna de las neoplasias estudiadas⁷⁰. En relación al gen DLEC1, al estudiar la expresión del ARNm en neoplasias de esófago, se observó que el gen no se ex-

presaba (ausencia de ARNm) o que aumentaban los niveles de transcriptos aberrantes no funcionales que se acumulaban en la célula⁷⁰. Si bien aún no se conoce el origen de esta transcripción aberrante, los autores proponen que ésta podría ser una causa de la carcinogénesis en esófago⁷¹.

Diferencias y similitudes con el cáncer colorrectal

En relación a las diferencias con el cáncer de colon, el cáncer de esófago desarrolla dos tipos histológicos diferentes a partir de un único tipo de epitelio original siguiendo dos mecanismos patogénicos diferentes. Por otro lado, no se reconocen en el desarrollo del cáncer de esófago formas hereditarias. Una tercera e importante diferencia es el desarrollo de las lesiones en una mucosa plana. Estas dos últimas diferencias con el cáncer de colon impiden el estudio del riesgo en parientes de un paciente con cáncer y la prevención secundaria de los estadios iniciales mediante la extirpación de las lesiones elevadas.

De acuerdo al modelo de Fearon y Volgenstein⁷² se necesitarían entre 3 y 6 genes alterados para la transformación neoplásica de las células. A continuación se compara a nivel molecular las alteraciones génicas observadas en el cáncer de colon y el de esófago. En cáncer de colon existen dos vías posibles de tumorigénesis de acuerdo a, si existe inestabilidad de los microsatélites (vía A) o si no existe (vía B) (ver Fig. 2). Esta diferencia no se observa en cáncer de esófago. El 85% de los tumores esporádicos de colon no presenta MSI (vía A) y luego de la aparición de mutaciones en el gen APC que provoca la formación de pólipos, se observa una sobreexpresión de COX-2⁵⁷. En el camino hacia el adenocarcinoma de esófago se observa LOH de APC y aumento de la expresión de COX-2. La presencia de mutaciones del gen K-ras sería determinante para la malignización celular en colon pero no se observan alteraciones de este gen en la carcinogénesis de esófago⁵¹. En la patogénesis molecular del adenocarcinoma de colon se observan mutaciones en el gen p53³⁶, LOH de 18q (pérdida de DCC) y aumento de la expresión de p73. En la patogénesis molecular del carcinoma pavimentoso y del adenocarcinoma de esófago se observan mutaciones en p53, pero no se observa LOH de 18q. Por otra parte, solo en la displasia de alto grado previa al adenocarcinoma de esófago se observa un aumento en la expresión de p63. Por último, en estos adenocarcinomas se observa LOH de p73 en el polimorfismo AT/GC. El 15% de los tumores esporádicos colorrectales y los síndromes hereditarios de cáncer de colon como el FAP (*Familial Adenomatous Polyposis*) y el HNPCC siguen la vía de la tumorigénesis que presen-



Vía A: vía de tumorigénesis colorrectal sin MSI
 Vía B: vía de tumorigénesis colorrectal con MSI

Fig.2 .– Evolución histológica y molecular de la secuencia mucosa normal-adenoma-displasia-carcinoma en colon.

ta MSI (vía B)⁶⁴. En la carcinogénesis de esófago sólo se observa MSI en la displasia de alto grado que antecede al adenocarcinoma de esófago. En la FAP se observan mutaciones de APC acompañadas de alteraciones MSI. En el HNPCC y en tumores esporádicos se detectan mutaciones en los genes de reparación hMSH2 y hMLH1 que presentan también MSI que llevan a la mucosa colónica a la fase de adenoma con displasia de alto grado⁶³. Completan la tumorigénesis hacia adenocarcinoma colorrectal las alteraciones de los genes: TGF- β RII, BAX, IGF-IIR, E2F4, y TCF-4 y en todos, se observa simultáneamente la presencia de MSI. Cuando la MSI es alta, los pacientes con cáncer de colon tienen mejor pronóstico y menor probabilidad de metástasis que aquellos que tienen una MSI baja⁶⁵. Por último, sólo en carcinoma pavimentoso de esófago es posible observar una amplificación de la expresión de la ciclina D1 y de EGFR vía TGF- β .

En síntesis, en el camino hacia el carcinoma pavimentoso de esófago en el epitelio pavimentoso normal se observa que existe una mayor predisposición a alteraciones genéticas cuando el sexo es masculino y la raza es negra o asiática. En la hiperplasia basal se han de-

tectado mutaciones en p53. Cuando se detecta una displasia de bajo grado se empieza a observar a nivel génico un aumento de la inestabilidad genética, con pérdida de heterocigocidad en las regiones cromosómicas 3p y 17p, y mutaciones puntuales, fundamentalmente transversiones en el gen p53. Cuando finalmente se desarrolla un carcinoma pavimentoso, se observa una amplificación y sobreexpresión de COX-2, de la ciclina D1 y de EGFR, con pérdida de heterocigocidad en las regiones cromosómicas 3p, 5q, 9p, 13q, 17p, 17q y 18q. En esta secuencia de preneoplasia hacia carcinoma pavimentoso no se observan alteraciones que involucren a los genes p63 o p73, como se observa en el camino hacia el adenocarcinoma (ver Fig. 1).

En el camino hacia el adenocarcinoma de esófago cuando el sexo es masculino, la raza es caucásica y existe además una historia familiar, hay una mayor predisposición a alteraciones genéticas en el epitelio pavimentoso normal. Cuando se detecta una metaplasia de Barrett, se observa un alto porcentaje de células detenidas en G1 y G2 del ciclo celular, como así también una sobreexpresión de COX-2. En presencia de una displasia de bajo grado se observa un alto porcentaje de células

detenidas en la interfase en el período S, y se detectan mutaciones en los genes p53, p16, y en las ciclinas D, además de pérdida de heterocigocidad en el gen APC. En un estadio de displasia de alto grado, se observa una inestabilidad de los microsatélites, con fosforilación de las cateninas, disminución de la apoptosis y aumento de la expresión del gen p63. Cuando se desarrolla el adenocarcinoma de esófago, es posible observar una pérdida de heterocigocidad del gen p73 en el polimorfismo AT/GC presente en el exón 4. (ver Fig. 1).

Finalmente, la aplicación de estos conocimientos posibilitará en un futuro mediato, redefinir la conducta médica, en cuanto a pronóstico y asesoramiento familiar. Asimismo, la caracterización de los genes involucrados en estas patologías permitirá una mejor comprensión de las mismas.

Bibliografía

- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80: 827-41.
- Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 83: 18-29.
- Blot WJ. Esophageal cancer trends and risks factors. *Semin Oncol* 1994; 21: 403-10.
- Castellsagué X, Muñoz N, De Stefani E, Victora CG, Castelletto R, Rolón PA. Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer in South America. *Int J Cancer* 2000; 88: 658-64.
- Dawsey SM, Lewin KJ. Histologic precursors of squamous esophageal cancer. In: Rosen PP, Fechner RE, (eds). *Pathology Annual*. Norwalk, Connecticut: Appleton & Lange, 1995, p 209-25.
- De Nardi FG, Riddell RH. Esophagus. In: Sternberg SS, (ed). *Histology for pathologist*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincot-Raven, 1997, p 461-80.
- Chandrasama PT, Der R, Ma Y et al. Histology of the gastroesophageal junction: an autopsy study. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 402-9.
- Parakama T, Chandrasama T, Der R, et al. Distribution and significance of epithelial types in columnar-lined esophagus. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 1188-93.
- Glickman JM, Chen YY, Wang HH, Antonoli DA, Odze RD. Phenotypic characteristics of a distinctive multilayered epithelium suggests that it is a precursor in the development of Barret's esophagus. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 569-78
- Sugimachi K, Sumiyoshi K, Nozoe T, et al. Carcinogenesis and histogenesis of esophageal carcinoma. *Cancer* 1995; 75: 1440-5.
- Pesko P, Rakic S, Milicevic M, et al. Prevalence and clinicopathologic features of multiple squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1994; 73: 2687-90.
- Kuwara S, Nishimaki T, Komukai S, et al. Histogenesis and clinicopathological characteristics of superficial spreading carcinoma. *Int Surg* 2000; 85: 281-5.
- Geboes K, Van Ekyen P. The diagnosis of dysplasia and malignancy in Barrett's oesophagus. *Histopathology* 2000; 37: 99-107
- Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical implications. *Hum Pathol* 1983; 14: 931-68.
- Montgomery E, Goldblum JR, Greenson JK, et al. Dysplasia as a predictive marker for invasive carcinoma in Barrett esophagus: a follow-up study based on 138 cases from diagnostic variability study. *Hum Pathol* 2001; 32: 379-88.
- Blot WJ, Mc Laughlin JK .The changing epidemiology of esophageal cancer. *Semin Oncol* 1999; 26: 2-8.
- Cameron AJ, Lomboy CT, Pera M, Carpenter HA. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction and Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1995; 109: 1541-8
- Jacks T, Weinberg RA. The expanding role of cell cycle regulators. *Science* 1998; 280: 1035-6.
- Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1- phase progression. *Genes Dev* 1999; 13: 1501-12.
- Shamma A, Doki Y, Shiozaki H, et al. Effect of cyclin D1 and associated proteins on proliferation of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 1998; 13: 455-60.
- Boynton RF, Huang Y, Blount PL, et al. Frequent loss of heterozygosity at the retinoblastoma locus in human esophageal cancers. *Cancer Res* 1991; 51: 5766-9.
- Hayashi K, Metzger R, Salonga D, et al. High frequency of simultaneous loss of p16 and p16 beta gene expression in squamous cell carcinoma of the esophagus but not in adenocarcinoma of the esophagus or stomach. *Oncogene* 1997; 15: 1481-8.
- Sturm I, Petrowsky H, Volz R, et al. Analysis of p53 / BAX / p16 (ink4a / CDKN2) in esophageal squamous cell carcinoma: high BAX and p16 (ink4a / CDKN2) identifies patients with good prognosis. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2272-81.
- Wong DJ, Paulson TG, Prevo LJ, et al. p16 (INK4a) lesions are common, early abnormalities that undergo clonal expansion in Barrett's metaplastic epithelium. *Cancer Res* 2001; 61: 8284-9.
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, et al. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 1998; 282: 1497-501.
- Pavletich, NP, Chambers KA, Pabo CO. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev* 1993; 7: 2556-64.
- Fuchs SY, Adler V, Buschmann T, et al. JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev* 1998; 12: 2658-66.
- Blount PL, Ramel S, Raskind WH, et al. 17p allelic deletions and p53 protein overexpression in Barrett's adenocarcinoma. *Cancer Res* 1991; 51: 5482-6.
- Marin MC, Jost CA, Brooks LA et al. A common polymorphism acts an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nature Genet* 2000; 25: 47-54.
- Olivier M, Eeles R, Hollstein M, et al. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 2002; 19: 607-14.
- Leverro M, De Laurenzi V, Constanzo A, et al. The p53/p63/p73 family transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Science* 2000; 113: 1661-70.
- Yang A, Kaghad M, Wang Y, et al. P63 a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Molec Cell* 1998; 2: 305 -16.
- Augustin M, Bamberberger C, Paul D, Schamale H. Cloning and chromosomal mapping of the human p53-related KET gene to chromosome 3q27 and its murine homolog Ket to mouse chromosome 16. *Mammalian Genome* 1998; 9: 899-902.

34. Flores ER, Tsai KY, Crowley D, et al. P63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* 2002; 416: 560-4.
35. Hall PA, Woodman AC, Campbell SJ, Sheperd NA. Expression of the p53 homologue p63 alpha and delta Np63 alpha in the neoplastic sequence of Barrett's oesophagus: correlation with morphology and p53 protein. *Gut* 2001; 49: 324-7.
36. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36 a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997; 90: 809-19.
37. Fillippovich I, Sorokina N, Gatei M, et al. Transactivation-deficient p73alpha (p73Delta Exon 2) inhibits apoptosis and competes with p53. *Oncogen* 2001; 25: 514-22.
38. Nimura Y, Mihara M, Ichimiya S, et al. P73 a gene related to p53 is not mutated in esophageal carcinomas. *Int J Cancer* 1998; 78: 437-40.
39. Ryan BM, McManus R, Daly JS, et al. A common p73 polymorphism is associated with reduced incidence of oesophageal carcinoma. *Br J Cancer* 2001; 85: 1499-503.
40. Peifer M. Cancer, catenins, and cuticle pattern: a complex connection. *Science* 1993; 262: 1667-8.
41. Bian YS, Osterheld MC, Bosman F, et al. Nuclear accumulation of beta-catenin is a common and early event during neoplastic progression of Barrett esophagus. *Am J Clin Pathol* 2000; 114: 583-90.
42. Nabukawa B, Abraham SC, Gill J, Heitmiller RF, Wu TT. Clinicopathologic and molecular analysis of high-grade dysplasia and early adenocarcinoma in short versus long-segment Barrett esophagus. *Hum Pathol* 2001; 32: 447-54.
43. Gonzalez MV, Artimez ML, Rodrigo L, et al. Mutation analysis of the p53, APC and p16 genes in the Barrett's oesophagus, dysplasia and adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 1997; 50: 212-7.
44. Eads CA, Lord RV, Kurumboor SK, et al. Fields of aberrant CpG island hypermethylation in Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 5021-6.
45. Tselepis C, Perry I, Jankowski J. Barrett's esophagus: dysregulation of cell cycling and intercellular adhesion in the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. *Digestion* 2000; 61: 1-5.
46. Nasmyth K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science* 1996; 274: 1672-7.
47. Heldin CH, Miyasono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390: 465-71.
48. Ko TC, Sheng HM, Reisman D, Thompson EA, Beauchamp RD. Transforming growth factor - beta1 inhibits cyclin D1 expression in intestinal epithelial cells. *Oncogene* 1995; 10: 177-84.
49. D'Errico A, Barozzi C, Fiorentino M, et al. Role and new perspectives of transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) in adenocarcinoma of the gastro-oesophageal junction. *Br J Cancer* 2000; 82: 865-70.
50. Al Kasspooles M, Moore JH, Orringer MB, Beer DG. Amplification and over expression of the EGFR and erbB-2 genes in human esophageal adenocarcinomas. *Int. J. Cancer* 1993; 54: 213-9.
51. Andreyev HJN, Norman AR, Cunningham D, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the "RASCAL II" study. *Br J Cancer* 2001; 85: 692-6.
52. Rommel C, Hafen E. Ras: a versatile cellular switch. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 412-8.
53. Aktas H, Cai H, Cooper GM. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the CDK inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 3850-7.
54. Rosen N. The molecular basis for cellular transformation: implications for esophageal carcinogenesis. *Semin Oncol* 1994; 21: 416-24.
55. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 145-82.
56. Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 1276-80.
57. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2). *Cell* 1996; 87: 803-9.
58. Gately S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 19-27.
59. Liu CH, Chang SH, Narko K, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2001; 276: 18563-9.
60. Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1229-38.
61. Morris CD, Armstrong GR, Bigley G, Green H, Attwood SE. Cyclooxygenase-2 expression in the Barrett's metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 990-6.
62. Souza RF, Shewmake K, Beer DG, Cryer B, Spechler SJ. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis in human esophageal adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60: 5767-72.
63. Bocker T, Ruschoff J, Fishel R. Molecular diagnostics of cancer predisposition: hereditary non-polyposis colorectal carcinoma and mismatch repair defects. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1423: 1-10.
64. Farrington SM, Lin-Goerke J, Ling J, et al. Systematic analysis of hMSH2 and hMLH1 in young colon cancer patients and controls. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 749-59.
65. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-57.
66. Iniesta P, De Juan C, Caldés T, et al. Genetic abnormalities and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Detect Prev* 1998; 22: 383-95.
67. Martínez-López E, Abad A, Font A, et al. Allelic loss on chromosome 18q as a prognostic marker in stage II colorectal cancer. *Gastroenterol* 1998; 114: 1180-7.
68. Nicolaidis NC, Littman SJ, Modrich P, Kinzler KW, Vogelstein B. A naturally occurring hPMS2 mutation can confer a dominant negative mutator phenotype. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 1635-41.
69. Mori T, Yanagisawa A, Kato Y, et al. Accumulation of genetic alterations during esophageal carcinogenesis. *Hum Molec Genet* 1994; 3: 1969-71.
70. Nishiwaki T, Daigo Y, Kawasoe T, Nakamura Y. Isolation and mutational analysis of a novel human cDNA, DEC1 (deleted in esophageal cancer 1), derived from the tumor suppressor locus in 9q32. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 27: 169-176.
71. Daigo Y, Nishiwaki T, Kawasoe T, Tamari M, Tsuchiya E, Nakamura Y. Molecular cloning of a candidate tumor suppressor gene, DLC1, from chromosome 3p21.3. *Cancer Res* 1999; 59: 1966-72.
72. Fearon ER and Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67.