

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS P53 E Ki-67
NO EPITÉLIO ESOFÁGICO DE PACIENTES COM DOENÇA DO
REFLUXO GASTROESOFÁGICO, ESÔFAGO DE BARRETT E
ADENOCARCINOMA

Autor: MARCELO BINATO

Orientador: Prof. Dr. Richard Ricachenevsky Gurski

Co-Orientador: Prof. Dr. Renato Borges Fagundes

Tese de Doutorado

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS P53 E Ki-67
NO EPITÉLIO ESOFÁGICO DE PACIENTES COM DOENÇA DO
REFLUXO GASTROESOFÁGICO, ESÔFAGO DE BARRETT E
ADENOCARCINOMA

Autor: MARCELO BINATO

Orientador: Prof. Dr. Richard Ricachenevsky Gurski

Co-Orientador: Prof. Dr. Renato Borges Fagundes

Tese de Doutorado

2007

A minha família: Wiviane, Isabelle e Bernardo,
que compartilharam juntos comigo muitos momentos
desta jornada

Aos meus irmãos Silvio e Alexandre,
que sempre buscaram a sabedoria
e as melhores idéias

Aos meus pais Roberto Binato e Vaneza Binato,
pelo amor, pelo exemplo, pela dedicação
e ainda pelo esforço de sempre estimular seus filhos a encontrar
a felicidade e a realização profissional

*“A mente que se abre a uma nova idéia,
jamais voltará ao tamanho original”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Richard Ricachenevsky Gurski, Professor do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da UFRGS: grande amigo, notável orientador e mestre na ciência de ensinar. “O pensamento é a grandeza do Homem” (Pascal).

Ao Dr. Renato Borges Fagundes, Professor do Programa de Pós-Graduação em Medicina Gastroenterologia da UFRGS: pelo apoio e pela orientação na trajetória de minha formação profissional.

Às Professoras Doutoras em Patologia (UFRGS) Maria Isabel Edelweiss e Luise Meurer, que colaboraram na realização deste trabalho com simplicidade e sinceridade, principalmente, pela sabedoria no conhecimento da patologia gastrointestinal.

Ao Laboratório de Anatomia-Patológica da UFSM cujos patologistas Carlos Renato Melo, Ivanir S. Melo, Melissa Daubermann, Marta P. da Rocha muito contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial, ao técnico em imunohistoquímica Aílton P. de Quadros, pelo tempo despendido na preparação das lâminas.

Ao programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia, pela oportunidade e pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Agradecimento, em especial, à secretária do curso Estela Maris Emer Araripe.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA, particularmente, ao setor estatístico pela disponibilidade e pela ajuda. Em especial à Vânia Naomi Hirakata.

Ao Dr. Roberto Lemos, Professor do Departamento de Cirurgia da UFSM, pelo seu exemplo, pelo conhecimento e por sua dedicação à vida médica.

Ao Dr. Glauco da Costa Alvarez, Professor Doutor do Departamento de Cirurgia da UFSM a quem devo diretamente a oportunidade de iniciar e concluir este projeto.

Ao Dr. Alberto da Costa Stein, amigo e mestre em cirurgia, um exemplo na busca da idealização profissional. "O homem é aquilo que sabe" (Francis Bacon).

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Artigo I. *Análise da expressão da proteína p53 e do antígeno Ki-67(MIB-1) na mucosa esofágica de pacientes na seqüência doença do refluxo gastroesofágico – esôfago de Barrett – adenocarcinoma.*

Tabela 1. Pacientes excluídos antes da realização da biópsia preconizada pelo estudo	29
Tabela 2. Características demográficas dos pacientes	30
Figura 1. Microfotografia da mucosa esofágica: (A) mucosa escamosa normal; (B) esofagite crônica (hiperplasia da camada basal, alongamento das papilas e infiltrado de células inflamatórias no epitélio e na lâmina própria); (C) mucosa colunar com células caliciformes; (D) adenocarcinoma., (x 200)	25
Figura 2. Microfotografia da expressão imunohistoquímica da proteína p53 (setas): Esofagite (A), Epitélio colunar sem metaplasia intestinal (B), (x 100); Epitélio colunar com metaplasia intestinal (C) e Adenocarcinoma (D), (x 200)	31
Figura 3. Imunorreatividade p53 na seqüência epitélio normal – esofagite – colunar s/ MI – colunar c/ MI – adenocarcinoma	31
Figura 4. Correlação p53 e progressão epitélio normal – esofagite – colunar s/ e c/ MI – adenocarcinoma. Coeficiente de Kendall 0,4	32
Figura 5. Microfotografia da expressão imunohistoquímica do antígeno Ki-67 (MIB-1) – setas: Esofagite (A), Epitélio colunar sem MI (B), (x 100); Epitélio colunar com MI (C) e adenocarcinoma (D), (x 200).....	32
Figura 6. Atividade Ki-67 na seqüência epitélio normal – esofagite – colunar s/ MI -colunar c/ MI – adenocarcinoma	33
Figura 7. Correlação entre Ki-67 e progressão epitélio normal – esofagite – colunar s/ MI – colunar c/ MI – adenocarcinoma	34

Artigo II. *Análise da expressão imunohistoquímica da proteína p53 e do antígeno Ki-67(MIB-1) no epitélio escamoso de pacientes com DRGE e na esofagite crônica*

Figura 1. Microfotografia da expressão imunohistoquímica da proteína p53 – setas: mucosa normal (A) (x400), esofagite leve (B), esofagite moderada (C)	
---	--

e esofagite acentuada (D) , (x 200). 92

Figura 2. Atividade da proteína p53 na seqüência epitélio normal –
esofagite leve – esofagite moderada – esofagite acentuada 93

Figura 3. Correlação entre p53 e progressão epitélio normal –
esofagite leve – esofagite moderada – esofagite acentuada. Coeficiente de
Kendall 0,4. 93

Figura 4. Microfotografia da expressão imunohistoquímica do antígeno Ki-67
(MIB-1) – setas: epitélio normal (A) e esofagite leve (B) com aumento de 200X,
esofagite moderada (C) e esofagite severa (D), em aumento de 200X 94

Figura 5. Atividade Ki-67 na seqüência epitélio normal – esofagite
leve – esofagite moderada – esofagite acentuada 94

Figura 6. Correlação entre Ki-67 e progressão epitélio normal – esofagite
leve – esofagite moderada – esofagite acentuada 95

Artigo III. *Avaliação da expansão da proliferação celular na mucosa colunar do
esôfago distal: análise imunohistoquímica do antígeno Ki-67 (MIB-1) em mucosa
colunar com e sem metaplasia intestinal*

Tabela 1. Prevalência da atividade e índice de proliferação Ki-67 nos
compartimentos proliferativos da mucosa colunar 144

Figura 1. Atividade proliferativa Ki-67 (MIB-1) nos compartimentos
proliferativos da mucosa colunar com metaplasia intestinal (terço inferior e
terço médio da glândula – setas vermelhas; superfície epitelial –
seta azul). 144

Figura 2. Estratificação da imunorreatividade (Ki-67) nos compartimentos
proliferativos da cripta intestinal nos pacientes com e sem metaplasia
intestinal 145

LISTA DE ABREVIATURAS

DRGE	- Doença do refluxo gastresofágico
NERD	- <i>Non erosive reflux disease</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
Ki-67	- Antígeno Ki-67 (MIB-1)
MI	- Metaplasia intestinal
Tp53	- Gene P53
p53:	- Proteína p53
APC	- Adenomatous poliposis coli
ABC	- Avidina-biotina-peroxidase
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
ACE	- Adenocarcinoma de esôfago
PCNA	- <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular)
JEG	- Junção esofagogástrica
HUSM	- Hospital Universitário de Santa Maria
HCPA	- Hospital de Clínicas de Porto Alegre
UFMS	- Universidade Federal de Santa Maria

SUMÁRIO

Introdução	10
Objetivos	16
Artigo Científico I Redigido em Português	17
Artigo Científico I Redigido em Inglês	51
Artigo Científico II Redigido em Português	84
Artigo Científico II Redigido em Inglês	111
Artigo Científico III Redigido em Português	137
Artigo Científico III Redigido em Inglês	157
Conclusões	176
Anexos	
Anexo 1. Consentimento informado	178
Anexo 2. Ficha de registro dos pacientes	180
Anexo 3. Mapa esquemático do esôfago	181

INTRODUÇÃO

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é uma das condições clínicas mais freqüentes na prática médica, caracterizada tanto por sintomas típicos, pirose e regurgitação, quanto por atípicos como dor torácica, asma e tosse, associadas a lesões teciduais esofágicas e ou extra-esofágicas (1). Na forma típica da enfermidade, as manifestações estão diretamente relacionadas à ação do conteúdo gastroduodenal refluído sobre a mucosa esofágica; enquanto os casos atípicos devem-se à ação do material refluído sobre os órgãos adjacentes ao esôfago, podendo ambas estar associados a lesões teciduais no esôfago (2).

A prevalência atual da DRGE é medida pela presença de sintomas típicos da enfermidade (4). Nos Estados Unidos cerca de 44% da população referem pirose mensalmente, 14% apresentam sintomas semanalmente e 7% relatam pirose diariamente (3). No Brasil, a DRGE ocorre em cerca de 12% da população, sem levar em consideração as manifestações atípicas da doença (4).

A avaliação endoscópica do esôfago tem sido empregada como método de escolha para o diagnóstico das lesões da mucosa causadas pelo refluxo gastroesofágico, principalmente pela dificuldade em detectar as lesões baseadas somente nos sintomas dos pacientes refluídos (5,6). O espectro dos achados endoscópicos varia desde uma mucosa esofágica normal (*non erosive reflux disease* – *NERD*), até uma doença erosiva, esôfago de Barrett, estenose ou adenocarcinoma (7).

A razão de alguns refluídos apresentarem endoscopia normal, enquanto outros evoluem para a forma erosiva e/ou esôfago de Barrett permanece desconhecida. Nesse contexto o grupo com *NERD* pode representar, dentro das

diversas etapas da DRGE, a fase inicial da doença, ou apenas significar tal grupo tem maiores fatores de proteção da mucosa do que aqueles que desenvolvem as formas complicadas da DRGE (7). O surgimento da esofagite representa à falha dos mecanismos defensivos da mucosa do esôfago. Uma vez que o ácido altera a estrutura normal do epitélio esofágico, produzindo dilatação dos espaços intercelulares, a penetração do ácido causará mudança no pH tissular, troca de íons com as células e, finalmente, aumento da acidez intracelular. Este último fato representa o início da morte celular. Quando as alterações celulares progredirem, observa-se dano tecidual que afeta, inicialmente, as células do compartimento superficial do epitélio escamoso. Uma vez estabelecido o quadro inflamatório, pode-se, através da endoscopia, visualizar a forma erosiva da esofagite (1,2). A complicação mais importante desse processo inflamatório ocorre em consequência da cicatrização desordenada das lesões erosivas da mucosa esofágica, quando as células da camada basal do epitélio escamoso, ou dos ductos das glândulas submucosas esofágicas, diferenciam-se em células colunares, que recobrem o esôfago distal em substituição ao epitélio escamoso (2,8).

Sabe-se que o epitélio metaplásico no esôfago pode progredir para o câncer através de processo inflamatório contínuo, mas ainda se desconhece o modo exato pelo qual a seqüência metaplasia – displasia – adenocarcinoma se desenvolve. Esse mecanismo pode ocorrer por causa da ação mitogênica secundária à injúria crônica sobre a mucosa esofágica, ou pela mutagênese secundária à exposição a um agente danoso à célula (9). Assim, o aumento na produção a partir dos radicais de oxigênio, com subsequente dano ao DNA das células e o permanente estímulo de proliferação sobre a mucosa do esôfago, induzido pelo refluxo, são fatores fisiopatológicos importantes na carcinogênese esofágica (10).

O desenvolvimento do câncer está associado ao aparecimento de mutações genéticas, que conferem à célula de um determinado tecido a característica de crescimento descontrolado, com formação tumoral (11). Sabe-se que a seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma surge a partir de alterações histológicas caracterizadas, inicialmente, por um processo inflamatório crônico conseqüente ao refluxo gastroesofágico sobre a mucosa esofágica, que acompanha ou precede o desenvolvimento das alterações moleculares presentes na evolução desta neoplasia (11,12). A partir do processo inflamatório sobre a mucosa esofágica, a(s) célula(s) pode(m) adquirir, ao longo do tempo, alterações funcionais como resistência a apoptose, aumento da proliferação celular e instabilidade genômica, com aumento da expressão de diversas proteínas específicas, relacionadas ao controle do ciclo celular. Portanto, a via de carcinogênese do esôfago de Barrett apresenta semelhança, do ponto de vista histopatológico e molecular, àquela observada na doença inflamatória intestinal (13).

De acordo com a teoria da expansão clonal, as alterações moleculares são gradativamente acumuladas, no interior das células, até a formação de tumores malignos (14). Dessa forma, os eventos moleculares que levam às anormalidades funcionais, em determinadas áreas histológicas (clones de células), geralmente surgem ou precedem a formação de tumores sólidos, especialmente, nas etapas iniciais do processo de carcinogênese do esôfago (inflamação-metaplasia-neoplasia) (11). A identificação dessas alterações moleculares em tecido não neoplásico é da maior importância, na seleção de subgrupos de pacientes com maior risco de transformação maligna (13,14).

A proteína p53 e o antígeno Ki-67 têm se mostrado como importantes marcadores moleculares tanto em neoplasias malignas de esôfago, estômago e reto,

como nas condições clínicas associadas a processos inflamatórios crônicos da mucosa gastrointestinal (esofagite, acalasia e retocolite ulcerativa). A partir dessas observações e, considerando as limitações da análise histológica convencional da biópsia esofágica em determinar a evolução dos pacientes com esôfago de Barrett, na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma, a avaliação da expressão imunohistoquímica da proteína p53 e da atividade proliferativa pelo Ki-67 (MIB-1), na mucosa esofágica dos pacientes, poderá demonstrar, com mais clareza o momento em que o estímulo inflamatório gera a alteração neoplásica (11,15-17).

O estudo das alterações histológicas e moleculares, nas etapas iniciais da DRGE, passando pelas fases do processo inflamatório, metaplasia intestinal, displasia e adenocarcinoma, por meio de marcadores moleculares tem sido a forma mais investigada para elucidar estas perguntas (11,18-20).

Apresentam-se, a seguir, os resultados de uma análise prospectiva de uma população de pacientes avaliados dentro do espectro da doença, desde a DRGE até o adenocarcinoma do esôfago. Tais resultados geraram três artigos científicos que analisaram as diferentes fases de apresentação da DRGE e objetivam, ainda, analisar e discutir as modificações histopatológicas e/ou moleculares que acompanham, ou precedem, o desenvolvimento do adenocarcinoma do esôfago.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

1. Voutilainen M, Sipponen P, Mecklin Jp, Juhola M, Farkkila M: Gastroesophageal reflux disease: prevalence, clinical, endoscopic and histopathological findings in 1128 consecutive patients referred for endoscopy due to dyspeptic and reflux symptoms. *Dig* 2000, 61:6-13.
2. Orlando RC. Pathogenesis of Gastroesophageal reflux disease. *Am J Med Sci* 2003; 326(5): 274-278.
3. Gallup survey on heartburn across America. Princeton, NJ: The Gallup Organization, 1988.
4. Moraes-Filho JPP, Cecconello I, Gama-Rodrigues J, Castro LP, Henry MA, Meneghelli UG, Quigley E, Brazilian Consensus Group. Brazilian consensus on gastroesophageal reflux disease: proposals for assessment, classification, and management. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:241-248.
5. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340(11):825-831.
6. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. Barrett's esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterol* 1987; 93(1):1-11.
7. Achem SR. Endoscopy negative gastroesophageal reflux disease. The hypersensitive esophagus. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28:893-904.
8. Gillen P, Keeling P, Byrne PJ, West AB, Hennessy TP. Experimental columnar metaplasia in the canine oesophagus. *Br J Surg* 1988; 75: 113-115.
9. DeMeester SR, DeMeester TR. Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus: fifty years of controversy. *Ann Surg* 2000; 231(3):303-321.
10. Wetscher GJ, Hinder RA, Kingler P, et al. Reflux esophagitis in humans is a free radical event. *Dis Esoph* 1997; 10:29-32.
11. Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H. Field defects in progression to adenocarcinoma of the colon and esophagus. *Elect J Biotech* 2000; 3(3):1-14.

12. Manson RJ, Bremner CG. Gastritis in Barrett's esophagus. *World J Surg* 1995; 19:96-101.
13. Jankowski JA, Wright, NA, Meltzer, SJ, Triadafilopoulos, G, Geboes K, Casson, AG, Kerr D, Young LS Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Pathol* 1999; 154(4): 965-73.
14. Nowell PC. The clonal evaluation of tumor cell populations. *Sci* 1976; 194: 23-28.
15. Ribeiro Jr. U, Alves VA, Souza PMSB, Ribeiro AVS, Rawet V, Nonogaki S, Rodrigues JG, Habr-Gama A. Correlação das proteínas p53 e Ki-67 com o prognóstico de pacientes com adenocarcinoma de reto distal. *Rev Bras Coloproct* 2000; 20(4): 248-256.
16. O'Riordan JM, Abdel-atif MM, Ravi N, MacNamara D, Byrne PJ, McDonald GS, Keeling PW, Kelleher D, Reynolds JV. Proinflammatory cytokine and nuclear factor kappa-B expression along the inflammation-metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(6): 1257-64.
17. Chino O, Kijima H, Shimada H, Nishi T, Tanaka H, Oshiba G, Kise Y, Kenmochi T, Himeno H, Tsuchida T, Kawai K, Tanaka M, Machimura T, Tajima T, Makuuchi H. Clinic pathological studies of esophageal carcinoma in achalasia: analyses of carcinogenesis using histological and immunohistochemical procedures. *Anticancer Res* 2000, 20(5C): 3717-22.
18. Chen X, Ouyang Q, Zhang WY, Li XS, Liang HL. The clinical, pathological features and expression of Ki-67 and COX-2 in severe reflux esophagitis and Barrett's esophagus. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2005; 36(2): 207-9.
19. Fujiwara Y, Higuchi K, Hamaguchi M, Takashima T, Watanabe T, Tominaga K, Oshitani N, Matsumoto T, Arakawa T. Increased expression of transformation growth factor-alpha and epidermal growth factor receptors in rat chronic reflux esophagitis. *J Gastroenterol and Hepatol*. 2004; 19: 521-527.
20. Fitzgerald RC, Onwuegbusi BA, Bajaj-Elliott M, Saeed IT, Burnham WR, Farthing MJ. Diversity in the oesophageal phenotypic response to gastro-oesophageal reflux: immunological determinants. *Gut* 2002; 50(4): 451-9.

OBJETIVOS

Artigo I

1. Avaliar a expressão da proteína p53 e Ki-67 (MIB-1) na mucosa esofágica de pacientes com doença do refluxo gastroesofágico, esôfago de Barrett e adenocarcinoma do esôfago.
2. Analisar a correlação da expressão da proteína p53 e Ki-67 com os diversos graus de lesão histológica, na mucosa esofágica destes pacientes.

Artigo II

1. Avaliar a expressão da proteína p53 e Ki-67 (MIB-1) na mucosa esofágica de pacientes com doença do refluxo gastroesofágico e que apresentem esofagite crônica.
2. Analisar a correlação da expressão da proteína p53 e Ki-67 com os graus de esofagite crônica destes pacientes.

Artigo III

1. Avaliar o índice Ki-67 (MIB-1) nos diferentes compartimentos proliferativos da mucosa colunar no esôfago distal com ou sem metaplasia intestinal em pacientes com doença do refluxo gastroesofágico.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P53 E DO ANTÍGENO KI-67 (MIB-1) NA MUCOSA ESOFÁGICA DE PACIENTES COM DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO – ESÔFAGO DE BARRETT – ADENOCARCINOMA

** (pré-artigo para ser enviado à revista Gastroenterology)*

Versão em Português

Autores:

Marcelo Binato

Renato Borges Fagundes

Luise Meurer

Maria Isabel Edelweiss

Richard Ricachenevsky Gurski

Local de Realização:

Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Serviços de Cirurgia Geral e de Patologia.

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – CEP 90035-003. Bairro Rio Branco – Porto Alegre –

RS – Brasil. Fone: (51) 2101.8000.

Endereço para Correspondência:

Marcelo Binato

Rua Francisco Manoel Nº 01/ AP 202 CEP 97015-260

Santa Maria – RS – Brasil. Fone: (55) 32225693

Email: mbinato@uol.com.br

RESUMO

Introdução: A doença do refluxo gastroesofágico é considerada um dos principais fatores de risco, para o desenvolvimento do adenocarcinoma do esôfago. Muitas alterações moleculares ocorrem na carcinogênese esofágica, mas o exato mecanismo do desenvolvimento do adenocarcinoma permanece desconhecido.

Objetivos: Determinar a expressão da proteína p53 e do índice Ki-67 na mucosa esofágica em pacientes com DRGE e correlacionar esses marcadores com a seqüência epitélio escamoso normal – esofagite crônica – epitélio colunar sem ou com metaplasia intestinal – adenocarcinoma.

Métodos: A expressão da proteína p53 e do índice Ki-67 foi determinada pela análise imunohistoquímica de 235 pacientes, divididos em cinco grupos: G1- 58 pacientes com epitélio escamoso normal, G2: 80 pacientes com esofagite crônica, G3: 30 pacientes com epitélio colunar s/ MI, G4: 32 pacientes com epitélio colunar com MI e G5: 35 pacientes com adenocarcinoma. O material estudado foi proveniente de biópsia endoscópica de pacientes com DRGE, entre janeiro de 2003 e dezembro de 2006.

Resultados: A expressão aumentada da proteína p53 foi encontrada em 7% no G1, 37,5% no G2, 30% no G3, 62,5% no G4 e 71,4% no G5 ($p < 0,001$). O aumento no índice de proliferação celular Ki-67 também foi proporcionalmente maior, de acordo com a piora do diagnóstico histopatológico, sendo de $21,3 \pm 19,5\%$ no G1, $38,8 \pm 24,9\%$ no G2, $37,7 \pm 26,3\%$ no G3, $52,8 \pm 24,6\%$ no G4 e $57,1 \pm 25,1\%$ no G5 ($p < 0,001$). Foi observada correlação linear entre o aumento de ambos marcadores moleculares (p53 e Ki-67) e o avanço na seqüência epitélio escamoso – adenocarcinoma ($p < 0,001$ e $p < 0,05$).

Conclusão: A expressão aumentada da proteína p53 e do índice de proliferação celular Ki-67 (MIB-1) demonstraram ter correlação com a progressão para o adenocarcinoma, em pacientes com DRGE. A alteração na atividade proliferativa avaliada pelo Ki-67 (MIB-1), acompanhou as mudanças moleculares do gene Tp53, e pode estar associada às mudanças desse marcador.

Palavras-Chave: p53. Ki-67 (MIB-1). DRGE. Esôfago de Barrett. Adenocarcinoma.

INTRODUÇÃO

O refluxo gastroesofágico é uma das condições clínicas mais freqüentes na prática médica, uma vez que acomete mais de 30% da população adulta (1;2). Estudo populacional nacional estima que, aproximadamente, 12% da população brasileira têm doença do refluxo gastroesofágico, sem considerar os indivíduos com manifestações atípicas (3). A avaliação endoscópica do esôfago, nos pacientes com DRGE, apresenta um amplo espectro de achados, sendo os principais: mucosa esofágica sem lesões (*non erosive reflux disease – NERD*), doença erosiva, esôfago de Barrett, estenose e câncer, especialmente, o adenocarcinoma (4;5).

Trabalhos experimentais e ensaios clínicos apóiam a teoria de que a mucosa colunar no esôfago distal surge em conseqüência da exposição do epitélio escamoso esofágico ao conteúdo gastroduodenal (6;7). A importância desse epitélio no esôfago é decorrente da possibilidade de evoluir para metaplasia intestinal, o que caracteriza o esôfago de Barrett, e finalmente para o adenocarcinoma (3). Portanto, o esôfago de Barrett é definido pela presença de mucosa colunar em esôfago distal, visível na endoscopia digestiva alta, com qualquer extensão e que demonstre, no exame anátomo-patológico, metaplasia intestinal com células calciformes (8). Estima-se que 6 a 12% dos pacientes com sintomas de refluxo gastroesofágico, submetidos à avaliação endoscópica, tenham esôfago de Barrett (9;10).

Cerca de 64 a 86% dos adenocarcinomas de esôfago originam-se a partir do epitélio colunar com metaplasia intestinal. Em vista disso, o esôfago de Barrett torna-se o fator de risco mais importante na avaliação dos pacientes com doença do refluxo gastroesofágico (11;12). A natureza pré-maligna do esôfago de Barrett atribui aos pacientes um risco anual de desenvolvimento do adenocarcinoma de esôfago de 0,5 a 2%, representado um risco 30 a 125 vezes maior que o da população em

geral (13;14). O adenocarcinoma de esôfago tem apresentado incidência crescente nos países desenvolvidos, superando o carcinoma epidermóide e tornando-se o tipo histológico mais comum das neoplasias de esôfago em algumas populações. Apesar dos avanços terapêuticos, o prognóstico dos casos avançados é ruim (15-17).

Devido ao risco de progressão do esôfago de Barrett para o adenocarcinoma de esôfago, um seguimento racional nesses pacientes, que permita a identificação precoce da transformação maligna é de fundamental importância. Ao longo do processo da carcinogênese esofágica, uma seqüência de múltiplas alterações genéticas torna a célula epitelial não responsiva aos mecanismos reguladores de proliferação e morte celular programada. Com isso, a célula adquire capacidade de proliferação descontrolada, com potencial invasor, tornando-se uma célula neoplásica (14).

A evolução do esôfago de Barrett para o adenocarcinoma de esôfago está, freqüentemente, associada com mudanças estruturais no DNA celular (18). Diversas alterações moleculares são identificadas na progressão do epitélio escamoso com DRGE, passando pela metaplasia intestinal até o aparecimento do adenocarcinoma. As mais importantes incluem a alteração na regulação do ciclo celular, por disfunção nos genes supressores tumorais (p53, APC), nos oncogenes e nas células de adesão molecular (E-caderina e Cateninas) (18).

O gene Tp53 é um dos mais estudados no desenvolvimento e progressão de diversas neoplasias. Localizado no braço curto do cromossomo 17, mais precisamente na região 17p13.1, o gene Tp53 codifica a proteína p53, cuja finalidade é retardar o ciclo celular e reparar um eventual dano ao DNA das células, ou mesmo induzir a apoptose e impedir mutações nas linhagens celulares subseqüentes (19). A inativação do gene Tp53 pode ocorrer por mutação ou

interação com oncogenes específicos. Basicamente, os dois principais eventos moleculares que alteram o gene Tp53, durante a progressão tumoral, são a deleção de um dos alelos do cromossomo 17p e/ou mutações do segundo. As perdas alélicas, geralmente, estão associadas com formas mutantes do Tp53 (19;20).

A mutação do gene Tp53 e a expressão aumentada da proteína p53 estão entre as anormalidades genéticas mais comumente encontradas nas neoplasias humanas (5;21). Essas alterações têm sido relatadas em vários tipos de câncer - incluindo cólon, esôfago, estômago, pulmão, mama, bexiga e outros -, e nas condições pré-malignas como no esôfago de Barrett (20). O aumento da expressão da proteína p53 parece ocorrer, precocemente, na gênese tumoral. Essa proteína está presente nas diferentes fases da seqüência metaplasia-adenocarcinoma, sendo detectada em, aproximadamente 50 a 90% dos adenocarcinomas de esôfago (18;20).

Associada à disfunção do gene Tp53, o aumento da proliferação celular pode preceder o aparecimento de lesões displásicas no esôfago de Barrett (19;22;23). O Ki-67 é uma proteína nuclear expressa em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M), mas ausente na fase G0 – repouso celular (24;25), sendo empregado como marcador de proliferação em diferentes tipos de neoplasias (26-28). A exata função do antígeno Ki-67 não é bem conhecida. Entende-se que tenha papel importante na regulação do ciclo celular (29). Os mecanismos e interações da expressão da proteína p53 com o aumento do índice de proliferação celular (Ki-67), na carcinogênese esofágica, permanecem em estudo. A identificação de marcadores tumorais de fácil acesso e baixo custo, com boa representatividade clínico-patológica, que permita a seleção de subgrupos de pacientes com esôfago de Barrett e perfil molecular para desenvolver displasia e/ou câncer é fundamental. A

proposta deste estudo é avaliar a expressão imunohistoquímica da proteína p53 e o índice de proliferação celular pelo Ki-67 (MIB-1), na mucosa esofágica de indivíduos com doença do refluxo gastroesofágico, em todo o seu espectro de doença: mucosa esofágica com e sem esofagite, mucosa colunar com e sem metaplasia intestinal e adenocarcinoma do esôfago.

MATERIAIS E MÉTODOS

População em estudo

Foram investigados, prospectivamente e de forma consecutiva, pacientes com idade igual ou superior a 30 anos, encaminhados ao Serviço de Endoscopia entre janeiro de 2003 e dezembro de 2006, com sintomas típicos de refluxo gastroesofágico, como pirose e/ou regurgitação, pelo menos uma vez por semana, com duração mínima de cinco anos, e pacientes com adenocarcinoma de esôfago, diagnosticados por endoscopia e biópsia. Não tiveram a biópsia realizada conforme protocolo de pesquisa os pacientes com as seguintes condições: coagulopatia, uso de anticoagulantes ou anti-adesivos plaquetários, AINES, tratamento quimioterápico ou radioterápico prévios, varizes esofagogástricas, recusa do paciente ao procedimento endoscópico, esôfago de Barrett já diagnosticados, hemorragia digestiva, hepatopatia, neoplasia associada, hipersensibilidade iodo, supressão ácida nos últimos 60 dias, cirurgia sobre o esôfago/estômago, adenocarcinoma tipo III Siewert.

Antes do exame endoscópico de cada paciente, foi obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e realizado o questionário para definir as características demográficas e clínicas dos pacientes (Anexo 1 e 2).

Endoscopia digestiva alta

Foi utilizado endoscópio Fujinon 2200, introduzido mediante manobras convencionais, para a inspeção do esôfago, estômago e duodeno. Com o endoscópio posicionado próximo a linha Z, foi realizada a cromoscopia com Solução de Lugol a 3%, com o objetivo de colocar em evidência os marcos anatômicos e as lesões da mucosa esofágica. Os principais marcos anatômicos, as alterações na mucosa esofágica como erosões, úlceras, ilhotas, lingüetas e áreas circunferenciais de mucosa colunar, e os locais biopsiados foram registrados em mapa esquemático do esôfago (Anexo 3). O parâmetro utilizado para avaliar o tamanho das lesões da mucosa foi a pinça de biópsia aberta (7 milímetros).

Definições endoscópicas

O pinçamento diafragmático correspondeu à impressão do músculo diafragma visto à endoscopia digestiva alta. A linha Z definiu a junção escamocolunar, já a junção esofagogástrica foi determinada pela margem proximal das pregas gástricas. O tamanho da hérnia hiatal foi demarcado pela distância da linha Z ao pinçamento diafragmático. A graduação endoscópica da esofagite erosiva foi definida pela classificação de Los Angeles (3). A característica endoscópica do esôfago recoberto por mucosa colunar foi determinada pela presença de mucosa “cor salmão” ou “cor vermelho-róseo”, semelhante à mucosa gástrica, que recobre a porção proximal da junção esofagogástrica. A extensão da mucosa colunar foi delimitada pela distância entre a margem proximal e distal da lesão, em relação aos incisivos (arcada dentária superior).

Biópsia

As amostras teciduais foram obtidas com o auxílio de pinça fórceps, com

estilete central. Após a cromoscopia com Solução de Lugol foram coletados no mínimo dois fragmentos de mucosa, iniciando do ponto mais distal da lesão em direção proximal. Dependendo do achado endoscópico, os fragmentos foram obtidos dois centímetros acima da junção escamocolunar na ausência de lesão, no sítio de erosão ou na área não corada, e em intervalos de um a dois centímetros nos quatro quadrantes na presença de mucosa colunar visível no esôfago distal, de acordo com o protocolo de Seattle. As amostras teciduais foram fixadas em solução de formalina a 10% e incluídas em blocos de parafina.

Critérios diagnósticos histológicos

Os cortes dos blocos de parafina foram corados pelos métodos de Hematoxilina-Eosina (H&E) e Alcian-blue pH 2.5, para posterior análise em microscópio óptico, por duas patologistas do Serviço de Patologia do HCPA.

Os achados histológicos foram classificados em epitélio escamoso normal, presença de células da camada basal atingindo mais do que 15% da camada epitelial total, alongamento das papilas com extensão até 2/3 da camada epitelial total, exocitose (presença de neutrófilos e/ou eosinófilos e/ou monócitos intra-epiteliais) (FIGURA 1), ectasia vascular ou extravasamento (dilatação das vênulas das papilas com congestão ou extravasamento de hemácias para o epitélio circunjacente). O diagnóstico histopatológico de esofagite foi definido pela presença de um ou mais dos achados citados acima, conforme descrição prévia (30).

O epitélio colunar no esôfago distal foi classificado pela ausência da célula caliciforme à biópsia. O esôfago de Barrett foi definido pela presença de epitélio colunar com células caliciformes (padrão viliforme típico), na coloração pela Hematoxilina-Eosina e por apresentar reatividade na coloração pelo Alcian-blue. O

diagnóstico de adenocarcinoma foi estabelecido ao identificar-se a presença de glândulas atípicas com acentuada perda da estrutura habitual, com células isoladas ou em grupos que invadiam a lâmina própria e a camada submucosa.

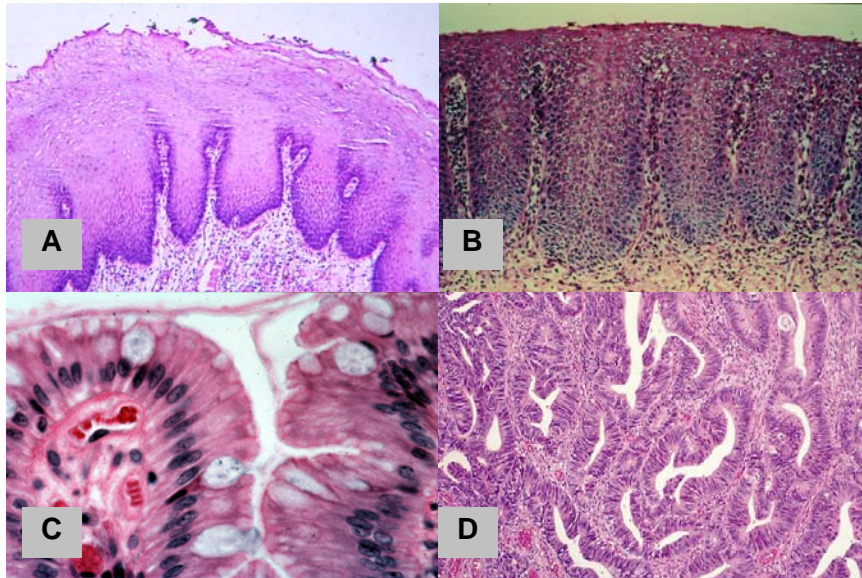


Figura 1 Microfotografia com achados histológicos da mucosa esofágica: (A) mucosa escamosa normal; (B) esofagite crônica (hiperplasia da camada basal, alongamento das papilas e infiltrado de células inflamatórias no epitélio e na lâmina própria); (C) mucosa colunar com células caliciformes; (D) adenocarcinoma.

Conforme o método utilizado por Cameron et al (16), que verifica a distância entre o centro da lesão tumoral e a junção escamocolunar, para classificar os adenocarcinomas de esôfago e de cárdia, e segundo a classificação proposta por Siewert (31), os pacientes com adenocarcinoma, analisados no presente estudo foram classificados em três tipos. Tumores cujos centros se localizavam a mais de dois centímetros acima da junção escamocolunar foram classificados como adenocarcinoma de esôfago (Tipo I de Siewert). Tumores que se localizavam até dois centímetros da junção escamocolunar, cranial ou caudalmente, foram considerados adenocarcinoma da JEG (Tipo II de Siewert). Tumores localizados abaixo desse nível, foram denominados carcinomas gástricos subcárdicos (Tipo III de Siewert). Foram incluídos no estudo os tumores tipo I e II. A exclusão dos

tumores tipo III da análise justifica-se em virtude da sua origem, provavelmente, diferente do adenocarcinoma de esôfago e do adenocarcinoma da JEG (17).

Análise imunohistoquímica

O estudo imunohistoquímico foi realizado no Laboratório de Imunohistoquímica do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Foram efetuados quatro cortes histológicos com três micrômetros de cada bloco designado.

Para a análise imunohistoquímica, foram utilizadas duas lâminas tratadas com poli-L-lisina, com dois selos histológicos cada, uma lâmina para o anticorpo p53 e outra para o Ki-67 (MIB-1). Para a determinação da positividade desses anticorpos foi empregado o método ABC (avidin-biotin-peroxidase complex, ExtrAvidin Sigma). Os cortes foram desparafinizados por imersão em xilol e desidratados em álcool de diferentes concentrações em temperatura ambiente (ATA). Após a inativação da peroxidase endógena e o bloqueio das reações inespecíficas, foi realizada a recuperação antigênica em forno de microondas.

O anticorpo primário p53 (DAKO, código M7001 mouse anti-p53; clones DO-7) foi incubado por 15 horas, a 4°C, na diluição 1:700. O anticorpo reconhece a forma selvagem e a mutante da proteína p53. Entretanto, em virtude da meia-vida extremamente curta da forma selvagem, a coloração do núcleo da célula tumoral sugere o acúmulo anormal da proteína p53. O anticorpo primário Ki-67 (DAKO, código MU2970397 mouse anti Ki-67; clones MIB-1) foi incubado por 15 horas, a 4°C, na diluição 1:400. O complexo estreptavidina-biotina foi utilizado para localização do anticorpo primário em ambos marcadores, enquanto a diaminobenzidina-tetrahydroclorofo foi empregada como cromógeno. A contra-

coloração foi realizada com Hematoxilina-Haans. Foram utilizados como controle positivo materiais provenientes de câncer de mama para a proteína p53 e de apêndice cecal para a proteína Ki-67; e como controle negativo, foi usada uma lâmina sem a inclusão do anticorpo primário.

A avaliação da proteína p53 foi realizada pela proporção de células coradas, em um mínimo de 10 campos visuais de grande aumento (400X). O parâmetro usado para definir a expressão da proteína p53, foi a presença de coloração nuclear, conforme estabelecido por Wang et al (32). Foram considerados casos positivos aqueles com mais de 10% de células coradas, por campo microscópico de alta magnificação.

Em relação ao antígeno Ki-67 (MIB-1), o resultado foi avaliado com base no índice do Ki-67, para cada caso. O índice é calculado a partir da média de células coradas e o total de células analisadas com contagem de, no mínimo, 500 células, conforme descrito previamente por Feith et al (33).

A leitura imunohistoquímica das lâminas foi realizada por duas patologistas com experiência em patologia gastrointestinal, do Departamento de Patologia do HCPA de forma independente e sem o conhecimento das informações clínicas e endoscópicas. Quando discordantes, o resultado final foi obtido por consenso entre as patologistas, assim como descrito por Weston et al (34).

Cálculo amostral

Para o cálculo amostral foi utilizada a fórmula para comparação de proporções entre amostras. Para que fosse possível encontrar uma diferença de 10 a 45% de p53 positivo e Ki-67 alterados nos diversos grupos (graus de esofagite e metaplasia intestinal), foi calculado um tamanho amostral de aproximadamente de

210 pacientes (alfa=0,05 e poder de 90%).

Análise estatística

Para armazenamento e processamento dos dados, foi utilizado o Statistical Package for Social Science (SPSS), versão 12.0. O teste estatístico aplicado para análise comparativa da proteína p53, entre os grupos, foi o qui-quadrado de tendência linear. Os dados para o Ki-67 foram apresentados em médias e desvios-padrão. As variáveis contínuas foram comparadas entre categorias através da análise de variâncias (ANOVA). A localização das diferenças, quando presentes, foi realizada pelo teste Tukey. A correlação linear das variáveis p53 e Ki-67, com seus respectivos grupos, foram analisadas pelo coeficiente de correlação Kendall e Pearson, respectivamente. Foi considerado significativo $p < 0,05$. Para o controle da concordância interobservador foi utilizado o teste kappa.

Considerações éticas

Este trabalho teve seu projeto previamente avaliado e aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA, seguindo todas as normas éticas preconizadas. Os pacientes foram submetidos à endoscopia digestiva alta junto ao atendimento assistencial do Serviço de Gastroenterologia do HUSM. Foi utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para todos os pacientes, os quais tiveram a privacidade dos dados coletados protegida. Para os pacientes com adenocarcinoma de esôfago provenientes do HCPA o material utilizado foi obtido do Serviço de Patologia do HCPA, sem a participação direta dos pacientes, bem como não houve modificação no protocolo de tratamento em decorrência da pesquisa. Os dados clínicos coletados por revisão de prontuários nesse grupo, foram utilizados de

forma sigilosa e anônima, garantido pelo Termo de Compromisso para Utilização de Dados. O estudo seguiu as normas emanadas da resolução 196/96 do Conselho Federal de Medicina e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CCS da UFSM e pelo GPPG/HCPA.

RESULTADOS

No período de janeiro de 2003 a dezembro de 2006, foram avaliados 511 pacientes que preencheram os critérios de seleção. Foram excluídos 262 pacientes que não seguiram o protocolo de biópsia a que se propunha o estudo (tabela 1), e 15 perdas das quais, 9 casos por diagnóstico histológico não conclusivo e 6 casos por dificuldade na avaliação dos núcleos marcados para a proteína p53 pela técnica imunohistoquímica.

Tabela 1. Pacientes excluídos antes da realização da biópsia preconizada pelo estudo	
✓ História coagulopatia (13)	✓ Hemorragia Digestiva (9)
✓ Anticoagulantes/antiadesivos (11)	✓ Hepatopatia (7)
✓ AINES (12)	✓ Neoplasia associada (24)
✓ QTX e RTX (17)	✓ Hipersensibilidade iodo (4)
✓ Varizes esofagogástricas (10)	✓ Supressão ácida (92)
✓ Recusa do paciente (6)	✓ CRG Esôfago/Estômago (18)
✓ EB já diagnosticados (21)	✓ ACE Tipo III Siewert (17)

Os 235 pacientes incluídos no estudo foram divididos em cinco grupos de acordo com o estudo anátomo-patológico das amostras esofágicas: 58 pacientes com epitélio escamoso normal (grupo 1), 80 pacientes com esofagite crônica (grupo 2), 30 pacientes com epitélio colunar sem metaplasia intestinal (grupo 3), 32 pacientes com epitélio colunar com metaplasia intestinal (grupo 4) e 35 pacientes

com adenocarcinoma de esôfago (grupo 5).

As características demográficas dos 235 pacientes estão apresentadas na Tabela 1. Houve predomínio do sexo feminino, no grupo 1, em relação aos demais ($p < 0,05$). Houve uma média de idade mais avançada no grupo com adenocarcinoma, em relação aos demais ($p < 0,05$), com exceção dos pacientes com mucosa colunar com metaplasia intestinal. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação à raça.

Tabela 2. Características demográficas dos pacientes.

	Grupo 1 (normal) N=58	Grupo 2 (esofagite) n=80	Grupo 3 (colunar s/ MI) n=30	Grupo 4 (colunar c/ MI) n=32	Grupo 5 (ACE) n=35	Total n=235	Valor p
Idade (média±DP)	50,4±13,8	53,4±15,2	54,2±16,8	58,2±12,6	64±8,6	55±14,5	0,041
Sexo (%)							<0,05
Masculino	13 (22,4)	42 (52,5)	17 (56,7)	21 (65,6)	30 (85,7)	123 (52,3)	
Feminino	45(77,6) [∞]	38 (47,5)	13 (43,3)	11 (24,4)	5 (14,3)	112 (47,7)	
Raça							0,503
Caucasiana	55 (95)	72 (90)	25 (83,3)	28 (87,5)	32 (91,4)	212 (90,2)	
Negra/Mista	3 (5)	8 (10)	5 (16,7)	4 (12,5)	3 (8,6)	23 (9,8)	

[∞] G1 difere dos demais grupos ($p < 0,05$)

Com relação à expressão da proteína p53, 4 (7%) pacientes com epitélio normal apresentaram positividade para a proteína p53. Dos 80 pacientes com esofagite crônica, 30 (37,5%) mostraram-se positivos. Houve positividade para a proteína p53 em 9 (30%) dos 30 pacientes com epitélio colunar sem metaplasia intestinal e 20 (62,5%) dos 32 pacientes com epitélio colunar com metaplasia intestinal. Dos 35 pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma 25 (71,4%) revelaram positividade para a proteína p53 (Figura 1).

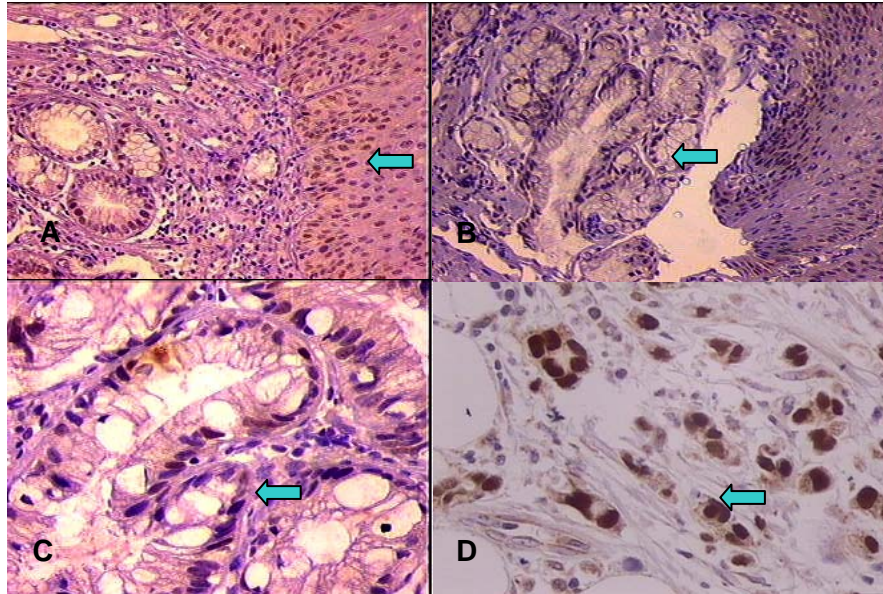


Figura 2. Microfotografia da expressão imunohistoquímica da proteína p53 (setas): Esofagite (A), Epitélio colunar sem metaplasia intestinal (B), (x 100); Epitélio colunar com metaplasia intestinal (C) e Adenocarcinoma (D), (x 200).

A análise comparativa da positividade da expressão imunohistoquímica da proteína p53 demonstrou uma diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos com relação ao grupo epitélio normal (Figura 2). O grupo esofagite também diferiu do grupo adenocarcinoma. Houve diferença ainda entre o grupo colunar sem metaplasia intestinal em relação ao grupo adenocarcinoma ($p < 0,01$).

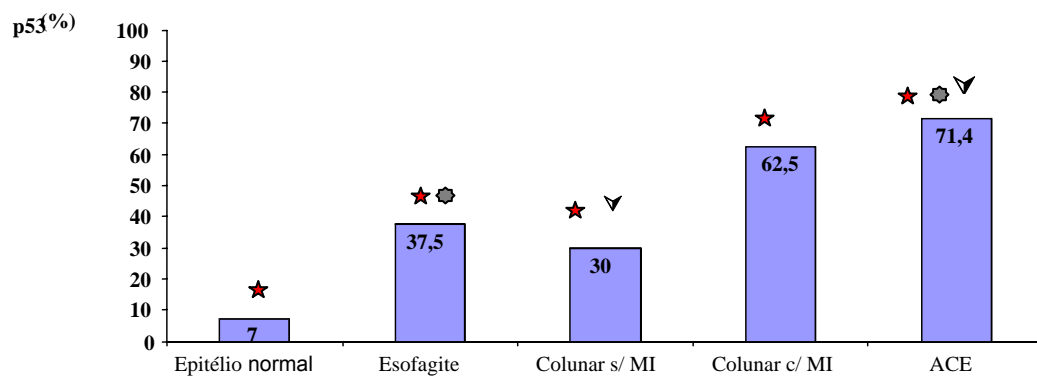


Figura 3. Atividade p53 na seqüência epitélio normal - esofagite - colunar s/ e c/ MI - adenocarcinoma: ★ $p < 0,001$ G1 entre G2, G3, G4 e G5; ✱ $p < 0,05$ entre G2 e G5; ▼ $p < 0,01$ entre G3 e G5

Identificou-se correlação linear positiva entre o aumento da proteína p53 e a evolução na seqüência epitélio normal–esofagite–colunar sem metaplasia intestinal–colunar com metaplasia intestinal–adenocarcinoma ($p<0,001$) (Figura 3).

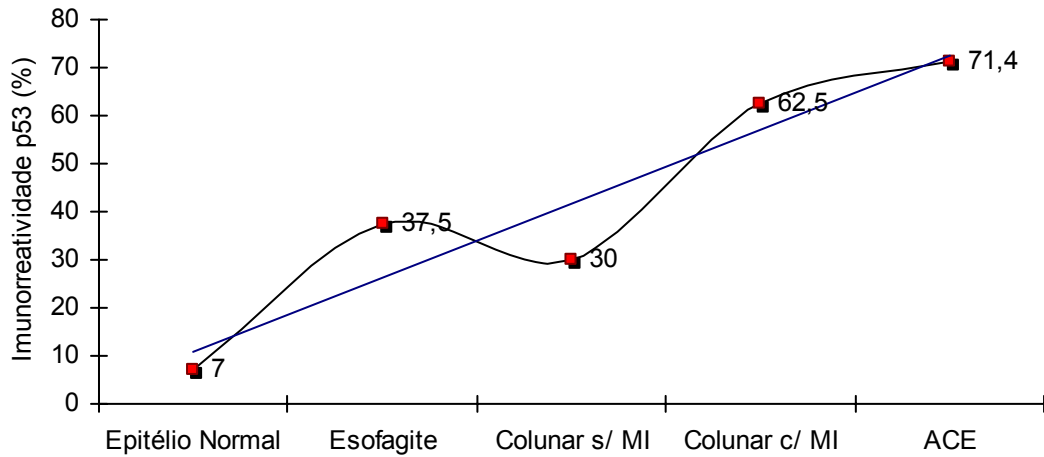


Figura 4. Correlação p53 e progressão epitélio normal – esofagite – colunar s/ e c/ MI – adenocarcinoma. Coeficiente de Kendall 0,4.

O índice médio de células coradas para o Ki-67 foi de $39\pm 26,7\%$. As médias foram de $21,3\pm 19,5\%$ nos pacientes com epitélio escamoso normal; $38,8\pm 24,9\%$ nos pacientes com esofagite crônica; $37,7\pm 26,3\%$ nos pacientes com epitélio colunar sem metaplasia intestinal; $52,8\pm 24,6\%$ nos pacientes com epitélio colunar com metaplasia intestinal e $57,1\pm 25,1\%$ nos pacientes com adenocarcinoma (Figura 4).

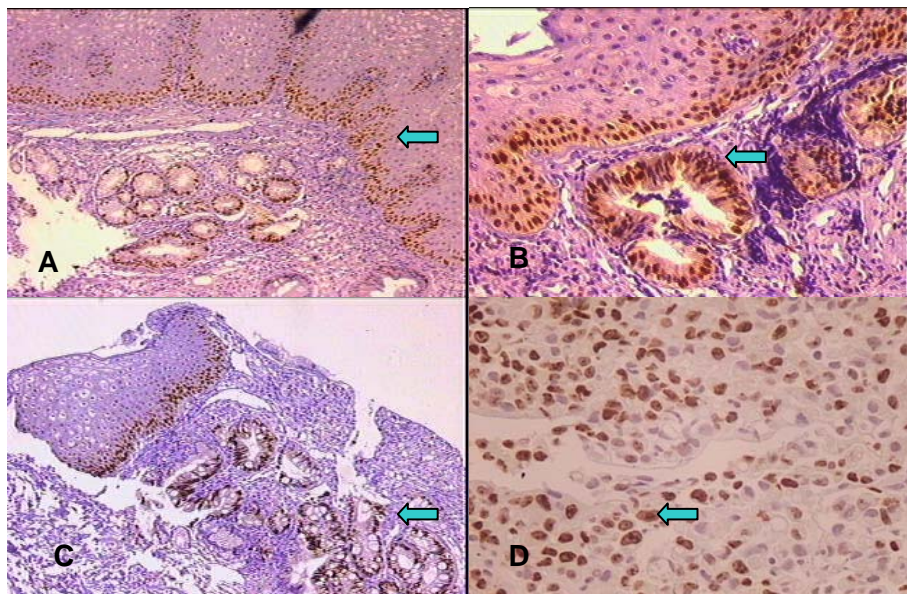


Figura 5. Microfotografia da expressão imunohistoquímica do antígeno Ki-67 (MIB-1) – setas: Esofagite (A), Epitélio colunar sem metaplasia intestinal (B), (x 100); Epitélio colunar com metaplasia intestinal (C) e adenocarcinoma (D), (x 200). O escore Ki-67 representa a porcentagem de núcleos corados em cada campo analisado.

Houve diferença significativa no índice do Ki-67 entre o grupo epitélio escamoso normal e os demais grupos ($p < 0,001$). O grupo esofagite crônica diferiu de todos os outros exceto do grupo colunar sem metaplasia intestinal ($p = 1,000$). Não houve diferença significativa entre o grupo colunar sem metaplasia intestinal e o grupo colunar com metaplasia intestinal ($p = 0,096$), o qual também não diferiu dos pacientes com adenocarcinomas ($p = 0,948$). Houve diferença significativa no índice do Ki-67 entre os pacientes com adenocarcinoma e aqueles com epitélio colunar sem metaplasia intestinal ($p < 0,05$) conforme Figura 5.

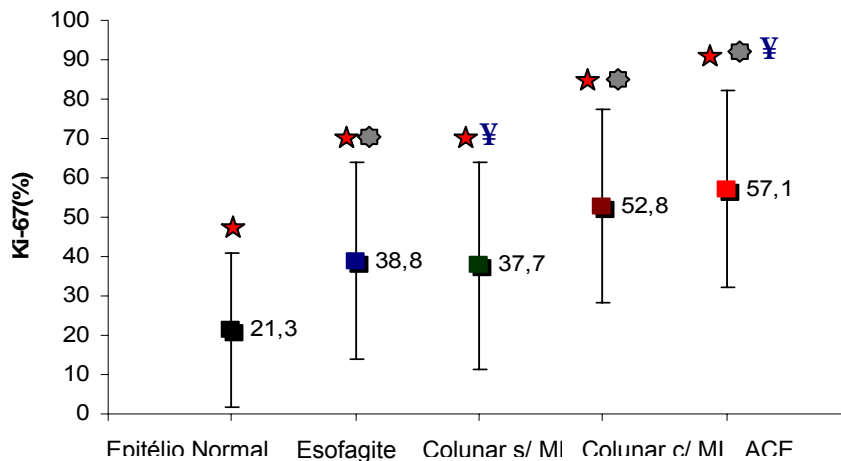


Figura 6. Atividade Ki-67 na seqüência epitélio normal – esofagite – colunar s/ e c/ MI – adenocarcinoma. ★ $p < 0,001$ G1 entre G2, G3, G4 e G5; ● $p < 0,05$ G2 entre G4 e G5; ¥ $p < 0,05$ entre G3 e G5

Identificou-se uma correlação linear positiva entre o aumento do Ki-67 e a evolução na seqüência epitélio normal – esofagite – colunar sem metaplasia intestinal – colunar com metaplasia intestinal – adenocarcinoma ($p < 0,05$) (Figura 6).

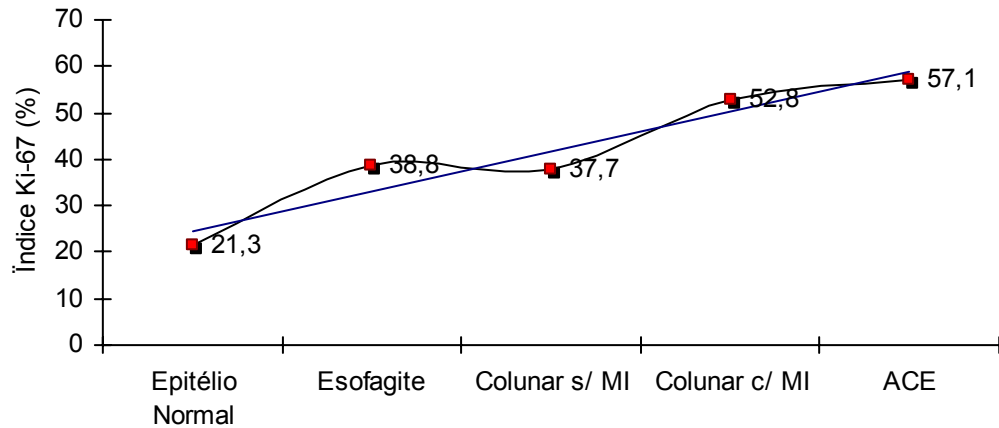


Figura 7. Correlação entre Ki-67 e progressão epitélio normal – esofagite – colunar s/ e c/ MI – adenocarcinoma. Coeficiente de Pearson = 0,4.

DISCUSSÃO

A doença do refluxo gastroesofágico representa o fator de risco mais importante e específico da carcinogênese do esôfago, especialmente relacionado ao adenocarcinoma de esôfago (35). A correlação inflamação-carcinoma tem sido estudada através da mensuração da elevação do índice de proliferação celular e da alteração na função dos genes que controlam o ciclo celular, como o gene supressor tumoral p53 (19;23;36;37). Com os recentes avanços na biologia molecular, há uma intensificação dos esforços para caracterizar os eventos moleculares específicos que ocorrem durante as fases da doença do refluxo gastroesofágico.

Método

A técnica escolhida, para analisar as amostras da mucosa esofágica, foi o estudo imunohistoquímico. Este método vem sendo empregado na investigação de inúmeros genes, por exemplo no estudo do papel do gene supressor tumoral Tp53 e do antígeno nuclear Ki-67, na carcinogênese gastrointestinal (20;21;38-40). Em condições normais, o gene Tp53 gera uma proteína com meia-vida curta (p53 normal), sendo indetectável por estudo imunohistoquímico. Na presença de

mutação, o gene Tp53 alterado produz uma proteína mais estável, com prolongamento da meia-vida por até 6 horas, e o acúmulo intra-nuclear torna possível sua identificação pelo método imunohistoquímico (19;22;34;38). As principais razões para o emprego do método imunohistoquímico decorre da sua praticidade, disponibilidade e possibilidade de comparação dos resultados com outras técnicas como a citometria de fluxo (36). Entretanto, a utilização da imunohistoquímica deve ser vista com cautela, uma vez que a ausência de expressão da proteína p53 não, necessariamente, exclui a existência de mutações. Além disso, alguns tipos de vírus (adenovírus, papilomavírus) podem causar alterações na estabilidade da proteína p53, permitindo que ela possa ser detectada pela imunohistoquímica determinando resultados falso-positivos (20;22). Para alguns autores, uma outra limitação importante da técnica é a dificuldade de reproduzir a avaliação entre diferentes patologistas (27), fato que não foi observado na presente casuística, onde a concordância entre os patologistas foi elevada (valor kappa=0,66).

A técnica de citometria de fluxo permite a análise de grandes números de células, sendo utilizada para avaliar a proliferação celular (Ki-67) e as mudanças no conteúdo do DNA. Os resultados desse método não mostraram diferenças significativas na contagem total do Ki-67, quando da estratificação dos pacientes em esôfago de Barrett com e sem displasia e adenocarcinoma (46;47). Além disso, a técnica de citometria de fluxo tem outras limitações, como a necessidade de uso de amostras de tecido fresco, o comprometimento da arquitetura tecidual não sendo por isso capaz de distinguir as zonas individuais, e necessita de equipamento dispendioso e mão-de-obra especializada por ser uma técnica de execução trabalhosa (36;48). Neste estudo, a expressão imunohistoquímica da proliferação

celular foi avaliada pela utilização do anticorpo monoclonal MIB-1, capaz de detectar o antígeno Ki-67 em tecidos fixados em formalina e incluso na parafina.

As amostras teciduais da mucosa esofágica foram obtidas através de endoscopia digestiva, com o auxílio de pinça fórceps com estilete central. Como relatado por Nishiyama et al (43), utilizou-se a pinça fórceps com estilete central, que permite uma maior precisão na realização da biópsia com menor viés de amostragem. Além disso, obteve-se uma maior quantidade de tecido com inclusão da lâmina própria, sem que houvesse maiores complicações, como sangramento.

A cromoscopia com Solução de Lugol tem sido utilizada por muitos pesquisadores como um método auxiliar no diagnóstico endoscópico de lesões que, potencialmente, podem passar despercebidas no exame endoscópico convencional, especialmente, na população com maior risco de apresentar câncer esofágico (49;50). É um método fácil, de baixo custo, que não determina grande aumento de tempo na realização do exame, podendo ser empregado de rotina nos serviços de endoscopia digestiva. A Solução de Lugol reage com os constituintes da célula escamosa e define, com precisão, a presença e o limite distal do epitélio escamoso, melhorando a avaliação visual das características da linha Z no esôfago. Todos esses aspectos fizeram com que se definisse por utilizar, rotineiramente, esse corante em todos os pacientes do estudo.

Resultados

O desenvolvimento do adenocarcinoma esofágico está associado ao acúmulo progressivo de anormalidades genéticas que envolvem diversos oncogenes e genes supressores tumorais. De acordo com a teoria de Nowell, tal processo pressupõe o aparecimento precoce da instabilidade genômica, seguida da expansão

clonal de células geneticamente alteradas (14). Pouco se sabe sobre as alterações moleculares que ocorrem no esôfago de Barrett; provavelmente, a perda da função do gene Tp53, associada ao aumento da proliferação celular, tenha importante papel na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma (18;27).

A vigilância endoscópica nos pacientes com esôfago de Barrett, para detectar alterações displásicas, é a estratégia atual para prever o risco de progressão para o adenocarcinoma de esôfago (8;18). A displasia é considerada a expressão histológica do dano ao DNA celular, que precede a transformação maligna. Infelizmente, os dados da literatura indicam que a displasia é um marcador imperfeito do risco de câncer, especialmente o relacionado ao esôfago de Barrett, por várias razões, entre as quais a variação intra e interobservador, na interpretação das alterações displásicas, e o baixo valor preditivo na evolução da displasia (progressão, persistência ou regressão) (8;22;42). Portanto, a busca por novos marcadores biológicos e o melhor entendimento da patogênese da doença do refluxo gastroesofágico podem auxiliar na identificação dos pacientes com risco aumentado de transformação maligna. No presente estudo, procurou-se analisar a expressão da proteína p53 e o índice de proliferação celular Ki-67 (MIB-1), ao longo da seqüência mucosa escamosa – esofagite crônica – epitélio colunar sem metaplasia intestinal – epitélio colunar com metaplasia intestinal – adenocarcinoma.

A análise imunohistoquímica da expressão da proteína p53, no presente estudo, identificou uma positividade nos grupos epitélio normal, esofagite crônica, epitélio colunar sem metaplasia intestinal, epitélio colunar com metaplasia intestinal e adenocarcinoma de 7%, 37,5%, 30%, 62,5% e 71,4%, respectivamente. Tais resultados demonstraram haver uma correlação linear da positividade da proteína p53 ao longo dos eventos que envolvem pacientes sem alteração epitelial, pacientes

com processo inflamatório na mucosa escamosa, pacientes portadores de mucosa colunar com e sem metaplasia intestinal e pacientes com câncer. Um aspecto a ser salientado é o número expressivo de pacientes na amostra estudada e o alto índice de significância estatística demonstrado pelo teste qui-quadrado para tendência linear ($p < 0,001$). Além disso, observamos que a expressão da proteína p53 se eleva, significativamente, a partir do surgimento da metaplasia intestinal, ressaltando a importância desse achado na progressão para o adenocarcinoma de esôfago.

Nosso trabalho identificou 7% de positividade para a proteína p53 nos pacientes histologicamente normais. Neste grupo a distribuição da imunorreatividade ficou restrita à camada basal do epitélio escamoso e a maioria dos casos apresentaram fraca intensidade de coloração ao microscópio óptico. De forma semelhante, Krishnadath et al (18) estudaram a expressão imunohistoquímica da proteína p53 (DO-7) em mucosa normal, e detectaram fraca coloração nuclear na camada basal, em 24 amostras de mucosa esofágica utilizadas como grupo controle.

A positividade da proteína p53 de 62,5% nos pacientes com epitélio colunar com metaplasia intestinal, e de 71,4% entre aqueles com adenocarcinoma corroboram os resultados obtidos por Casson et al (51), que identificaram uma expressão alterada da proteína p53 em 50% dos pacientes com metaplasia intestinal sem displasia; enquanto Krishnadath et al (18) observaram imunorreatividade para a proteína p53 em até 83% dos pacientes com adenocarcinoma de esôfago. Segal et al (52) estudaram a expressão da proteína p53 pelo método imunohistoquímico (DO-7) e análise molecular do gene Tp53 (PCR) em 68 pacientes com diagnóstico de esofagite crônica (27 pacientes), esôfago de Barrett (21 pacientes) e Metaplasia Intestinal da Cárdia (20 pacientes). Identificaram positividade total da proteína p53 em 56,1%. Nos pacientes com esôfago de Barrett e Metaplasia Intestinal da Cárdia a

positividade foi de 60,9% e 39,1%, respectivamente. Embora tenham ressaltado as limitações do método imunohistoquímico na interpretação da imunorreatividade da proteína p53, os autores concluíram que a expressão aumentada da proteína p53 é comum nos pacientes com esôfago de Barrett e Metaplasia Intestinal da Cárdia.

Ramel et al (36), estudaram a expressão imunohistoquímica da proteína p53 nas etapas de progressão do esôfago de Barrett, e detectaram positividade da proteína p53 em 5% dos pacientes com esôfago de Barrett sem displasia, 15% na displasia de baixo grau, 45% na displasia de alto grau e 53% no adenocarcinoma.

Kim et al (53) analisaram, juntamente com o PCNA e c-erB-2, a expressão da proteína p53 em 43 peças de esofagectomia por adenocarcinoma ou displasia de alto grau. Identificaram 36% de positividade da p53 em áreas de esôfago de Barrett sem displasia, 30% na displasia de baixo grau, 85% na displasia de alto grau e 90% no adenocarcinoma de esôfago. Esses autores concluíram que a expressão aumentada da proteína p53 é um evento relativamente precoce na carcinogênese do esôfago de Barrett, e relacionada ao aumento da proliferação celular avaliada pelo PCNA.

Rice et al (54) estudaram a expressão da proteína p53 em 28 peças de esofagectomia e não detectaram imunorreatividade para a proteína p53 nos pacientes com esôfago de Barrett sem ou com displasia de baixo grau. Os estudos que não identificaram imunorreatividade da proteína p53 nestes pacientes, podem ter seus resultados explicados pela utilização de diferentes metodologias no emprego da técnica de imunohistoquímica, como diluição do anticorpo, tempo de permanência na parafina e interpretação da intensidade da coloração nuclear (5;54;55). Tal circunstancia pode gerar uma variabilidade metodológica que interfira na comparação dos resultados.

Weston et al (34) estudaram a expressão da proteína p53 através do método imunohistoquímico, em 48 pacientes com esôfago de Barrett e displasia de baixo grau durante 81 meses de vigilância endoscópica. Demonstraram que o número de pacientes p53 positivos foi significativamente maior nos casos com displasia persistente (25%) e progressiva (60%) em relação aos pacientes que regrediram (13%). Constataram também que a porcentagem de células positivas na mucosa glandular, ao redor de áreas displásicas, foi fator preditivo na progressão do esôfago de Barrett para displasia de alto grau e adenocarcinoma. Alguns questionamentos sobre esse estudo são a utilização de um pequeno número de casos em cada grupo analisado e o fato de não ter aferido a positividade da proteína p53 em um grupo controle. Esses dados são coincidentes aos relatados por Younes et al (22) que também demonstraram a importância da imunorreatividade da proteína p53, na evolução das alterações histológicas, em pacientes com esôfago de Barrett.

A expressão alterada do gene supressor tumoral Tp53 ocorre em uma ampla variedade de tumores humanos (20;38;41). A sua freqüente associação com um prognóstico reservado destas neoplasias indica o papel importante desse gene, na progressão tumoral (22;42). O elevado índice de positividade na expressão da proteína p53 encontrado nas amostras com adenocarcinoma (71,4%), no presente estudo, sugere que a expressão alterada desse gene seja um evento, entre outros, importante no desenvolvimento do câncer esofágico. Nosso estudo também demonstrou um percentual de positividade da proteína p53 semelhante entre os grupos esofagite crônica e mucosa colunar sem metaplasia intestinal de 37,5% e 30%, respectivamente ($p > 0,05$). Talvez a ação do refluxo tenha papel importante na positividade desse marcador biológico nos pacientes analisados. Diversas alterações inflamatórias, como a esofagite em áreas adjacentes a tumores, esofagite por

acalasia e esofagite por refluxo gastroesofágico, estão intimamente relacionadas ao processo de carcinogênese esofágica, o que pode alterar a função das proteínas reguladoras do ciclo celular, entre elas a proteína p53 (38;50). Até o momento, poucos trabalhos analisaram a imunorreatividade da proteína p53, na mucosa escamosa complicada por processo inflamatório, especialmente, relacionado ao refluxo gastroesofágico. Fagundes et al (50) conduziram um estudo prospectivo com o objetivo de estabelecer a imunorreatividade da proteína p53, em um protocolo rigoroso de biópsias esofágicas seriadas, em pacientes com alto risco para carcinoma epidermóide do esôfago. Demonstraram um aumento progressivo da expressão imunohistoquímica da proteína p53 em pacientes com esofagite crônica, displasia e câncer esofágico.

Nos pacientes com mucosa colunar sem metaplasia intestinal, a prevalência da imunorreatividade da proteína p53 foi de 30%, enquanto no epitélio colunar com metaplasia intestinal foi de 62,5%. Embora não tenha havido significância estatística entre esses dois grupos, fica evidente que a imunorreatividade da proteína p53 esteve fortemente associada ao processo de intestinalização da mucosa metaplásica no esôfago distal. O desenvolvimento da mucosa colunar no esôfago distal é uma condição benigna, que adquire potencial de transformação maligna com o surgimento da metaplasia intestinal (56). O mecanismo molecular específico que induz a tal mudança é desconhecido. A mucosa colunar no esôfago distal é o primeiro passo na seqüência mucosa colunar-Barrett-adenocarcinoma, e muitos trabalhos publicados nos últimos dez anos demonstraram que o controle adequado do refluxo gastroesofágico pode associar-se com a regressão histológica do esôfago de Barrett (56;57;58). Gurski et al (59) demonstraram que a cirurgia anti-refluxo foi fator preditivo importante para a regressão histológica em pacientes com esôfago de

Barrett. A regressão histológica ocorreu em 36% dos pacientes operados. Carlson et al (60) avaliaram a importância da imunorreatividade da proteína p53, em biópsias endoscópicas, na evolução de pacientes com esôfago de Barrett sob terapia supressora ácida. Os autores concluíram que o acúmulo da proteína p53 foi um marcador de progressão neoplásica, mesmo na vigência do tratamento clínico. Os achados evidenciaram que os pacientes p53 positivos progrediram para maiores graus de displasia ou ploidia do DNA, e que a instalação precoce da anormalidade genética do gene Tp53 não modificou a evolução neoplásica dos pacientes com esôfago de Barrett, sob terapia ácida supressora. Portanto, a identificação de pacientes com esôfago de Barrett e maior chance de progressão histológica é campo promissor para pesquisas futuras.

O alto índice de positividade da proteína p53, identificado neste estudo, entre os pacientes com epitélio colunar com metaplasia intestinal (62,5%), e o risco relativamente baixo de progressão dessa lesão precursora para o adenocarcinoma de esôfago (0,5 a 2%), sugere que, embora necessário para o desenvolvimento dessa neoplasia, o gene supressor tumoral Tp53, por si só, não seria suficiente para a progressão tumoral. Possivelmente, outros fatores mediadores do processo de proliferação celular e de apoptose, como o bcl-2 e o c-Myc, atuam sobre as células com alterações moleculares, impedindo a sua transformação neoplásica (19;43;61;62).

O antígeno nuclear Ki-67 é um dos marcadores de atividade proliferativa mais estudado devido a sua boa representatividade clínico-patológica em diversas condições clínicas, como as doenças linfoproliferativas, doença do refluxo gastroesofágico, câncer de cólon, esôfago e próstata (23;27). O Ki-67 está presente nas células em proliferação e sua positividade aumentada tem sido demonstrada em

carcinomas esofágicos, gástricos, colônicos e retais (44).

Os resultados, no presente estudo, demonstraram que o índice de proliferação celular (Ki-67) foi significativamente maior, à medida que progrediam as alterações histológicas. A análise imunohistoquímica do Ki-67 identificou uma positividade crescente, no epitélio escamoso e glandular, da expressão do antígeno nuclear, nos grupos epitélio escamoso normal, esofagite crônica, epitélio colunar sem metaplasia intestinal, epitélio colunar com metaplasia intestinal e adenocarcinoma de 21,3%, 38,8%, 37,7%, 52,8% e 57,1%, respectivamente.

Feith et al (33) detectaram um índice de proliferação celular de $20,4 \pm 6,4\%$ no epitélio normal do esôfago, $39 \pm 11,1\%$ na metaplasia colunar sem displasia, e $60,8 \pm 17,9\%$ nos adenocarcinomas. Nossos resultados também mostraram um alto índice de proliferação pelo Ki-67, na zona proliferativa, dos pacientes com metaplasia intestinal sem displasia, quando comparado ao grupo epitélio escamoso normal ($p < 0,001$). Tais achados são concordantes com o trabalho de Hong et al (23), que analisaram a expansão do Ki-67 pelos compartimentos proliferativos por método imunohistoquímico com anticorpo monoclonal Ki-67 (MIB-1), e observaram uma maior taxa de proliferação (33,5%) na zona glandular dos pacientes com esôfago de Barrett sem displasia. Com esses dados, pode-se também concluir que a distribuição e o aumento da imunorreatividade pelo Ki-67, nos compartimentos proliferativos, correlacionam-se com os achados histológicos na seqüência esôfago de Barrett sem displasia – displasia de baixo grau – displasia de alto grau.

Chen et al (45) estudaram a expressão imunohistoquímica do Ki-67 e COX-2 em 10 pacientes com mucosa escamosa normal, 15 pacientes com esofagite de refluxo severa e 25 pacientes com esôfago de Barrett. Os autores não encontraram diferença significativa do índice Ki-67 entre os pacientes com esofagite e esôfago de

Barrett, mas ambos os grupos diferiram estatisticamente dos pacientes com mucosa escamosa normal.

Quando comparamos em nosso trabalho os grupos esofagite crônica, mucosa escamosa normal e epitélio colunar com metaplasia intestinal, observamos diferença significativa entre os mesmos ($p < 0,01$). Além disso, observamos também que índices elevados da proliferação celular surgiram, principalmente, na presença da metaplasia intestinal, demonstrando que essa atividade proliferativa está também relacionada ao processo de intestinalização da mucosa colunar no esôfago distal.

Os achados do presente estudo, nos permitem afirmar que as alterações moleculares medidas pela expressão da proteína p53 foram progressivamente maiores, quanto pior a alteração histológica decorrente da DRGE. Paralelamente, as alterações proliferativas, medidas pela expressão do Ki-67, comportaram-se da mesma forma, havendo em ambos marcadores uma correlação positiva entre o aumento de sua expressão e a piora histológica. É possível que os mecanismos de lesão que produzem o aumento da atividade proliferativa sejam os mesmos que produzem as alterações moleculares que levam ao câncer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Voutilainen M, Sipponen P, Mecklin Jp, Juhola M, Farkkila M: Gastroesophageal reflux disease: prevalence, clinical, endoscopic and histopathological findings in 1128 consecutive patients referred for endoscopy due to dyspeptic and reflux symptoms. *Dig* 2000, 61:6-13.
2. Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, Sontag SJ. There are no reliable symptoms for erosive esophagitis and Barrett's oesophagus: endoscopic diagnosis is still essential. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16 (4):735-42.
3. Moraes-Filho JPP, Ceconello I, Gama-Rodrigues J, Castro LP, Henry MA, Meneghelli UG, Quigley E, Brazilian Consensus Group. Brazilian consensus on gastroesophageal reflux disease: proposals for assessment, classification, and management. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:241-248.

4. Achem SR. Endoscopy negative gastroesophageal reflux disease. The hypersensitive esophagus. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28:893-904.
5. Younes M, Ertan A, Lechago LV, Somoano JR, Lechago J. p53 protein accumulation is a specific marker of malignant potential in Barrett's metaplasia. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 697-701.
6. Gillen P, Keeling P, Byrne PJ, West AB, Hennessy TP. Experimental columnar metaplasia in the canine oesophagus. *Br J Surg* 1988; 75: 113-115.
7. Bremner CG, Lynch VP, Ellis HF. Barrett's esophagus: congenital or acquired? An experimental study of esophageal mucosal regeneration in the dog. *Surgery* 1970; 68: 209-216.
8. Sampliner RE. Practice guidelines on the diagnosis, surveillance, and therapy of Barrett's esophagus. The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterol. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(7):1028-1032.
9. Cameron AJ, Zinsmeister AR, Ballard DJ, Carney JA. Prevalence of columnar-lined (Barrett's) esophagus. Comparison of population-based clinical and autopsy findings. *Gastroenterol* 1990; 99(4):918-922.
10. Lieberman DA, Oehlke M, Helfand M. Risk factors for Barrett's esophagus in community-based practice. *Am J Gastroenterol* 1997; 92:1293-1297.
11. Devesa S, Blot WF, Fraumeni JF. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998; 83(10):2049-2053.
12. Sharma P, Morales TG, Sampliner RE. Short segment Barrett's esophagus: the need for standardization of the definition and endoscopic criteria. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(7):1033-1036.
13. Hameeteman W, Tytgat GN, Houthoff HJ, van den Tweel JG. Barrett's esophagus: development of dysplasia and adenocarcinoma. *Gastroenterol* 1989; 96(5):1249-1256.
14. Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's Adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001; 233(3):322-37.

15. Lagergren J, Bergstrom R, Nyren O. Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Ann Intern Med* 1999; 130(11):883-890.
16. Cameron AJ, Ott BJ, Payne WS. The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus. *N Engl J Med* 1985; 313: 857-9.
17. El Serag HB, Mason AC, Petersen N, Key CR. Epidemiological differences between adenocarcinoma of the oesophagus and adenocarcinoma of the gastric cardiac in the USA. *Gut* 2002; 50(3):368-372.
18. Krishnadath KK, Tilanus HW, Blankestein MV, Bosman FT, Mulder AH. Accumulation of p53 protein in normal, dysplastic, and neoplastic Barrett's oesophageal. *J Pathol* 1995; 75:175-180.
19. Neshat K, Sanchez CA, Galipean PC, et al. p53 mutation in Barrett's adenocarcinoma and high grade dysplasia. *Gastroenterol* 1994; 106: 1589-1595.
20. Nigro JM, Baker SJ, Preiseinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Brigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Volgestein B. Mutations in the p53 gene occur in diverse human types. *Nature* 1989; 342: 705-8.
21. Bennett WP, Hollstein MC, He A, et al. Archival analysis of p53 genetic and protein alterations in Chinese esophageal cancer. *Oncogene* 1991; 6:1779-1784.
22. Younes M, Lebovitz RLM, Lechago LV, Lechago J. p53 protein accumulation in Barrett's metaplasia, dysplasia and carcinoma: a follow-up study. *Gastroenterol* 1993; 105: 1637-142.
23. Hong MK, Laskin WB, Herman BE, et al. Expansion of the Ki-67 proliferative compartment correlates with degree of dysplasia in Barrett's esophagus. *Cancer* 1995; 75: 423-429.
24. Herbst JJ, Berenson MM, McCloskey DW, Wisner WC. Cell proliferation in esophageal columnar epithelium (Barrett's esophagus). *Gastroenterol* 1978; 75: 683-687.
25. Gerdes J, Becker MH, Key G, Cattoretti G. Immunohistological detection of tumor growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 1992; 168(1): 85-6.

26. Gerdes J, Lemke H, Braisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle of a proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984, 133: 1710-15.
27. Polkowski W, van Lanschot JJ, ten Kate FJ, et al. The value of p53 and Ki-67 as markers for tumor progression in the Barrett's dysplasia-carcinoma sequence. *Surg Oncol* 1995; 4: 163-171.
28. Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS. Barrett's esophagus: cell cycle abnormalities in advancing stages of neoplastic progression. *Gastroenterol* 1993; 105(1):119-129.
29. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathol* 1990; 17 (6):489-503.
30. Flora-Filho R, Câmara-Lopes LH, Zilberstein B. Critérios histológicos na doença do refluxo gastroesofágico. Reavaliação da sensibilidade da pHmetria esofágica de 24 horas. *Arq Gastroenterol*. 2000; 37(4): 1-10.
31. Siewert JR, Holscher AH, Becker K, Gossner W. [Cardia cancer: attempt at a therapeutically relevant classification]. *Chirurg* 1987; 58(1):25-32.
32. Wang LD, Hong JY, Qiu SL et al. Accumulation of P53 protein in human esophageal precancerous lesions: a possible early biomarker for carcinogenesis. *Cancer Res* 1993; 53:1783-1787.
33. Feith M, Stein HJ, Mueller J, Siewert JR. Malignant degeneration of Barrett's esophagus: the role of the Ki-67 proliferation fraction, expression of E-cadherin and p53. *Dis Esophagus* 2004; 17(4):322-327.
34. Weston AP, Banerjee SK, Sharma P, Tran TM, Richards R, Cherian R. p53 protein overexpression in low grade dysplasia (LGD) in Barrett's esophagus: immunohistochemical marker predictive of progression. *Am J Gastroenterol*; 2001 96(5): 1355-62.
35. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340(11):825-831.

36. Ramel S, Reid BJ, Sanches CA, Blount PL, Levine DS, Neshat K, Haggitt RD, Dean PJ, Thor K, Rabinovitch PS. Evaluation of p53 protein expression in Barrett's esophagus by two-parameter flow cytometry. *Gastroenterol* 1992; 102: 1220-1228.
37. Polkowski W, Van Lanschot JJB, Offerhaus GJA. Barrett esophagus and cancer: pathogenesis, carcinogenesis, and diagnostic dilemmas. *Histopathol* 1999; 14: 927-944.
38. Mandard AM, Marnay J, Lebeau C, Benar S, Mandar JC. Expression p53 in oesophageal squamous epithelium from surgical specimens resected for carcinoma of the esophagus, with special reference to uninvolved mucosa. *J Pathol* 1997; 181(2):153-7.
39. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferation cells in microwave-processed formal in fixed paraffin section. *J Pathol* 1992; 168: 357-63.
40. Adulaimi D; Jankowski J. Barrett's esophagus: an overview of the molecular biology. *Dis Esophagus* 1999; 12(3): 177-80.
41. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-6.
42. Clark GW, Ireland AP, DeMeester TR. Dysplasia in Barrett's esophagus: diagnosis, surveillance and treatment. *Dig Dis* 1996; 14(4):213-227.
43. Nishiyama Y, Koyama S, Andoh A, Moritani S, Kushima R, Fujiyama Y, Hattori T, Bamba T. Immunohistochemical analysis of cell cycle-regulating-protein (p21, p27, and Ki-67) expression in gastroesophageal reflux disease. *J Gastroenterol* 2002; 37(11): 905-11.
44. Porschen R, Kriegel A, Langen C, Classen S, Hilse M, Lohe B et al. Assessment of proliferative activity in carcinomas of the human alimentary tract by Ki-67 immunostaining. *Int J Cancer* 1991; 47(5):686-691.
45. Chen X, Ouyang Q, Zhang WY, Li XS, Liang HL. The clinical, pathological features and expression of Ki-67 and COX-2 in severe reflux esophagitis and Barrett's esophagus. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2005; 36(2): 207-9.

46. Iftikhar SY, Steele RJ, Watson S, James PD, Dilks K, Hardcastle JD. Assessment of proliferation of squamous, Barrett's and gastric mucosa in patients with columnar lined Barrett's oesophagus. *Gut* 1992; 33(6):733-737.
47. Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS. Barrett's esophagus: cell cycle abnormalities in advancing stages of neoplastic progression. *Gastroenterol* 1993; 105(1):119-129.
48. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. Barrett's esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterol* 1987; 93(1):1-11.
49. Yoshikawa I, Yamasaki M, Kume K, Tabaru A, Otsuki M. Lugol chromoendoscopy as a diagnostic tool in so-called endoscopy-negative GERD. *Gastrointest Endosc.* 2005; 62 (5): 698-703.
50. Fagundes R B, Melo C R, Putten A C, Moreira L F, Barros S G. p53 immunoexpression: an aid to conventional methods in the screening of precursor lesions of squamous esophageal cancer in patients at high-risk? *Cancer Detect Prev.* 2005; 29 (3): 227-32.
51. Casson AG, Mukhopaday T, Cleary KR, Ro JY, Levin B, Roth JA. P53 gene mutations in Barrett's epithelium and oesophageal cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 4495-4499.
52. Segal F, Kaspary AP, Prolla JC, Leistner S. p53 protein overexpression and p53 mutation analysis in patients with intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's esophagus. *Cancer Lett* 2002; 210(2): 213-8
53. Kim R, Clarke MR, Melhem MF, Young MA, Vanbibber MM, Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro U, Reynolds JC. Expression of p53, PCNA, and C-erbB-2 in Barrett's metaplasia and adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 1997 42: 2453-62
54. Rice TW, Goldblum JR, Falk GW, Tubs RR, Kirby TJ, Casey G. p53 Immunoreactive in Barrett's metaplasia, dysplasia, and carcinoma. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1996; 111: 323-31
55. Jankowski J, Coghill G, Hopwood D, et al. Oncogenes and oncosupressor genes in adenocarcinoma of the esophagus. *Gut* 1991; 32: A1205-6.

56. Oberg S, Peters JH, DeMeester TR, et al. Inflammation and specialized intestinal metaplasia of cardiac mucosa is a manifestation of Gastroesophageal reflux disease. *Ann Surg* 1997; 226(4): 522-530
57. Kauer WK, Peters JH, DeMeester TR, Ireland AP, Bremner CG, Hagen JA. Mixed reflux of gastric and duodenal juices is more harmful to the esophagus than gastric juice alone. The need for surgical therapy re-emphasized. *Ann Surg* 1995; 222(4):525-531.
58. DeMeester SR, DeMeester TR. Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus: fifty years of controversy. *Ann Surg* 2000; 231(3):303-321.
59. Gurski RR, Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR, Bremner CG, Chandrasoma PT et al. Barrett's esophagus can and does regress after antireflux surgery: a study of prevalence and predictive features. *J Am Coll Surg* 2003; 196(5):706-712.
60. Carlson et al. Acid suppression therapy may not alter malignant progression in Barrett's metaplasia showing p53 protein accumulation. *American Journal of Gastroenterology* 2002; 97(6): 1340-1345
61. Suspiro A, Pereira DA, Afonso A, Albuquerque C, Chaves P, Soares J, Leitão CN. Losses of heterozygosity on chromosomes 9p and 17p are frequent events in Barrett's metaplasia not associated with dysplasia or adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:728-734
62. Schmidt MK, Meurer L, Volkweis BS, Edelweiss MI, Schirmer CC, Kruel CDP, Gurski RR. c-Myc overexpression is strongly associated with metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Dis Esophagus* 2007; 20: 212-216.

ANALYSIS OF P53 PROTEIN AND KI-67 (MIB-1) ANTIGEN EXPRESSION IN THE ESOPHAGEAL MUCOSA OF PATIENTS IN THE GASTROESOPHAGEAL REFLUX DISEASE – BARRETT’S ESOPHAGUS – ADENOCARCINOMA

** (pré-artigo em Inglês para ser enviado à Revista Gastroenterology)*

Authors:

Marcelo Binato

Renato Borges Fagundes

Luise Meurer

Maria Isabel Edelweiss

Richard Ricachenevsky Gurski

Place:

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) – General Surgery and Pathology Unit.

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – CEP 90035-003. Bairro Rio Branco – Porto Alegre – RS – Brasil. Fone: (51) 2101.8000.

Correspondence Address:

Marcelo Binato

Rua Francisco Manoel N° 01/ AP 202 CEP 97015-260

Santa Maria – RS – Brasil. Fone: (55) 32225693

Email: mbinato@uol.com.br

ABSTRACT

Introduction: Gastroesophageal reflux disease (GERD) is a main risk factor for the development of esophageal adenocarcinoma. Many molecular alterations occur in esophageal carcinogenesis, yet the exact mechanism of adenocarcinoma development remains unknown.

Objectives: Determine p53 protein and Ki-67 (MIB-1) expression in the esophageal mucosa of patients with GERD and establish a correlation between these markers and the normal squamous epithelium – chronic esophagitis – columnar epithelium with or without intestinal metaplasia – adenocarcinoma sequence.

Methods: The p53 protein and Ki-67 (MIB-1) expression was determined by immunohistochemical analysis of 235 patients, divided into five groups: G1- 58 patients with normal squamous epithelium, G2: 80 patients with chronic esophagitis, G3: 30 patients with columnar epithelium without intestinal metaplasia (IM), G4: 32 patients with columnar epithelium with intestinal metaplasia and G5: 35 patients with adenocarcinoma. The materials used in the study were obtained from endoscopic biopsy specimens from GERD patients and from patients with esophageal adenocarcinoma, between January 2003 and December 2006.

Results: p53 protein overexpression was found in 7% in G1, 37.5% in G2, 30% in G3, 62.5% in G4 and 71.4% in G5 ($p < 0.001$). The increase of the Ki-67 index was also proportionally higher in accordance with the more severe results of the histopathological diagnosis, being of $21.3 \pm 19.5\%$ in G1, $38.8 \pm 24.9\%$ in G2, $37.7 \pm 26.3\%$ in G3, $52.8 \pm 24.6\%$ in G4 and $57.1 \pm 25.1\%$ in G5 ($p < 0.001$). Linear correlation between the increase of both molecular markers and the evolution of the squamous epithelium – adenocarcinoma sequence ($p < 0.001$ and $p < 0.05$) was noticed.

Conclusion: Overexpression of the p53 protein and Ki-67 (MIB-1) index of cell proliferation were found to be correlated with the evolution of adenocarcinoma in patients suffering from GERD. Alteration in cell proliferation activity, as assessed by Ki-67, corresponded to molecular alteration of the p53 gene, which suggests it may be associated to alterations of this marker.

Keywords: p53. Ki-67 (MIB-1). GERD. Barrett's esophagus. Adenocarcinoma.

INTRODUCTION

Gastroesophageal reflux is one of the most frequent clinical conditions in medical practice affecting more than 30% of the adult population (1;2). A nationwide population-based study estimates that approximately 12% of Brazilian population suffers from gastroesophageal reflux, not including individuals with atypical manifestations (3). Endoscopic evaluation of the esophagus in patients with GERD showed a wide range of findings, such as: esophageal mucosa with no lesions (*non-erosive reflux disease – NERD*), erosive disease, Barrett's esophagus, stenosis and cancer, specially, adenocarcinoma (4;5).

Experimental studies and clinical essays support the theory according to which the columnar mucosa in the distal esophagus is a consequence of the exposure of the squamous epithelium of the esophagus to gastroduodenal contents (6;7). The importance of the squamous epithelium of the esophagus lies in the fact that it may be replaced by abnormal intestinal epithelium, leading to the development of intestinal metaplasia, which characterizes Barrett's esophagus, and to adenocarcinoma (3). Therefore, Barrett's esophagus is defined by the presence of columnar mucosa in the distal esophagus, visible in upper endoscopy, at any length, with intestinal metaplasia with caliciform cells (8) when submitted for anatomopathological examination. It is estimated that 6 to 12% of patients with gastroesophageal reflux symptoms submitted to endoscopic evaluation suffer from Barrett's esophagus (9;10).

Around 64 to 86% of esophageal adenocarcinomas arise from columnar epithelium with intestinal metaplasia, indicating that Barrett's esophagus is by far the most important risk factor in the evaluation of patients with gastroesophageal reflux (11;12). Patients with Barrett's esophagus, which is a premalignant condition, are at a 0.5 to 2% annual risk of developing esophageal adenocarcinoma, that is, a risk 30 to 125 times greater than the

general population (13;14). Esophageal adenocarcinoma is rapidly increasing in developed countries, overcoming the epidermoid carcinoma, and becoming the most common histological type of esophageal neoplasia in some populations. In spite of therapeutic efforts, prognosis in most advanced stages of the disease is bad (15-17).

Due to the risk of evolution to adenocarcinoma of patients with Barrett's esophagus, early identification of malignant changes is of utmost importance. Throughout the carcinogenesis process of the esophagus, a series of multiple genetic alterations causes the epithelial cell to become non-responsive to proliferation and programmed cell death regulation mechanisms. Thus, the cell acquires the ability to proliferate uncontrollably, becoming a neoplastic cell (14).

The evolution of Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma is often associated to structural changes of cell DNA (18). Several molecular alterations are identified in the evolution of squamous epithelium with GERD, to intestinal metaplasia and finally to adenocarcinoma. The most important alterations include change in the cell cycle regulation caused by a malfunction of tumor suppressor genes (p53, APC), oncogenes and cell adhesion molecules (E-cadherin and Catenines) (18).

The Tp53 gene is one of the most studied genes in the evolution of several neoplasias. Located on the short arm of chromosome 17, more precisely in the 17p13.1 region, the Tp53 gene encodes the p53 protein, which aims at delaying the cell cycle and repairing a cell DNA damage, or even inducing apoptosis and preventing mutations in subsequent cell lines (19). Deactivation of Tp53 gene may occur by mutation or interaction with specific oncogenes. The two main molecular events that change the Tp53 gene during tumor progression are the deletion of one allele of chromosome 17p and/or mutation of the second one. Allelic losses are generally associated to mutant forms of Tp53 (19;20).

Mutation of Tp53 gene and p53 protein overexpression are some of the genetic abnormalities most commonly found on human neoplasias (5;21). These alterations have been reported in various types of cancer, including colon, esophagus, stomach, lung, breast, bladder, among others, and in premalignant conditions such as Barrett's esophagus (20). Protein p53 protein overexpression seems to occur early in tumor genesis, is present in the different stages of the metaplasia-adenocarcinoma sequence, being detected in approximately 50 to 90% of adenocarcinomas in Barrett's esophagus (18;20).

Associated to a Tp53 gene malfunction, the increase of cell proliferation may precede the occurrence of dysplastic lesions in Barrett's esophagus (19;22;23). Ki-67 is a nuclear protein expressed in all active stages of the cell cycle (G1, S, G2 e M), but absent in G0 stage – cell rest (24;25), being used as a proliferation marker in a variety of neoplasias (26-28). The exact function of Ki-67 antigen is not well known and it is suggested it may play a significant role in cell cycle regulation. (29). The mechanisms and interactions of the p53 protein expression with the increase of the (Ki-67) index of cell proliferation in esophageal carcinogenesis are still being studied. It is of utmost importance the identification of easily accessible and low-cost tumor markers, which can be used in a wide variety of clinical and pathological situations and allow the selection of subgroups of Barrett's esophagus patients with a molecular profile that indicates they are more prone to develop dysplasia and/or cancer. The present study aims at evaluating the immunohistochemical expression of the p53 protein and the proliferation index by Ki-67 (MIB-1) in the esophageal mucosa in individuals who present all characteristics of gastroesophageal reflux disease: esophageal mucosa with and without esophagitis, columnar mucosa with and without intestinal metaplasia and esophageal adenocarcinoma.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

Patients aged 30 or over, referred to the Digestive Endoscopy Unit of the Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), between January 2003 and December 2006, with typical symptoms of gastroesophageal reflux such as pyrosis and/or regurgitation (at least once a week for a minimum five years) and patients with esophageal adenocarcinoma diagnosed by endoscopy and biopsy were prospectively and consecutively examined. Patients with esophageal adenocarcinoma from the Esophageal, Stomach and Small Intestine Surgery Group at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) with the same diagnosis were also included. Exclusion criteria were as follows: coagulopathy, esophageal stenosis, esophageal varices, hepatopathy, digestive hemorrhage at least over the last 30 days, esophageal epidermoid cancer, previous radiotherapy or chemotherapy treatment, hypersensitiveness to iodine, use of acid suppressor therapy over the last 60 days, esophageal or stomach surgery.

Prior to endoscopic examination, a free and informed consent was obtained from every patient. Also, a questionnaire was completed to help define the demographic and clinical characteristics of the patients (annexes 1 and 2).

Upper Gastrointestinal Endoscopy

A Fujinon 2200 endoscope, inserted by means of a conventional technique, was used for inspection of the esophagus, stomach and duodenum. With the endoscope placed near Z line, chromoscopy was performed with a 3% lugol solution, with the purpose of highlighting the anatomical markers and esophageal mucosal lesions. The main anatomical markers, the alterations in the esophageal mucosa

such as erosions, ulcers and surrounding areas of columnar mucosa and the biopsy areas were recorded in a chart of the esophagus (annex 3). The parameter used to evaluate the size of mucosal lesions was the open biopsy forceps (7 millimeters).

Endoscopic definitions

The detachment of the diaphragm corresponded to the endoscopic impression of the diaphragm muscle. Z line defined the squamous-columnar junction, while the gastro-esophageal junction was defined by the proximal margin of the gastric folds. The size of the hiatus hernia was defined by the distance of Z line to diaphragmatic detachment. The endoscopic graduation of erosive esophagitis was defined by the Los Angeles classification (3). The endoscopic characteristic of the esophagus covered by columnar mucosa was defined by the presence of “salmon color” or “red rosy color” similar to the gastric mucosa, covering the proximal portion of the gastro-esophageal junction. The length of the columnar mucosa was determined by the distance between the proximal and distal margin of the lesion in relation to the incisors (upper dental arch).

Biopsy

Tissue samples were obtained with the help of a forceps with a central stylet. After chromoscopy with lugol solution at least two mucosal fragments were collected, from the more distal point of the lesion to the proximal direction. Depending on the endoscopic finding the fragments were collected two centimeters above the squamous-columnar junction without lesion, at the erosion site or unstained area, and at intervals of 1 to 2 centimeters, in the four quadrants, if the columnar mucosa is visible above the gastro-esophageal junction, according to Seattle protocol. Tissue samples were fixed in 10% formalin solution and embedded in paraffin.

Histological diagnosis criteria

Cuts of sections of the paraffin blocks were stained with Hematoxylin-Eosin (H&E) and Alcian-blue pH 2.5 methods for later analysis in optical microscope by two pathologists of the HCPA Pathology Unit.

The histological findings were classified as follows: normal squamous epithelium, presence of basal layer cells reaching more than 15% of the total epithelial layer, elongation of papillae up to 2/3 of the total epithelial layer, exocytosis (presence of neutrophils and/or eosinophils and/or intraepithelial monocytes), vascular ectasia or extravasation (dilation of venules of the papillae with congestion or extravasation of blood cells into the surrounding epithelium). The histopathological diagnosis of esophagitis was supported by the presence of one or more findings reported above, according to a previous description (30).

The columnar epithelium in the distal esophagus was classified according to the absence of intestinal metaplasia. Barrett's esophagus was defined by the presence of columnar epithelium with caliciform cells (typical villiform pattern), stained with Hematoxylin-Eosin and for the presence of reactivity with Alcian-blue staining. The diagnosis of adenocarcinoma was established by the presence of atypical glands with significant loss of the normal structure, with isolated cells or groups of cells invading the slide itself and the submucosal layer. According to a method established by Cameron et al (16), which used the distance between the core of the tumoral lesion and the squamous-columnar junction to classify adenocarcinomas of the esophagus and cardia, and according to a classification proposed by Siewert (31), patients with adenocarcinoma examined in the present study were classified into three types. Tumors with cores located more than two centimeters above the squamous-columnar junction were classified as adenocarcinoma of the esophagus (Siewert's Type I). Tumors located up to two

centimeters from the squamous-columnar junction, cranial or caudally, were considered to be an adenocarcinoma of the JEG (Siewert's Type II). Tumors located below this level were called subcardial gastric carcinomas (Siewert's Type III). The study included types I and II tumors. Type III tumors were excluded from the analysis because their origin may be other than adenocarcinoma of the esophagus or adenocarcinoma of the JEG (17).

Immunohistochemical analysis

The immunohistochemical study was conducted in the Immunohistochemistry Laboratory of the Department of Pathology of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). 3-micrometer sections were cut from each designed tissue block for histological analysis. For immunohistochemical analysis two poly-L-lysine coated glass microscope slides were used, embedded in paraffin, one slide for p53 antibody and the other one for the Ki-67 (MIB-1). For the determination of the positive reactivity of the referred antibodies, the ABC method was used (avidin-biotin-peroxidase complex, ExtrAvidin Sigma). Sections were deparaffinized by immersion in xylol and dehydrated in alcohol, at different concentrations, and under room temperature (ATA). After deactivation of endogenous peroxidase and blockage of non-specific reactions, antigen recovery was performed in a microwave oven.

The primary antibody p53 (DAKO, code M7001 mouse anti-p53; clones DO-7), was incubated for 15 hours, at 4°C, in the dilution 1:700. The antibody recognizes the wild-type and the mutant form of p53 protein. However, due to the extremely short duration of the wild -type, staining in the core of the tumor cell suggests abnormal accumulation of p53 protein. The primary antibody Ki-67 (DAKO, code MU2970397 mouse anti Ki-67; clones MIB-1) was incubated for 15 hours, at 4°C, in the dilution 1:400. The streptavidine-biotin complex was used to locate the primary

antibody in both markers, whereas the diaminobenzidine-tetrahydrochloride was used as chromogen. Counterstaining was performed with the use of Hematoxylin-Haans. Material from breast cancer for the p53 protein and from caecal appendix for the Ki-67 protein was used as positive control. As negative control a slide was used without the inclusion of the primary antibody.

The evaluation of the p53 protein considered the proportion of stained cells in a minimum 10 visual fields of high magnification (400X). The parameter used to define the p53 protein expression was the presence of staining in the core as shown by Wang et al (32). The positive cases were those with more than 10% of stained cells by microscopic field of high magnification.

Concerning the Ki-67 (MIB-1) antigen, the result was assessed with the use of the Ki-67 index for every case, which is calculated from the average of stained cells and the total analyzed cells, with a minimum count of 500 cells, as previously described by Feith et al (33).

Immunohistochemical reading of the slides was independently performed by two pathologists from the Department of Pathology of the HCPA, with experience in gastrointestinal pathology, who had no previous knowledge of related clinical and endoscopically information. In case of disagreement, the final result was obtained by consensus between both pathologists, as described by Weston et al (34).

Sample Calculation

The formula for comparison of sample proportions was used here. For $\alpha=0.05$ and 90% power, an approximate sample of 210 patients was calculated, to make it possible to obtain a difference of 10 to 45% of p53 positive and a modified Ki-67 in the several groups (degrees of esophagitis and specialized intestinal metaplasia).

Statistical Analysis

The Statistical Package for Social Science (SSPS) 12.0 version was used for data processing and storage. The statistical test used for comparative analysis of the p53 protein between the groups was the chi-square test of linear trend. The Ki-67 data was shown in averages and standard deviations. The continuous variables were compared between categories of the variance analysis (ANOVA). The identification of differences, whenever present, was made by the Tukey test. Linear correlation of p53 and Ki-67 variables with their respective groups were analyzed by the Kendall and Pearson correlation coefficient, respectively. It was considered to be significant when $p < 0.05$. Kappa test was used to control interobserver agreement.

Ethical considerations

The Project of the present study was previously evaluated and approved by the Group of Research and Post graduation (GPPG) of the HCPA, according to all recommended ethical norms. Patients were submitted to upper endoscopy and received the care of the Inpatient Gastroenterology Unit of the HUSM. All patients gave their free and informed consent by signing the Informed Consent form (TCLE), with privacy of the collected data being ensured. For patients with adenocarcinoma of the esophagus from the HCPA the material used was obtained from the HCPA's Pathology Unit, without the direct participation of patients. Also, there was no change in the protocol of treatment following the research. The clinical data used in this study, collected from records of patients of this group, was made anonymous and kept secret, according to the Term of Commitment to Data Use. The study was conducted in compliance with the norms established under the resolution 196/96 of the Brazilian Medical Council and approved by the UFSM Research Ethics Committee and the GPPG/HCPA.

RESULTS

From January 2003 to December 2006, 511 patients who met the selected criteria were examined. Of this total, were excluded 262 patients that did not follow the biopsy protocol proposed the study (table 1), and also 15 losses of which, 9 cases for diagnosis histological not conclusive and 6 cases for difficulty in evaluation marked by the technical imunohistoquímica.

Tabela 1 . Excluded situations before upper gastrointestinal endoscopy	
✓ Coagulopathy (13)	✓ Hepatopathy (7)
✓ Use Anticoagulants or AINES (23)	✓ Associate Neoplasia (24)
✓ Radiotherapy or chemotherapy (17)	✓ Hypersensitiveness to iodine (4)
✓ Gastro-esophageal varices (10)	✓ Use of acid suppressor therapy (92)
✓ Refusal of the patient (6)	✓ Esophageal or stomach surgery (18)
✓ Barrett's esophagus diagnosed (21)	✓ Adenocarcinoma Siewert's type III (17)
✓ Digestive hemorrhage (9)	

235 patients were included and divided into five groups according to the anatomopathological examination of esophageal samples, as follows: 58 patients with normal squamous epithelium (group 1), 80 patients with chronic esophagitis (group 2), 30 patients with columnar epithelium without intestinal metaplasia (group 3), 32 patients with columnar epithelium with intestinal metaplasia (group 4) and 35 patients with adenocarcinoma of the esophagus (group 5). 235 patients were selected and divided into five groups according to the anatomopathological examination of esophageal samples, as follows: 58 patients with normal squamous epithelium (group 1), 80 patients with chronic esophagitis (group 2), 30 patients with columnar epithelium without intestinal metaplasia (group 3), 32 patients with columnar epithelium with intestinal metaplasia (group 4) and 35 patients with adenocarcinoma of the esophagus (group 5).

The demographic characteristics of the 235 patients are shown in Table 1. Most patients in group 1 were females compared to the other groups ($p < 0.05$). The average age was higher in the adenocarcinoma group compared to the other groups ($p < 0.05$),

except for patients with metaplastic columnar mucosa. There was no significant difference between the groups concerning race.

Table 2. Demographic characteristics of patients.

	Group 1 (normal) n=58	Group 2 (esophagitis) n=80	Group 3 (columnar) n=30	Group 4 (columnar IM) N=32	Group 5 (ACE) n=35	Total n=235	Value p
Age (average±DP)	50.4±13,8	53.4±15.2	54.2±16.8	58.2±12.6	64±8.6	55±14.5	0.041
Sex (%)							<0.05
Male	13 (22.4)	42 (52.5)	17 (56.7)	21 (65,6)	30 (85,7)	123 (52,3)	
Female	45(77.6) [∞]	38 (47.5)	13 (43.3)	11 (24.4)	5 (14.3)	112 (47,7)	
Race							0,503
Caucasian	55 (95)	72 (90)	25 (83.3)	28 (87.5)	32 (91.4)	212 (90,2)	
Black/Mixed	3 (5)	8 (10)	5 (16.7)	4 (12.5)	3 (8.6)	23 (9.8)	

[∞] G1 is different from the other groups (p<0.05)

Concerning the p53 protein expression, 4 (7%) patients with normal epithelium showed positive reactivity for p53 protein. 30 (37.5%) out of the 80 patients with chronic esophagitis were positive. p53 protein was positive in 9 (30%) out of the 30 patients with columnar epithelium without intestinal metaplasia and 20 (62.5%) out of the 32 patients with columnar epithelium with intestinal metaplasia. 25 (71.4%) patients, out of the 35 patients with adenocarcinoma diagnosis were found to be positive for the p53 protein (Figure 1).

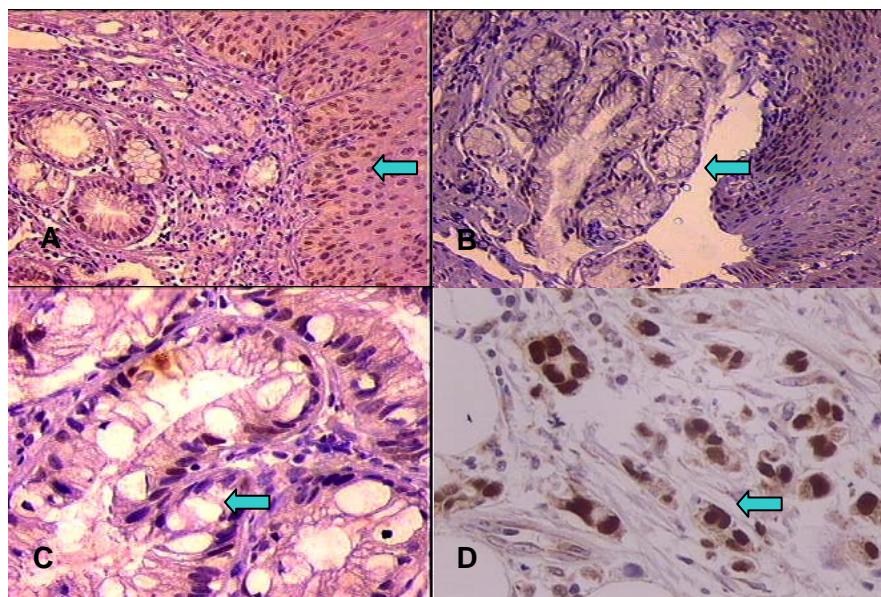


Figure 1. Micro photography of the immunohistochemical expression of the p53 protein (arrows): Esophagitis (A), Columnar epithelium without intestinal metaplasia (B), (x 100); Columnar epithelium with intestinal metaplasia (C) and Adenocarcinoma (D), (x 200).

The comparative analysis of positive reactivity of the immunohistochemical expression of the p53 protein showed a statistically significant difference between all groups in relation to the normal epithelium group (Figure 2). The esophagitis group also differed from the adenocarcinoma group. Differences were also found between the group with columnar epithelium without intestinal metaplasia and the adenocarcinoma group ($p < 0.01$).

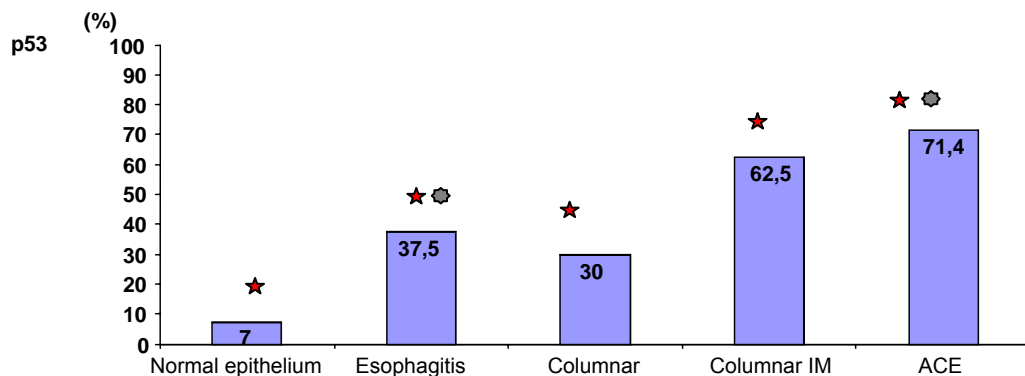


Figure 2. p53 activity in the normal epithelium- esophagitis – columnar without and with IM – adenocarcinoma sequence: ★ $p < 0,001$ G1 between G2, G3, G4 and G5; ✿ $p < 0,05$ between G2 and G5; ▼ $p < 0,01$ between G3 and G5.

A positive correlation between p53 protein increase and the evolution of the normal epithelium – esophagitis – columnar without intestinal metaplasia – columnar with intestinal metaplasia adenocarcinoma sequence ($p < 0.001$) (Figure 3).

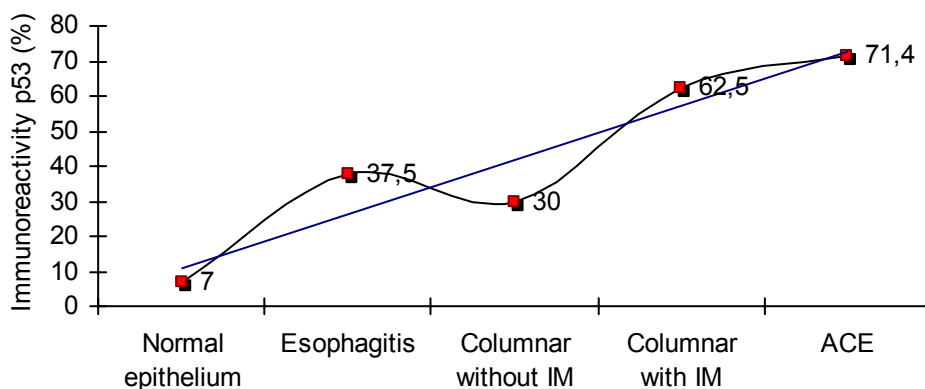


Figure 3. Correlation p53 and evolution normal epithelium – esophagitis – columnar without and with intestinal metaplasia/IM – adenocarcinoma and 0.4 Kendall Coefficient.

The average index of stained cells for the Ki-67 was $39 \pm 26.7\%$. The averages were $21.3 \pm 19.5\%$ in patients with normal squamous epithelium, $38.8 \pm 24.9\%$ in patients with chronic esophagitis $37.7 \pm 26.3\%$ in patients with columnar epithelium without intestinal metaplasia, $52.8 \pm 24.6\%$ in patients with columnar epithelium with intestinal metaplasia and $57.1 \pm 25.1\%$ in patients with adenocarcinoma (Figure 4).

There was a significant difference in the Ki-67 index between the normal squamous epithelium group and the other groups ($p < 0.001$). The chronic esophagitis group differed from all other groups except the columnar epithelium without intestinal metaplasia group ($p = 1.000$). No significant difference was found between the columnar epithelium without intestinal ($p = 0.096$), which did not differ either from the patients with adenocarcinomas ($p = 0.948$). There was a significant difference in the Ki-67 index between patients with adenocarcinoma and those with columnar epithelium without intestinal metaplasia ($p < 0.05$) according to Figure 5.

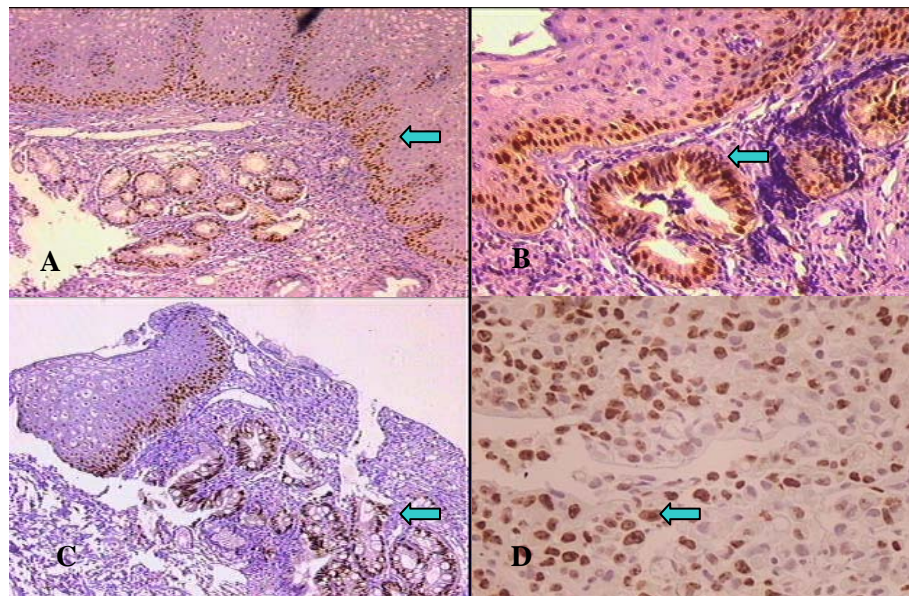


Figure 4 Microphotography of the immunohistochemical expression of Ki-67 (MIB-1) antigen – arrows: Esophagitis (A), columnar epithelium without intestinal metaplasia (B), (x 100); columnar epithelium with intestinal metaplasia (C) and adenocarcinoma (D), (x 200). The Ki-67 score represents a percent of stained cores in every field analyzed.

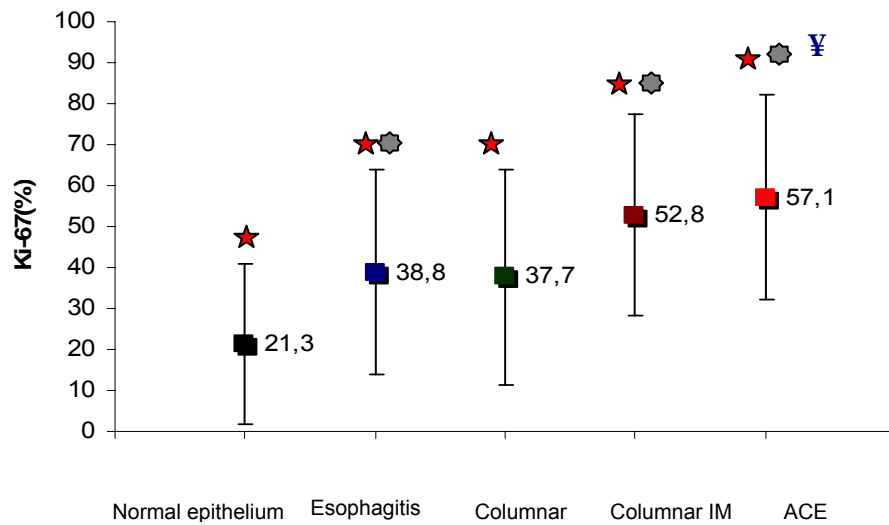


Figure 5. Ki-67 activity in the normal epithelium- esophagitis – columnar epithelium without and with IM – adenocarcinoma sequence: ★ $p < 0.001$ G1 between G2, G3, G4 and G5; ✱ $p < 0.05$ G2 between G4 and G5; ¥ $p < 0.05$ between G3 and G5

A positive correlation was identified between the increase of Ki-67 and the evolution normal epithelium – esophagitis – columnar without intestinal metaplasia – columnar with intestinal metaplasia – adenocarcinoma sequence ($p < 0.05$) (Figure 6).

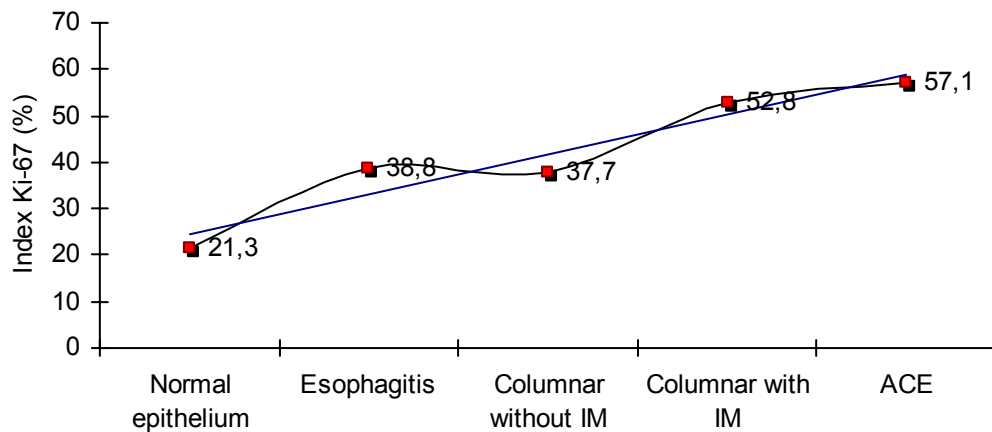


Figure 6. Correlation between Ki-67 and evolution normal epithelium- esophagitis – columnar epithelium without and with IM – adenocarcinoma. Pearson's Coefficient = 0.4.

DISCUSSION

The gastroesophageal reflux disease constitutes the most important and specific risk factor for carcinogenesis of the esophagus, particularly the adenocarcinoma of the esophagus (35). The inflammation-carcinoma correlation has been studied through the measurement of increase and the alteration in the function of genes that control the cell cycle, such as the p53 tumor suppressor gene (19;23;36;37). Recent advances in molecular biology have encouraged efforts to characterize specific molecular events occurring during the stages of the gastroesophageal reflux disease.

Method

The technique chosen to analyze samples of the esophageal mucosa was the immunohistochemical study. This method has been used in the investigation of various genes, including the study of the Tp53 tumor suppressor gene and the Ki-67 nuclear antigen in gastrointestinal carcinogenesis (20;21;38-40). Under normal conditions, the Tp53 gene generates a short-lived protein (p53 normal), which cannot be detected by the immunohistochemical method. In case of mutation, the altered Tp53 gene produces a more stable protein which extends the short life by 6 hours, and the intra-nuclear accumulation makes it possible its identification by the immunohistochemical method (19;22;34;38). The main reasons for the use of the immunohistochemical method include its practicability, availability and the possibility of comparing results with other techniques such as flow cytometry (36). However, the use of immunohistochemistry should be carefully considered once the absence of the p53 protein expression does not necessarily exclude the existence of mutations. Besides, some types of viruses (adenoviruses and papillomaviruses) may cause

alterations in p53 protein stability, allowing its detection by immunohistochemistry and determining false positive results (20;22). For some authors, another significant limitation of this technique is the difficulty in reproducing the evaluation results in order to obtain the agreement of different pathologists (27). In the present study, however, there was a high level of agreement between pathologists (kappa value=0.66).

The flow cytometry technique allows the analysis of a large number of cells, being used to assess cell proliferation (Ki-67) and the changes in DNA contents. The results of this method did not show significant differences in the total Ki-67 count considering the stratification of patients in Barrett's esophagus with and without dysplasia and adenocarcinoma (46;47). Also, the flow cytometry technique has other limitations such as the need of fresh tissue samples, tissue architecture compromise, and the fact that it requires expensive equipment and skilled labor since it is a more sophisticated technique (36;48). In the present study, the immunohistochemical expression of cell proliferation was assessed by the use of the monoclonal MIB-1 antibody which is capable to detect the Ki-67 antigen in tissues fixed in formalin and embedded in paraffin.

The tissue samples of the esophageal mucosa studied here were obtained from digestive endoscopy performed with the help of a forceps with a central stylet. Like Nishiyama et al (43), we have used the forceps with a central stylet that allows a more accurate biopsy, with a less unbiased sample. Besides, we obtained a larger amount of tissue with the inclusion of the slide without any further complications, such as bleeding.

Chromoscopy with Lugol solution has been used by many researchers as an ancillary method of investigation in the endoscopic diagnosis of lesions which may

not be detected by conventional endoscopic examination, particularly in the population at a higher risk of developing esophageal cancer (49;50). It is a simple, low-cost method that does not take very long and can be routinely used in digestive endoscopy units. Lugol solution reacts with the squamous cell constituents and defines with accuracy the presence and the distal limit of the squamous epithelium, improving the visual evaluation of Z line characteristics in the esophagus. The referred aspects led us to select this coloring solution for routine use in the study patients.

Results

The development of esophageal adenocarcinoma is associated to the progressive accumulation of genetic abnormalities involving several oncogenes and tumor suppressor genes. According to Nowell's theory, this process presupposes the early occurrence of genomic instability followed by clonal expansion of genetically modified cells (14). Little is known about molecular alterations that occur in Barrett's esophagus. The loss of Tp53 gene function associated to the increase of cell proliferation is likely to play a significant role in the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma (18;27) sequence.

Endoscopic surveillance of patients with Barrett's esophagus to detect dysplastic alterations is the current strategy to anticipate the risk for progression to adenocarcinoma of the esophagus (8;18). Dysplasia is considered to be a histological expression of damage to cell DNA that precedes malignant transformation. Unfortunately, the medical literature suggests dysplasia is an imperfect marker of cancer risk, particularly that related to Barrett's esophagus, for many reasons, such as intra and interobserver variations in the interpretation of

dysplastic alterations and low predictive value in dysplasia evolution (progression, persistency or regression) (8;22;42). Consequently, the search for new biological markers and the better understanding of the pathogenesis of the gastroesophageal reflux disease can help identify patients with increased risk for malignant transformation. The present study aimed at analyzing the p53 protein expression and proliferation index Ki-67 (MIB-1) along the squamous mucosa – chronic esophagitis – columnar epithelium without intestinal metaplasia – columnar epithelium with intestinal metaplasia – adenocarcinoma sequence.

Immunohistochemical analysis of the p53 protein expression identified a positive reactivity in the normal epithelium, chronic esophagitis, columnar epithelium without intestinal metaplasia, columnar epithelium with intestinal metaplasia and adenocarcinoma groups of 7%, 37,5%, 30%, 62.5% and 71.4%, respectively. Such results showed a linear correlation of the positive p53 protein along the events experienced by patients without epithelial alteration, patients with inflammatory process of the squamous mucosa, patients with columnar mucosa with and without intestinal metaplasia and patients with cancer. The large number of patients of the studied sample and the high index of statistical significance showed by the chi-square test for linear trend ($p < 0.001$) must be mentioned here. We also noticed that the p53 protein expression increases significantly after the occurrence of intestinal metaplasia, which emphasizes the importance of this finding in the progression to adenocarcinoma of the esophagus.

Our study identified 7% of positive reactivity for the p53 protein in histologically normal patients. Immunoreactivity distribution in this group was restricted to the basal layer of the squamous epithelium and in all cases it showed a faded color when examined in an optical microscope. In a similar way, Krishnadath et

al (18) have studied the immunohistochemical expression of the p53 protein (DO-7) in a normal mucosa and detected a faded nuclear color in the basal layer, in 24 samples of esophageal mucosa used as control group.

The 62.5% positive reactivity of the p53 protein in patients with columnar epithelium with intestinal metaplasia and of 71.4% among those patients with adenocarcinoma corroborate the results obtained by Casson et al (51), who identified a modified expression of the p53 protein in 50% of the patients with intestinal metaplasia without dysplasia, whereas Krishnadath et al (18) reported immunoreactivity for the p53 protein in 83% of the patients with adenocarcinoma of the esophagus. Segal et al (52) have studied the p53 protein expression using the immunohistochemical method (DO-7) and molecular analysis of the Tp53 gene (PCR) in 68 patients with diagnosis of chronic esophagitis (27 patients), Barrett's esophagus (21 patients) and Cardia Intestinal Metaplasia (20 patients). They have identified total positive reactivity of the p53 protein in 56.1%. In patients with Barrett's esophagus and Cardia Intestinal Metaplasia positive reactivity was 60.9% and 39.1%, respectively. Although the authors stressed the limitations of the immunohistochemical method in the interpretation of the immunoreactivity of the p53 protein, they concluded that p53 protein overexpression is common in patients with Barrett's esophagus and Cardia Intestinal Metaplasia. Ramel et al (36), who have also studied the immunohistochemical expression of the p53 protein in the stages of progression of Barrett's esophagus, detected positive reactivity of p53 protein in 5% of the patients with Barrett's esophagus without dysplasia, 15% in low degree dysplasia, 45% in high degree dysplasia and 53% in adenocarcinoma.

Kim et al (53) have analyzed, together with the PCNA and c-erB-2, p53 protein expression in 43 pieces of esophagectomy by adenocarcinoma or high

degree dysplasia. They have identified a 36% positive reactivity of the p53 in areas of the Barrett's esophagus without dysplasia, 30% in low degree dysplasia, 85% in high degree dysplasia and 90% in adenocarcinoma of the esophagus. These authors concluded that the p53 protein overexpression is a relatively precursor event in Barrett's esophagus carcinogenesis, and is related to the increase of cell proliferation assessed by the PCNA.

Rice et al (54) have studied the p53 protein expression in 28 pieces of esophagectomy. They did not detect immunoreactivity for the p53 protein in patients with Barrett's esophagus without dysplasia or with low degree dysplasia. The reason why the referred studies did not identify immunoreactivity of the p53 protein in the abovementioned patients could be the use of variations of the immunohistochemical method to perform antibody dilution, paraffin fixation, and interpret the nuclear color intensity (5;54;55). Such variations may interfere with the results.

Weston et al (34) have studied the p53 protein expression, using the immunohistochemical method, in 48 patients with Barrett's esophagus and low degree dysplasia during 81 months of endoscopic surveillance. According to them, the number of p53 positive patients was significantly higher in patients with persistent dysplasia (25%) and progressive dysplasia (60%) compared to patients with regression (13%). They also found that the percent of positive cells in the glandular mucosa around the dysplastic areas was a predictive factor in the evolution of Barrett's esophagus to high degree dysplasia and adenocarcinoma. Some questions could be posed here concerning the use of a small number of cases in each analysis group and the fact that p53 protein expression was not calculated in a control group. Such data is consistent with the data reported by Younes et al (22) who have also shown the importance of immunoreactivity of the p53 protein in the evolution of

histological alterations of patients with Barrett's esophagus.

The modified expression of the Tp53 tumor suppression gene occurs in a wide variety of human tumors (20;38;41). Its frequent association with a reserved prognosis of such neoplasias indicates the important role of this gene in tumor progression (22;42). The high index of positive reactivity of the p53 protein expression found in adenocarcinoma samples (71.4%) in the present study suggests that the modified expression of this gene is an important event, among others, in the development of esophageal cancer. Our study has also shown a percent of positive reactivity of the p53 protein similar between the chronic esophagitis and columnar mucosa without intestinal metaplasia groups of 37.5% and 30%, respectively ($p>0.05$). The reflux action may play an important role in the positive reactivity of this biological marker in these patients. Several inflammatory alterations such as esophagitis in tumor surrounding areas, achalasia esophagitis and esophagitis by gastroesophageal reflux are closely related to the esophageal carcinogenesis process, being capable of modifying the function of many proteins that regulate the cell cycle, such as the p53 protein (38;50). So far, a few studies have analyzed the immunoreactivity of the p53 protein in the squamous mucosa affected by inflammatory process, particularly related to gastroesophageal reflux. Fagundes et al (50) conducted a prospective study with the purpose of establishing the immunoreactivity of the p53 protein in a rigorous protocol of serial esophageal biopsies, in patients at high risk for epidermoid carcinoma of the esophagus. They showed a progressive increase of the immunohistochemical expression of the p53 protein in patients with chronic esophagitis, dysplasia and esophageal cancer.

In patients with columnar mucosa without intestinal metaplasia, the prevalence of the immunoreactivity of the p53 protein was 30%, whereas in the

columnar epithelium with intestinal metaplasia it was 62.5%. Although no statistical significance was found in these two groups, the immunoreactivity of the p53 protein was evidently associated to the process of intestinalization of the metaplastic mucosa in the distal esophagus. The development of the columnar mucosa in the distal esophagus is a benign condition with a potential to malignant transformation with the occurrence of intestinal metaplasia (56). The specific molecular mechanism that induces this alteration is unknown. The columnar mucosa in the distal esophagus is the first stage of the columnar mucosa-Barrett-adenocarcinoma, and many other studies published over the last 10 years have shown that the adequate control of gastroesophageal reflux may be associated to histological regression of Barrett's esophagus (56;57;58). Gurski et al (59) have shown that anti-reflux surgery was an important predictive factor in the histological regression in patients with Barrett's esophagus. Histological regression occurred in 36% of the operated patients. Carlson et al (60) assessed the importance of the immunoreactivity of p53 protein, by endoscopic biopsies, in the evolution of patients with Barrett' Esophagus under acid suppression therapy. The authors showed that the accumulation of p53 protein was a marker if the neoplastic progression even during clinical treatment. These findings demonstrated that p53 positive patients progressed to higher degrees of dysplasia or DNA ploidy, and that early occurrence of the genetic abnormality in the Tp53 gene did not interfere with the neoplastic evolution in patients with Barrett's esophagus under acid suppression therapy. Thus, the identification of patients with Barrett's esophagus and the greater chance of histological progression is a promising field for future research.

The high index of positive reactivity of the p53 protein identified in the present study in patients with columnar epithelium with intestinal metaplasia (62.5%), and the

relatively low risk of progression of this precursor lesion to adenocarcinoma of the esophagus (0.5 to 2%) suggest that, although necessary for the development of this neoplasia, the Tp53 suppressor gene alone cannot lead to tumor progression. It is possible that other mediating factors in the cell proliferation process and apoptosis, such as the bcl-2 and the c-Myc, act on these cells with molecular alterations, preventing their neoplastic transformation (19;43;61;62).

The Ki-67 nuclear antigen is one of the most studied markers of the cell proliferation activity because it can be used in several clinical conditions such as lymphoproliferative diseases, gastroesophageal reflux disease, colon esophagus and prostate cancer (23;27). The Ki-67 is present in proliferative cells and its increased positive reactivity has been shown in esophageal, gastric, colon and rectal carcinomas (44).

The present study demonstrated that the proliferation index (Ki-67) was significantly higher when histological alterations progressed. Ki-67 immunohistochemical analysis identified a growing positive reactivity in the squamous and glandular epithelium of the nuclear antigen expression in the normal squamous epithelium, chronic esophagitis, columnar epithelium without intestinal metaplasia, columnar epithelium with intestinal metaplasia and adenocarcinoma groups of 21.3%, 38.8%, 37.7%, 52.8% and 57.1%, respectively.

Feith et al (33) detected a proliferation index of $20.4 \pm 6.4\%$ in the normal epithelium of the esophagus, $39 \pm 11.1\%$ in the columnar metaplasia without dysplasia, and $60.8 \pm 17.9\%$ in the adenocarcinomas. Our results also demonstrated a high proliferation level of the Ki-67 in the proliferative zone of patients with intestinal metaplasia without dysplasia, when compared to the normal squamous epithelium group ($p < 0.001$). Such findings are consistent with the studies of Hong et al (23) who

analyzed Ki-67 expansion in the proliferative compartments by using the immunohistochemical method with Ki-67 (MIB-1) monoclonal antibody and reported a higher proliferation rate (33.5%) in the glandular zone of patients with Barrett's esophagus without dysplasia. Based on such data we have also concluded that the distribution and increase of immunoreactivity by Ki-67 in the proliferative compartments correlated with the histological findings in the Barrett's esophagus without dysplasia – low degree dysplasia – high degree dysplasia.

Chen et al (45) have studied the immunohistochemical expression of Ki-67 and COX-2 in 10 patients with normal squamous mucosa, 15 patients with severe reflux esophagitis and 25 patients with Barrett's esophagus. The authors found no significant difference in the Ki-67 index among the patients with esophagitis and Barrett's Esophagus, with both groups being statistically different from patients with normal squamous mucosa.

Comparison of the groups of chronic esophagitis, normal squamous mucosa and columnar epithelium with intestinal metaplasia of our study showed a significant difference between them ($p < 0.01$). Besides, high indexes of cell proliferation were noticed, particularly when intestinal metaplasia was present, indicating that this proliferative activity was also related to the intestinalization of the columnar mucosa in the distal esophagus.

Based on the findings of the present study we can affirm that molecular alterations measured by the p53 protein expression were progressively greater when histological alterations caused by GERD grew progressively worse. Likewise, proliferative alterations measured by the Ki-67 expression had the same pattern, with both markers showing a positive correlation between the increase of their expression and the histological worsening. It is possible that the lesion mechanisms that

increase proliferative activity are the same mechanisms that produce molecular alterations that lead to cancer.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Voutilainen M, Sipponen P, Mecklin Jp, Juhola M, Farkkila M: Gastresophageal reflux disease: prevalence, clinical, endoscopic and histopathological findings in 1128 consecutive patients referred for endoscopy due to dyspeptic and reflux symptoms. *Dig* 2000, 61:6-13.
2. Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, Sontag SJ. There are no reliable symptoms for erosive esophagitis and Barrett's esophagus: endoscopic diagnosis is still essential. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16 (4):735-42.
3. Moraes-Filho JPP, Cecconello I, Gama-Rodrigues J, Castro LP, Henry MA, Meneghelli UG, Quigley E, Brazilian Consensus Group. Brazilian consensus on gastroesophageal reflux disease: proposals for assessment, classification, and management. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:241-248.
4. Achem SR. Endoscopy negative gastroesophageal reflux disease. The hypersensitive esophagus. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28:893-904.
5. Younes M, Ertan A, Lechago LV, Somoano JR, Lechago J. p53 protein accumulation is a specific marker of malignant potential in Barrett's metaplasia. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 697-701.
6. Gillen P, Keeling P, Byrne PJ, West AB, Hennessy TP. Experimental columnar metaplasia in the canine esophagus. *Br J Surg* 1988; 75: 113-115.
7. Bremner CG, Lynch VP, Ellis HF. Barrett's esophagus: congenital or acquired? An experimental study of esophageal mucosal regeneration in the dog. *Surgery* 1970; 68: 209-216.
8. Sampliner RE. Practice guidelines on the diagnosis, surveillance, and therapy of Barrett's esophagus. The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterol. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(7):1028-1032.
9. Cameron AJ, Zinsmeister AR, Ballard DJ, Carney JA. Prevalence of columnar-lined (Barrett's) esophagus. Comparison of population-based clinical and autopsy

- findings. *Gastroenterol* 1990; 99(4):918-922.
10. Lieberman DA, Oehlke M, Helfand M. Risk factors for Barrett's esophagus in community-based practice. *Am J Gastroenterol* 1997; 92:1293-1297.
 11. Devesa S, Blot WF, Fraumeni JF. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998; 83(10):2049-2053.
 12. Sharma P, Morales TG, Samplimer RE. Short segment Barrett's esophagus: the need for standardization of the definition and endoscopic criteria. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(7):1033-1036.
 13. Hameeteman W, Tytgat GN, Houthoff HJ, van den Tweel JG. Barrett's esophagus: development of dysplasia and adenocarcinoma. *Gastroenterol* 1989; 96(5):1249-1256.
 14. Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's Adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001; 233(3):322-37.
 15. Lagergren J, Bergstrom R, Nyren O. Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Ann Intern Med* 1999; 130(11):883-890.
 16. Cameron AJ, Ott BJ, Payne WS. The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus. *N Engl J Med* 1985; 313: 857-9.
 17. El Serag HB, Mason AC, Petersen N, Key CR. Epidemiological differences between adenocarcinoma of the esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardiac in the USA. *Gut* 2002; 50(3):368-372.
 18. Krishnadath KK, Tilanus HW, Blankestein MV, Bosman FT, Mulder AH. Accumulation of p53 protein in normal, dysplastic, and neoplastic Barrett's esophageal. *J Pathol* 1995; 75:175-180.
 19. Neshat K, Sanchez CA, Galipean PC, et al. p53 mutation in Barrett's adenocarcinoma and high grade dysplasia. *Gastroenterol* 1994; 106: 1589-1595.
 20. Nigro JM, Baker SJ, Preiseinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Brigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R,

- Harris CC, Volgestein B. Mutations in the p53 gene occur in diverse human types. *Nature* 1989; 342: 705-8.
21. Bennett WP, Hollstein MC, He A, et al. Archival analysis of p53 genetic and protein alterations in Chinese esophageal cancer. *Oncogene* 1991; 6:1779-1784.
 22. Younes M, Lebovitz RLM, Lechago LV, Lechago J. p53 protein accumulation in Barrett's metaplasia, dysplasia and carcinoma: a follow-up study. *Gastroenterol* 1993; 105: 1637-142.
 23. Hong MK, Laskin WB, Herman BE, et al. Expansion of the Ki-67 proliferative compartment correlates with degree of dysplasia in Barrett's esophagus. *Cancer* 1995; 75: 423-429.
 24. Herbst JJ, Berenson MM, Mccloskey DW, Wisner WC. Cell proliferation in esophageal columnar epithelium (Barrett's esophagus). *Gastroenterol* 1978; 75: 683-687.
 25. Gerdes J, Becker MH, Key G, Cattoretti G. Immunohistological detection of tumor growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 1992; 168(1): 85-6.
 26. Gerdes J, Lemke H, Braisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle of a proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984, 133: 1710-15.
 27. Polkowski W, van Lanschot JJ, ten Kate FJ, et al. The value of p53 and Ki-67 as markers for tumor progression in the Barrett's dysplasia-carcinoma sequence. *Surg Oncol* 1995; 4: 163-171.
 28. Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS. Barrett's esophagus: cell cycle abnormalities in advancing stages of neoplastic progression. *Gastroenterol* 1993; 105(1):119-129.
 29. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathol* 1990; 17 (6):489-503.
 30. Flora-Filho R, Câmara-Lopes LH, Zilberstein B. Critérios histológicos na doença do refluxo gastroesofágico. Reavaliação da sensibilidade da pHmetria esofágica

de 24 horas. *Arq Gastroenterol.* 2000; 37(4): 1-10.

31. Siewert JR, Holscher AH, Becker K, Gossner W. [Cardia cancer: attempt at a therapeutically relevant classification]. *Chirurg* 1987; 58(1):25-32.
32. Wang LD, Hong JY, Qiu SL et al. Accumulation of P53 protein in human esophageal precancerous lesions: a possible early biomarker for carcinogenesis. *Cancer Res* 1993; 53:1783-1787.
33. Feith M, Stein HJ, Mueller J, Siewert JR. Malignant degeneration of Barrett's esophagus: the role of the Ki-67 proliferation fraction, expression of E-cadherin and p53. *Dis Esophagus* 2004; 17(4):322-327.
34. Weston AP, Banerjee SK, Sharma P, Tran TM, Richards R, Cherian R. p53 protein overexpression in low grade dysplasia (LGD) in Barrett's esophagus: immunohistochemical marker predictive of progression. *Am J Gastroenterol*; 2001 96(5): 1355-62.
35. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340(11):825-831.
36. Ramel S, Reid BJ, Sanches CA, Blount PL, Levine DS, Neshat K, Haggitt RD, Dean PJ, Thor K, Rabinovitch PS. Evaluation of p53 protein expression in Barrett's esophagus by two-parameter flow cytometry. *Gastroenterol* 1992; 102: 1220-1228.
37. Polkowski W, Van Lanschot JJB, Offerhaus GJA. Barrett esophagus and cancer: pathogenesis, carcinogenesis, and diagnostic dilemmas. *Histopathol* 1999; 14: 927-944.
38. Mandard AM, Marnay J, Lebeau C, Benar S, Mandar JC. Expression p53 in esophageal squamous epithelium from surgical specimens resected for carcinoma of the esophagus, with special reference to uninvolved mucosa. *J Pathol* 1997; 181(2):153-7.
39. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferation cells in microwave-processed formal in fixed paraffin section. *J Pathol* 1992; 168: 357-63.

40. Adulaimi D; Jankowski J. Barrett's esophagus: an overview of the molecular biology. *Dis Esophagus* 1999; 12(3): 177-80.
41. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-6.
42. Clark GW, Ireland AP, DeMeester TR. Dysplasia in Barrett's esophagus: diagnosis, surveillance and treatment. *Dig Dis* 1996; 14(4):213-227.
43. Nishiyama Y, Koyama S, Andoh A, Moritani S, Kushima R, Fujiyama Y, Hattori T, Bamba T. Immunohistochemical analysis of cell cycle-regulating-protein (p21, p27, and Ki-67) expression in gastroesophageal reflux disease. *J Gastroenterol* 2002; 37(11): 905-11.
44. Porschen R, Kriegel A, Langen C, Classen S, Hilse M, Lohe B et al. Assessment of proliferative activity in carcinomas of the human alimentary tract by Ki-67 immunostaining. *Int J Cancer* 1991; 47(5):686-691.
45. Chen X, Ouyang Q, Zhang WY, Li XS, Liang HL. The clinical, pathological features and expression of Ki-67 and COX-2 in severe reflux esophagitis and Barrett's esophagus. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2005; 36(2): 207-9.
46. Iftikhar SY, Steele RJ, Watson S, James PD, Dilks K, Hardcastle JD. Assessment of proliferation of squamous, Barrett's and gastric mucosa in patients with columnar lined Barrett's esophagus. *Gut* 1992; 33(6):733-737.
47. Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS. Barrett's esophagus: cell cycle abnormalities in advancing stages of neoplastic progression. *Gastroenterol* 1993; 105(1):119-129.
48. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. Barrett's esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterol* 1987; 93(1):1-11.
49. Yoshikawa I, Yamasaki M, Kume K, Tabaru A, Otsuki M. Lugol chromoendoscopy as a diagnostic tool in so-called endoscopy-negative GERD. *Gastrointest Endosc.* 2005; 62 (5): 698-703.
50. Fagundes R B, Melo C R, Putten A C, Moreira L F, Barros S G. p53

immunoexpression: an aid to conventional methods in the screening of precursor lesions of squamous esophageal cancer in patients at high-risk? *Cancer Detect Prev.* 2005; 29 (3): 227-32.

51. Casson AG, Mukhopadaya T, Cleary KR, Ro JY, Levin B, Roth JA. P53 gene mutations in Barrett's epithelium and esophageal cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 4495-4499.
52. Segal F, Kaspary AP, Prolla JC, Leistner S. p53 protein overexpression and p53 mutation analysis in patients with intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's esophagus. *Cancer Lett* 2002; 210(2): 213-8
53. Kim R, Clarke MR, Melhem MF, Young MA, Vanbibber MM, Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro U, Reynolds JC. Expression of p53, PCNA, and C-erbB-2 in Barrett's metaplasia and adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 1997 42: 2453-62
54. Rice TW, Goldblum JR, Falk GW, Tubs RR, Kirby TJ, Casey G. p53 Immunoreactive in Barrett's metaplasia, dysplasia, and carcinoma. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1996; 111: 323-31
55. Jankowski J, Coghill G, Hopwood D, et al. Oncogenes and oncosupressor genes in adenocarcinoma of the esophagus. *Gut* 1991; 32: A1205-6.
56. Oberg S, Peters JH, DeMeester TR, et al. Inflammation and specialized intestinal metaplasia of cardiac mucosa is a manifestation of Gastroesophageal reflux disease. *Ann Surg* 1997; 226(4): 522-530
57. Kauer WK, Peters JH, DeMeester TR, Ireland AP, Bremner CG, Hagen JA. Mixed reflux of gastric and duodenal juices is more harmful to the esophagus than gastric juice alone. The need for surgical therapy re-emphasized. *Ann Surg* 1995; 222(4):525-531.
58. DeMeester SR, DeMeester TR. Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus: fifty years of controversy. *Ann Surg* 2000; 231(3):303-321.
59. Gurski RR, Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR, Bremner CG, Chandrasoma PT et al. Barrett's esophagus can and does regress after antireflux surgery: a study of prevalence and predictive features. *J Am Coll Surg* 2003; 196(5):706-712.
60. Carlson et al. Acid suppression therapy may not alter malignant progression in

Barrett's metaplasia showing p53 protein accumulation. *American Journal of Gastroenterology* 2002; 97(6): 1340-1345

61. Suspiro A, Pereira DA, Afonso A, Albuquerque C, Chaves P, Soares J, Leitão CN. Losses of heterozygosity on chromosomes 9p and 17p are frequent events in Barrett's metaplasia not associated with dysplasia or adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:728-734

62. Schmidt MK, Meurer L, Volkweis BS, Edelweiss MI, Schirmer CC, Kruel CDP, Gurski RR. c-Myc overexpression is strongly associated with metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Dis Esophagus* 2007; 20: 212-216.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA P53 E DO ANTÍGENO KI-67 (MIB-1) NO EPITÉLIO ESCAMOSO DE PACIENTES COM DRGE E ESOFAGITE CRÔNICA

** (pré-artigo para ser enviado à revista Endoscopy)*

Versão em Português

Autores:

Marcelo Binato

Renato Borges Fagundes

Luise Meurer

Maria Isabel Edelweiss

Richard Ricachenevsky Gurski

Local de Realização:

Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Serviços de Cirurgia Geral e de Patologia.

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – CEP 90035-003. Bairro Rio Branco – Porto Alegre –

RS – Brasil. Fone: (51) 2101.8000.

Endereço para Correspondência:

Marcelo Binato

Rua Francisco Manoel Nº 01/ AP 202 CEP 97015-260

Santa Maria – RS – Brasil. Fone: (55) 32225693

Email: mbinato@uol.com.br

RESUMO

Introdução: Pacientes com DRGE e esôfago de Barrett apresentam risco aumentado para desenvolver adenocarcinoma de esôfago. Nesses dois grupos de pacientes, já é relativamente bem conhecida a maior prevalência de alterações proliferativas e moleculares decorrentes do refluxo gastroesofágico. Existe ainda uma questão em aberto, ou seja, se em fases anteriores, já estão presentes essas alterações na mucosa esofágica e em qual grau.

Objetivos: Avaliar a expressão da proteína p53 e do índice Ki-67 na mucosa esofágica de pacientes com DRGE sem alterações da mucosa e nos casos com esofagite nos vários graus.

Métodos: Foram estudados 138 pacientes com sintomas típicos de refluxo gastroesofágico, submetidos à endoscopia digestiva e biópsia da mucosa esofágica, entre janeiro de 2003 e dezembro de 2006. A expressão da proteína p53 e do índice Ki-67 foi determinada por estudo imunohistoquímico. Os pacientes foram divididos em quatro grupos após diagnóstico histopatológico: G1: 58 pacientes com epitélio escamoso normal, G2: 42 pacientes com esofagite leve, G3: 23 pacientes com esofagite moderada, G4: 15 pacientes com esofagite acentuada.

Resultados: Expressão aumentada da proteína p53 foi encontrada em 7% no G1; 21,4% no G2; 52,2% no G3 e 60% no G4. Houve diferença significativa na positividade da proteína p53 do G1 em relação aos grupos G3 e G4 ($p < 0,001$), e também entre o G2 e o G4 ($p < 0,05$). O índice médio do Ki-67 foi de $21,3 \pm 19,5\%$ no G1; $30,8 \pm 23,4\%$ no G2; $47,1 \pm 23,2\%$ no G3 e $48,3 \pm 25,7\%$ no G4. Diferenças significativas do Ki-67 entre grupos: G1xG3 ($p < 0,001$); G1xG4 ($p < 0,001$); G2xG3 ($p = 0,026$); G2xG4 ($p = 0,046$). Foi observada correlação positiva e crescente entre ambos marcadores e a piora do grau de esofagite ($p < 0,001$).

Conclusão: A expressão aumentada da proteína p53 e do índice Ki-67 correlacionaram-se com os achados histológicos da mucosa esofágica complicada por processo inflamatório, especialmente, nas formas moderada e acentuada da esofagite crônica. Esses achados demonstram que as alterações moleculares e proliferativas ocorrem em fases anteriores ao surgimento da metaplasia intestinal, em pacientes com DRGE.

Palavras-Chave: p53. Ki-67 (MIB-1). DRGE. Esofagite. Adenocarcinoma.

INTRODUÇÃO

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) apresentou acentuado aumento de prevalência nas últimas décadas. Estima-se que 40% da população adulta experimentem sintomas de refluxo gastroesofágico em alguma fase da vida, com cerca de 20% referindo pirose semanalmente e 10% com sintomas diários (1). Esse fato faz da DRGE uma das doenças gastrointestinais mais freqüentes nos países do Ocidente, afetando de alguma forma 30% dos indivíduos adultos nos Estados Unidos (2). No Brasil, aproximadamente 12% da população adulta têm sintomas típicos de refluxo gastroesofágico, como pirose e/ou regurgitação (3). A freqüência e a severidade dos sintomas de refluxo nem sempre estão associadas com as alterações inflamatórias na mucosa esofágica (4). Entretanto, observa-se uma maior prevalência da esofagite erosiva em pacientes com mais de 50 anos (1).

O estudo endoscópico do esôfago é o método de escolha para o diagnóstico das lesões macroscópicas da mucosa esofágica causadas pelo refluxo gastroesofágico (3). A esofagite de refluxo pode progredir para complicações como erosões, úlceras, estenose, esôfago de Barrett e progredir ao adenocarcinoma de esôfago (5;6). Entretanto, muitos pacientes refluidores têm um aspecto normal da mucosa esofágica (*non erosive reflux disease – NERD*) (1). A irritação e a inflamação crônica são carcinógenos conhecidos em muitos tecidos. Estudos experimentais evidenciam que o refluxo, especialmente, o biliar tem importante papel na carcinogênese esofágica (7;8).

A análise histológica da mucosa esofágica pode ajudar no diagnóstico de refluxo gastroesofágico ao mostrar alterações epiteliais como a hiperplasia da camada basal e o alongamento de papilas, assim como a presença de células inflamatórias (neutrófilos e eosinófilos) (9;10). A hiperplasia da camada basal

decorre da maior renovação celular, enquanto o alongamento das papilas é conseqüente do maior fluxo de nutrientes para as células epiteliais. Essas alterações histológicas são características da forma crônica do refluxo gastroesofágico, presente na maioria dos pacientes com esofagite (9).

As condições pré-malignas do esôfago, na presença de inflamação crônica, podem estar associadas com uma pronunciada resposta inflamatória e humoral durante a progressão da doença (11). Como em outras condições inflamatórias crônicas, a elevação de mediadores inflamatórios (imunoglobulinas e células inflamatórias do plasma) e a produção de radicais livres de oxigênio estão vinculados à esofagite de refluxo; ambas contribuem para aumentar o risco de câncer esofágico, especialmente quando associados ao esôfago de Barrett (11;12).

Diversos marcadores moleculares (p53, Ki-67, Bcl-2, TGF-alfa, EGF-R) têm sido pesquisados em várias alterações inflamatórias, como esofagite por refluxo gastroesofágico, acalasia e carcinoma epidermóide do esôfago, com a finalidade de estudar o comportamento biológico do epitélio esofágico associado à inflamação, especialmente, em áreas de alto risco para câncer esofágico (13-15,31). O Tp53 é o gene supressor tumoral mais comumente estudado nos carcinomas humanos. Ele é responsável por regular o ciclo celular, reparar o DNA das células e induzir a morte celular programada, quando necessário (16;17). O gene Tp53 codifica a proteína p53 (normal), responsável pelo controle da transição durante a fase G1-S do ciclo celular, a fim de prevenir a duplicação do DNA, principalmente, na presença de mutações (18). A mutação no gene Tp53 gera uma proteína p53 alterada com uma meia vida maior (6 horas) do que a proteína p53 normal (6 a 20 minutos). O acúmulo intra-nuclear da proteína p53 torna possível a sua identificação pelos métodos imunohistoquímicos (19). Dessa forma, a expressão aumentada da proteína p53 tem

sido detectada em todas as etapas de progressão neoplásica (mucosa escamosa normal-esofagite-metaplasia-displasia-carcinoma), sendo considerada um possível marcador no processo da carcinogênese do esôfago (13;19-21).

Pouco se sabe como o processo regenerativo da mucosa escamosa inflamada modula a proliferação das células no epitélio esofágico. O antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear utilizada como marcador da proliferação celular, em muitos tecidos (22). De função ainda incerta, o antígeno Ki-67 está presente em todas as fases (ativas) do ciclo celular (G1, S, G2, e M), mas ausente na fase de repouso – G0 (23;24). Na literatura, tem sido descrito que o índice de proliferação celular, avaliado pelo antígeno Ki-67, juntamente com outras proteínas reguladoras do ciclo celular (p21, p27), acompanha a progressão das alterações inflamatórias sobre o epitélio esofágico, em pacientes com sintomas de refluxo gastroesofágico (10).

O objetivo do nosso estudo foi avaliar a expressão da proteína p53 e a atividade proliferativa pelo Ki-67 (MIB-1) no epitélio escamoso do esôfago e na esofagite crônica, em pacientes com sintomas de refluxo gastroesofágico de longa duração.

MATERIAIS E MÉTODOS

População em estudo

Foram avaliados prospectivamente e de forma consecutiva, pacientes com idade igual ou superior a 30 anos, encaminhados ao Serviço de Endoscopia Digestiva entre janeiro de 2003 e dezembro de 2006 com sintomas típicos de refluxo gastroesofágico, como pirose e/ou regurgitação, pelo menos uma vez por semana no mínimo há cinco anos. Foram excluídos do estudo os pacientes portadores de coagulopatia, estenose de esôfago, varizes esofágicas, hepatopatia, hemorragia digestiva com menos de 30 dias, câncer de esôfago, tratamento radioterápico ou

quimioterápico prévios, hipersensibilidade ao iodo, uso atual de terapia ácida supressora nos últimos 60 dias ou cirurgia sobre o esôfago ou estômago. Do subtotal de 235 pacientes, foram selecionados e incluídos no estudo, apenas casos sem lesão da mucosa esofágica ou com esofagite de qualquer grau, mas sempre comprovada histologicamente. Excluíram-se os pacientes com mucosa colunar e os casos de adenocarcinoma de esôfago.

Antes da realização da endoscopia digestiva alta foi obtido o consentimento informado e respondido um questionário para definir as características demográficas e clínicas de cada paciente (Anexo 1 e 2).

Endoscopia digestiva alta

O endoscópio (Fujinon 2200) foi introduzido mediante manobras convencionais para a inspeção do esôfago, estômago e duodeno. Com o endoscópio posicionado próximo a linha Z, foi realizada a cromoscopia com Solução de Lugol a 3% com a finalidade de colocar em evidência o limite distal do epitélio escamoso e as lesões decorrentes do refluxo gastroesofágico. Nesse momento, foram coletados, no mínimo, dois fragmentos de mucosa, aproximadamente, dois centímetros acima da junção esofagogástrica na ausência de lesão, e no(s) sítio(s) de erosão (ões) ou área(s) não corada(s).

O pinçamento diafragmático correspondeu à impressão endoscópica do músculo diafragma, a linha Z definiu a junção escamocolunar e a junção esofagogástrica foi delimitada pela margem proximal das pregas gástricas. A distância de dois centímetros ou mais entre a linha Z e o pinçamento diafragmático definiu o diagnóstico de hérnia hiatal. A presença de solução de continuidade (erosão) na mucosa escamosa determinou o diagnóstico de esofagite erosiva. A

classificação de Los Angeles foi utilizada para a graduação endoscópica da esofagite endoscópica (grau A: uma ou mais erosões menor que 5 mm em sua maior extensão, grau B: uma ou mais erosões maior que 5 mm não contínuas, grau C: erosões contínuas que envolvem menos que 75% da circunferência do órgão, grau D: erosões contínuas envolvendo mais de 75% da circunferência do órgão).

A biópsia da mucosa esofágica foi realizada com o auxílio de pinça fórceps com estilete central, cuja abertura das cúspides é de sete milímetros (7mm). As amostras teciduais foram fixadas em formalina a 10% e as alterações da mucosa esofágica e as áreas biopsiadas foram registradas em mapa esquemático do esôfago (Anexo 3).

Análise histopatológica

Os fragmentos da mucosa do esôfago, corados com Hematoxilina-Eosina (H&E), foram analisados, em microscópio óptico, por duas patologistas do Departamento de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os achados histológicos foram classificados nas seguintes categorias:

1. epitélio escamoso;
2. presença de células da camada basal que atingem mais do que 15% da camada epitelial total;
3. alongamento das papilas com extensão mais da metade da camada epitelial total;
4. exocitose: presença de neutrófilos e/ou eosinófilos e/ou monócitos intra-epiteliais;

O diagnóstico histopatológico de esofagite foi definido pela presença de um ou mais dos achados descritos acima conforme estabelecido por Flora-Filho et al (9). A esofagite foi classificada em leve, moderada e acentuada, de acordo com o grau

das alterações inflamatórias descritas a seguir (35): para neutrófilos e eosinófilos as categorias são: Leve (média de uma célula por secção de tecido); Moderada (mais de uma célula por secção de tecido), Acentuada (infiltração maciça de células inflamatórias). Para linfócitos as categorias são: leve (menos de 3 células por campo de grande aumento- CGA); Moderada (10 a 50 células CGA); Acentuada (mais de 50 células CGA).

Análise imunohistoquímica

A técnica imunohistoquímica foi realizada no Laboratório de Imunohistoquímica do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Para cada bloco de parafina, foram realizados dois cortes histológicos com três micrômetros, e montados em lâminas revestidas por poli-L-lisina. Em seguida, os cortes foram desparafinizados por imersão em xilol por 30 minutos e hidratados em álcool de diferentes concentrações (70 a 100%) à temperatura ambiente (ATA). Após a hidratação no álcool, os cortes foram novamente lavados em água corrente por três minutos e mergulhados em água destilada por mais um minuto. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por imersão das lâminas em peróxido hidrogênio a 3% por dez minutos. Após a recuperação antigênica em forno de microondas, com três ciclos na potência máxima (800 W) por oito minutos e vinte segundos procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena e das reações inespecíficas.

O anticorpo primário p53 (DAKO, código M7001 mouse anti p53; clones DO-7), foi encubado por quinze horas, a 4°C, na diluição 1:700 e reconhece a forma normal e a alterada da proteína p53. O anticorpo primário Ki-67 (DAKO, código MU2970397 mouse anti Ki-67; clones MIB1) que reconhece o antígeno nuclear Ki-67

foi incubado por quinze horas, a 4°C, na diluição 1:400. As lâminas ficaram por quinze a dezoito horas na geladeira (10°C). Elas foram lavadas e banhadas no PBS, com aplicação posterior do LSAB (Avitina-Biotina); após nova lavagem, foi utilizado o cromógeno diaminobenzidina (DAB) cuja característica é a de fornecer coloração castanha à reação. Finalmente, após a coloração pela Hematoxilina-Haas e passagem em amônia a 2% e álcool, as lâminas foram montadas.

Foram utilizados como controle positivo material proveniente de câncer de mama para a proteína p53 e apêndice cecal para o Ki-67, e como controle negativo foi utilizada uma lâmina sem a inclusão do anticorpo primário. Foi considerada reativa a célula cujo núcleo apresentou coloração castanha evidente, semelhante ao controle positivo em ambos os marcadores.

A avaliação da expressão da proteína p53 foi realizada pela proporção de células coradas em um mínimo de 10 campos visuais de grande aumento (400X). O parâmetro para definir a expressão da proteína p53 foi a presença da coloração nuclear, conforme estabelecido por Wang et al (25). Foram considerados casos positivos aqueles com mais de 10% de células coradas, por campo microscópico de alta magnificação. Para o Ki-67 (MIB-1), o resultado foi avaliado pelo índice de proliferação celular para cada caso, que é calculado a partir da média de células coradas e o total de células analisadas com contagem de no mínimo 500 células, conforme descrito previamente por Feith et al (26).

A leitura imunohistoquímica das lâminas foi realizada por duas patologistas, com experiência em patologia gastrointestinal do Departamento de Patológica do HCPA, de forma independente e sem o conhecimento dos dados clínicos. Quando discordante, o resultado final foi obtido por consenso entre as patologistas conforme descrição prévia por Weston et al (27).

Análise estatística

Para armazenamento e processamento dos dados, foi utilizado o Statistical Package for Social Science (SPSS) versão 12.0. O teste estatístico aplicado para análise comparativa da proteína p53 entre os grupos, foi o qui-quadrado de tendência linear. Os dados para o Ki-67 foram apresentados em médias e desvios-padrão. As variáveis contínuas foram comparadas entre categorias por meio da análise de variâncias (ANOVA). A localização das diferenças, quando presentes, foi realizada pelo teste Tukey. A correlação linear das variáveis p53 e Ki-67 com seus respectivos grupos, foi analisada pelo coeficiente de correlação Kendall e Pearson, respectivamente. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

Considerações éticas

Este trabalho teve seu projeto previamente avaliado e aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA, e seguiu todas as normas éticas preconizadas. Os pacientes foram submetidos à endoscopia digestiva alta junto ao atendimento assistencial do Serviço de Gastroenterologia do HUSM. Foi obedecido o consentimento informado e os pacientes tiveram a privacidade dos dados coletados protegida. O estudo seguiu as normas emanadas da resolução 196/96 do CFM e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CCS da UFSM e pelo GPPG/HCPA.

RESULTADOS

No período de Janeiro de 2003 a dezembro de 2006 foram selecionados 138 pacientes que preencheram os critérios de inclusão previamente citados. Os pacientes selecionados, após estudo anátomo-patológico, foram divididos em quatro

grupos: 58 pacientes com epitélio normal (grupo 1), 42 pacientes com esofagite leve (grupo 2), 23 pacientes com esofagite moderada (grupo 3) e 15 pacientes com esofagite acentuada (grupo 4). A prevalência de epitélio histologicamente normal foi 42% (58/138) e de esofagite histológica foi 58% (80/138).

A análise imunohistoquímica dos 138 pacientes demonstrou imunorreatividade em 34 pacientes (24,6%) para a proteína p53. Nos pacientes com epitélio normal, 4 (7%) apresentaram expressão aumentada (mais de 10% de células coradas) da proteína p53. Dos 42 pacientes com esofagite leve, 9 (21,4%) apresentaram imunorreatividade à proteína p53, 12/23 (52,2%) dos pacientes com esofagite moderada foram considerados positivos para a proteína p53 e 9/15 (60%) dos pacientes com esofagite acentuada apresentaram expressão aumentada da proteína p53 (Figura 1).

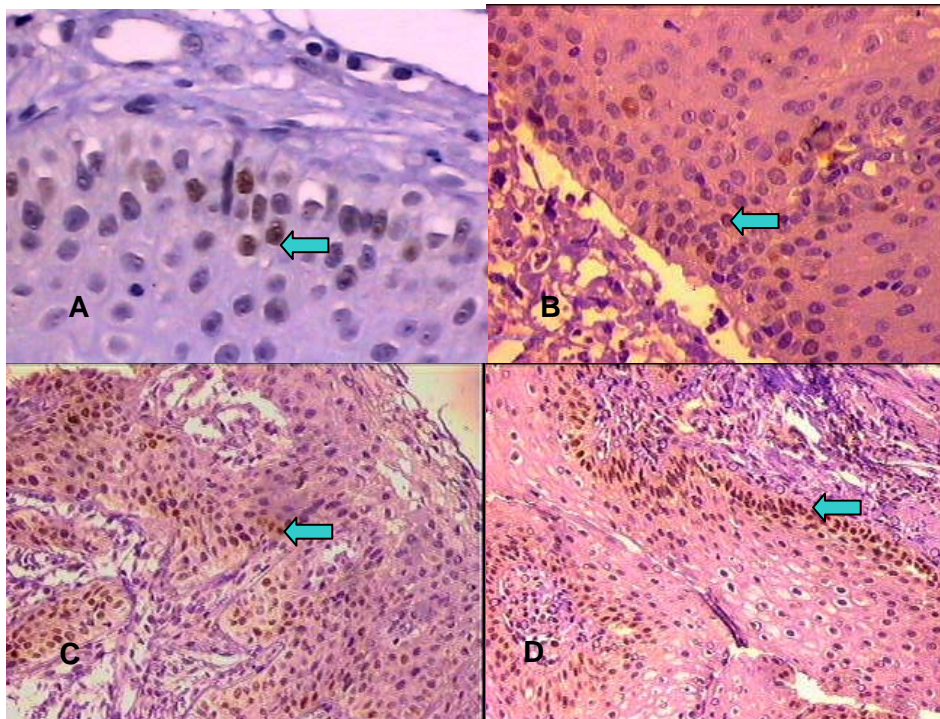


Figura 1. Microfotografia da expressão imunohistoquímica da proteína p53 – setas: mucosa normal (A) (x400), esofagite leve (B), esofagite moderada (C) e esofagite acentuada (D) , (x 200).

Houve diferença significativa na positividade da proteína p53 do grupo 1 em relação aos grupos 3 e 4 ($p<0,001$), assim como entre o grupos 2 e 4 ($p<0,05$) (Figura 2).

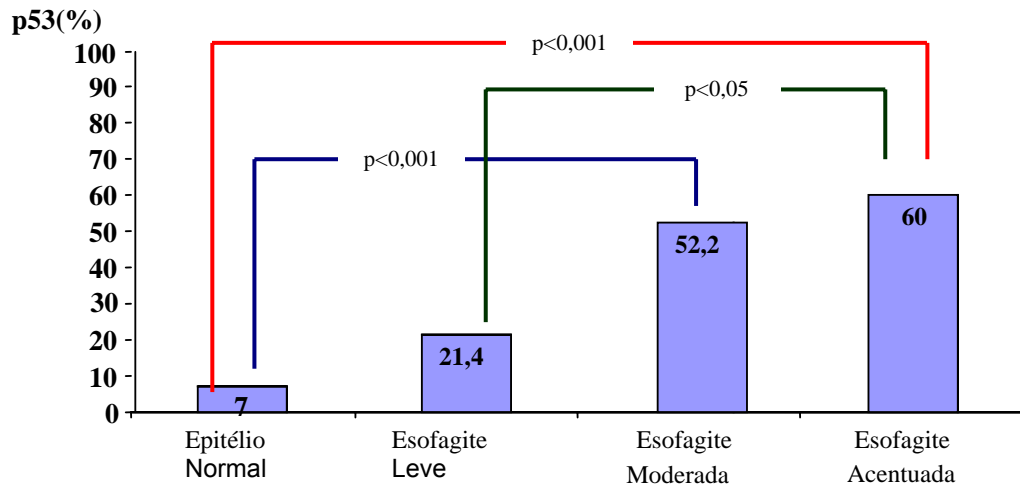


Figura 2. Atividade da p53 na seqüência epitélio normal – esofagite leve – esofagite moderada – esofagite acentuada

Foi identificada correlação positiva e progressivamente crescente entre os grupos estudados para a proteína p53 ($p<0,001$) (Figura 3).

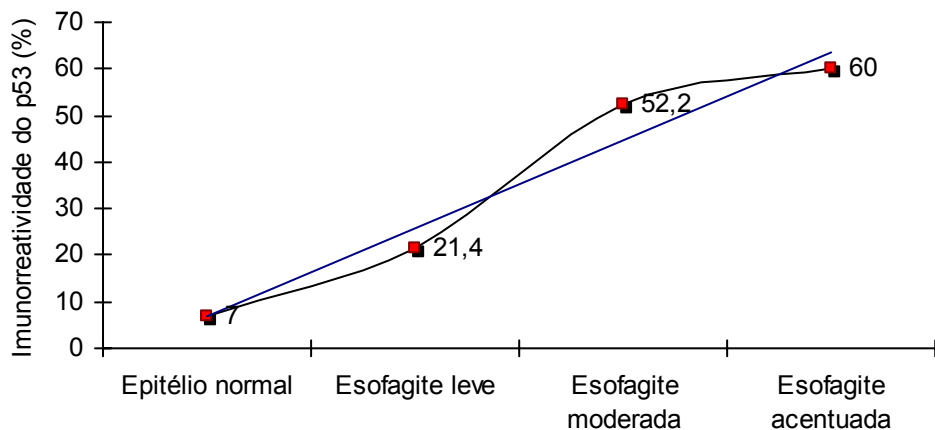


Figura 3. Correlação entre p53 e progressão epitélio normal – esofagite leve – esofagite moderada – esofagite acentuada. Coeficiente de Kendall 0,4.

Com relação ao Ki-67, o índice médio de proliferação celular, avaliado na camada basal, foi de $31,4\pm 24,3\%$. As médias foram de $21,3\pm 19,5\%$ nos pacientes com epitélio normal; $30,8\pm 23,4\%$ nos pacientes com esofagite leve; $47,1\pm 23,2\%$ nos

pacientes com esofagite moderada e $48,3 \pm 25,7\%$ nos pacientes com esofagite acentuada (Figura 4).

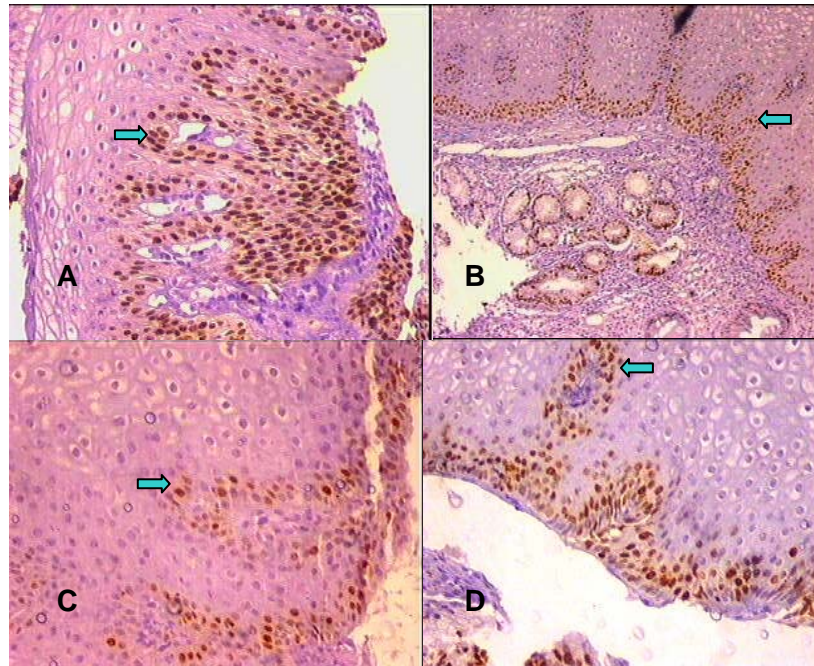


Figura 4. Microfotografia da expressão imunohistoquímica do antígeno Ki-67 (MIB-1) – setas: epitélio normal (A) e esofagite leve (B) com aumento de 200X, esofagite moderada (C) e esofagite severa (D), em aumento de 200X.

O Ki-67 apresentou distribuição crescente do grupo 1 ao grupo 4. Houve diferença significativa no índice de proliferação (Ki-67) entre o grupo 1 e os grupos 3 e 4, assim como entre o grupo 2 e os grupos 3 e 4 (Figura 5).

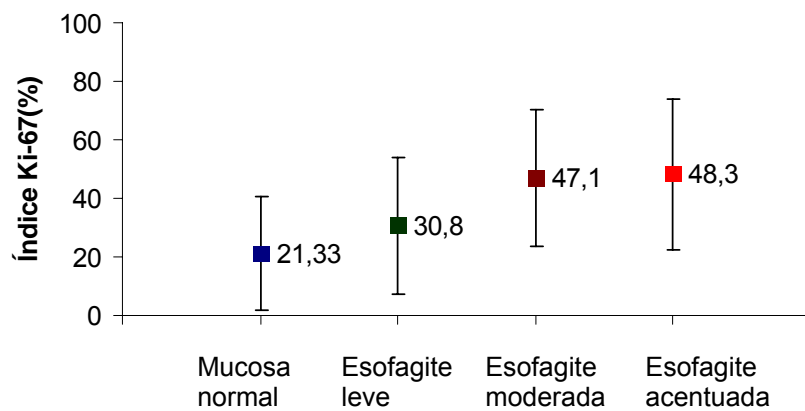


Figura 5. Atividade Ki-67 na seqüência epitélio normal – esofagite leve – esofagite moderada – esofagite acentuada. G1xG3 ($p < 0,001$); G1xG4 ($p < 0,001$); G2xG3 ($p = 0,026$); G2xG4 ($p = 0,046$).

Identificou-se correlação linear moderada entre o índice de proliferação celular (Ki-67 MIB-1) e a seqüência epitélio normal – esofagite leve – esofagite moderada – esofagite acentuada ($p < 0,001$) (Figura 6).

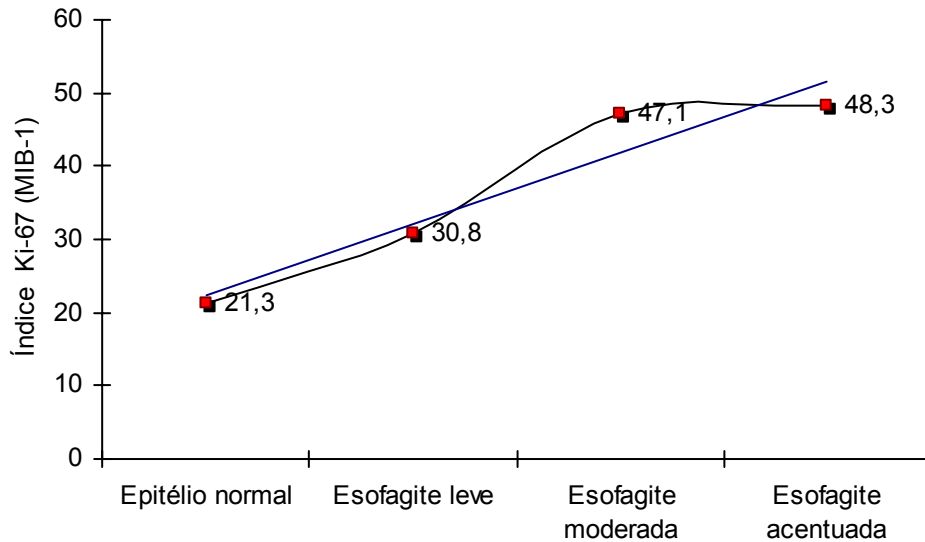


Figura 6. Correlação entre Ki-67 e progressão epitélio normal – esofagite leve – esofagite moderada – esofagite acentuada. Coeficiente de Pearson 0,4

DISCUSSÃO

Cada vez são maiores as evidências que indicam associação dos processos inflamatórios crônicos com o desenvolvimento da carcinogênese do aparelho digestivo (10;12;28;31). A história natural da DRGE demonstra que 40% dos pacientes com esofagite melhoram espontaneamente, 50% apresentam esofagite persistente e cerca de 10% progridem para o esôfago de Barrett (29;30). Hillmann et al (31) estudaram, de forma prospectiva, o impacto dos achados endoscópicos em pacientes com esôfago de Barrett. Os autores concluíram que a presença de esofagite erosiva severa, no diagnóstico endoscópico inicial; a persistência do processo inflamatório, apesar do tratamento instituído; a nodularidade da mucosa colunar e a estenose foram fatores que indicaram um maior risco dos pacientes em desenvolver alterações displásicas e adenocarcinoma esofágico. Boni et al (32) demonstraram por estudo imunohistoquímico, que mediadores inflamatórios, como

IL-8 e MCP-1, estimularam a proliferação celular através de receptores específicos diretamente sobre o epitélio esofágico. Diversos autores apóiam a teoria da associação entre o aumento de mediadores inflamatórios e as mudanças histológicas do epitélio esofágico (hiperplasia da camada basal e alongamento de papila) na esofagite por refluxo gastroesofágico, elevando o índice de proliferação celular, um mecanismo molecular com importante papel na carcinogênese do esôfago (11;12;33).

Método

A endoscopia digestiva alta é um dos principais métodos de avaliação das complicações da DRGE, principalmente, se for associada ao exame histopatológico da mucosa esofágica. Muitos estudos têm demonstrado alterações microscópicas da mucosa do esôfago, obtidas por biópsias endoscópicas, em pacientes com esofagite de refluxo (9;34;35). Desde os trabalhos de Ismail-Beiji et al (34), sedimentados por Weinstein et al (36) quanto à padronização do local ideal para a obtenção dos fragmentos esofágicos, poucas mudanças ocorreram nos achados da histologia do esôfago distal em pacientes com DRGE (9).

No presente trabalho, limitamos a obtenção das amostras da mucosa esofágica em pacientes endoscopicamente normais a, aproximadamente, 2 centímetros acima da junção escamocolunar, portanto acima do segmento do esôfago afetado pelo chamado refluxo fisiológico. O refluxo gastroesofágico contínuo leva as alterações inflamatórias da mucosa esofágica, como eritema, erosões e úlceras (35). Histologicamente, o alongamento das papilas e a hiperplasia da camada basal representam a resposta regenerativa do epitélio esofágico associado à intensa atividade mitótica localizada na camada basal (31). Embora os critérios

diagnósticos (clínicos, endoscópicos, funcionais) da DRGE sejam muito dinâmicos, há o consenso de que a esofagite histológica, isolada ou juntamente com outros critérios, seja um dos principais achados para o diagnóstico da DRGE (9).

Uma das principais limitações do método imunohistoquímico ao avaliar a expressão da proteína p53, ocorre quando a mutação do gene Tp53 não determina aumento da proteína p53 ou, no caso de imunorreatividade quando da ausência de mutação do gene Tp53 (37;38). Apesar de o seqüenciamento de DNA (PCR) ser o método mais seguro para avaliar a mutação do gene Tp53, o estudo imunohistoquímico é considerado mais exeqüível na avaliação do estado funcional do gene Tp53; pois com a estabilização na meia vida da proteína p53, qualquer que seja o mecanismo, torna-se possível a sua identificação pelos métodos imunohistoquímicos. A imunohistoquímica ainda apresenta como fator positivo, ser um método fácil e largamente disponível, com possibilidade de associar a observação topográfica da expressão do marcador (39).

Nossos resultados foram obtidos por estudo imunohistoquímico em amostras de biópsias endoscópicas da mucosa esofágica. A relação entre mutação real e expressão elevada da proteína p53 não foi analisada neste momento, pois a técnica adotada não permite tais observações. A utilização do anticorpo DO-7 possibilita o reconhecimento da forma normal e alterada da proteína p53. Entretanto, considerando a meia-vida extremamente curta da proteína p53 normal, a coloração positiva da célula tem uma forte correlação com o acúmulo anormal da proteína p53 (39). Além disso, o aumento progressivo na concentração da proteína alterada poderá determinar efeito negativo (dominante) sobre a atividade da proteína normal, por meio da formação do complexo protéico: proteína alterada *versus* proteína normal (49;50). Este estudo faz parte de uma linha de pesquisa que investiga a

carcinogênese esofágica em pacientes com DRGE. Outros marcadores moleculares estão sendo estudados, simultaneamente, com a finalidade em estudar os mecanismos envolvidos na seqüência inflamação – metaplasia – câncer do esôfago.

A atividade proliferativa tem recebido grande atenção nesse contexto. Pode ser analisada por técnicas como a incorporação timidina tritiada ao DNA celular, pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), e pela avaliação imunohistoquímica do antígeno nuclear Ki-67 (40). O Ki-67 tem-se tornado o marcador de eleição para avaliar a proliferação celular, pela elevada acurácia e maior factibilidade técnica que os métodos anteriormente citados. Sua aferição por análise de imagem tem sido também empregada, porém esse método no nosso meio não é usual. A contagem convencional pelo percentual de células marcadas/total das células avaliadas, é amplamente realizada e utilizada para quantificar a atividade proliferativa de determinado tumor ou tecido. Uma das limitações da utilização do anticorpo monoclonal Ki-67 é a perda de parte do antígeno nuclear em amostras fixadas em formalina, sendo necessário o uso de amostras de tecido fresco. Entretanto, a utilização do clone MIB-1, um verdadeiro anti-Ki67, possibilita a detecção do antígeno mesmo em amostras teciduais conservadas na parafina e, rotineiramente processadas, com recuperação antigênica em forno de microondas (23;24).

Resultados

Os eventos moleculares que caracterizam a seqüência inflamação-metaplasia-displasia-adenocarcinoma não estão totalmente esclarecidos (12). O adenocarcinoma do esôfago é o câncer esofágico com maior incidência nos Estados Unidos e na Europa Ocidental (41-43). Uma das principais hipóteses para o rápido crescimento do adenocarcinoma, nos países desenvolvidos, é o aumento na

prevalência da DRGE. Provavelmente, um dos mecanismos envolvidos no processo da carcinogênese nos portadores de refluxo gastroesofágico, é o aumento do estresse oxidativo sobre a mucosa esofágica (44). Muitos pacientes com adenocarcinoma do esôfago apresentam um histórico de refluxo gastroesofágico crônico; assim, o aumento na produção de radicais livres de oxigênio, na presença de esofagite, determina um maior dano ao DNA das células (12). Além disso, o permanente estímulo da proliferação celular, induzido pelo refluxo, também é um fator fisiopatológico importante na progressão da carcinogênese esofágica (45). A escolha dos marcadores moleculares p53 e Ki-67 (MIB-1), no presente estudo, foi devido ao importante papel que ambos desempenham no controle da proliferação celular e sua participação no processo da carcinogênese esofágica.

Nossas observações indicaram que a mucosa escamosa do esôfago, complicada pelo processo inflamatório decorrente do refluxo gastroesofágico, apresentou expressão da proteína p53 de 7% na mucosa escamosa normal; 21,4% na esofagite leve; 52,2% na esofagite moderada e 60% na esofagite acentuada. Notamos positividade para a proteína p53 em 4 pacientes com epitélio escamoso sem alteração histológica. A expressão aumentada da proteína p53, raramente, é detectada em mucosa normal do esôfago. Alguns autores têm relatado o acúmulo dessa proteína em mucosa normal e na hiperplasia da camada basal do epitélio esofágico, em pacientes com maior risco de adenocarcinoma esofágico. Além disso, sabe-se que mesmo na ausência de lesões da mucosa, o refluxo crônico pode produzir alterações proliferativas e moleculares (15;25). Em relação à estratificação dos níveis de intensidade da esofagite, nosso estudo imunohistoquímico demonstrou uma maior prevalência de casos positivos nos grupos esofagite moderada e acentuada, em relação aos grupos esofagite leve e epitélio escamoso normal,

demonstrando também uma correlação evidente entre a expressão aumentada da proteína p53 e a progressão do grau histológico da esofagite crônica. Tais achados apontam para uma clara correlação entre a gravidade da esofagite e o início de alterações desse marcador, ainda em fases anteriores às alterações morfológicas pré-malignas da mucosa esofágica.

Fagundes et al (20) estudaram a expressão imunohistoquímica da proteína p53, na mucosa esofágica, em 182 pacientes alcoolistas/tabagistas sem sintomas esofágicos, porém com alto risco de carcinoma epidermóide do esôfago e em 20 voluntários saudáveis, não tabagistas e abstêmios. Todos os participantes foram submetidos ao estudo endoscópico do esôfago associado à cromoscopia com Solução de Lugol a 3%. A expressão aumentada da proteína p53 foi detectada em 12% dos pacientes com mucosa escamosa normal; em 14% com esofagite leve; em 22% com esofagite moderada e em 33% com esofagite severa; em 36% com displasia de baixo grau, em 100% com displasia de alto grau e em 100% com carcinoma epidermóide do esôfago. Os autores demonstraram associação da expressão da proteína p53 na mucosa esofágica e seu aumento progressivo, de acordo com a piora dos diferentes níveis de intensidade da esofagite crônica, displasia e câncer esofágico.

No presente estudo, a expressão média do antígeno Ki-67, na camada basal dos pacientes com epitélio normal, foi 21,4%, o que está de acordo com a literatura (26;46). Iftihar et al (46) ao estudarem o índice de proliferação celular (Ki-67) nas mucosas escamosa, colunar metaplásica e gástrica de 23 pacientes com esôfago de Barrett, detectaram índices de proliferação maiores que 15% em amostras histologicamente normais do epitélio esofágico. Ribeiro et al (47), em estudo prospectivo, avaliaram o grau de inflamação, hiperplasia e displasia em 128

amostras endoscópicas de 16 pacientes com acalasia avançada. Os autores concluíram que a inflamação presente nos pacientes correlacionou-se com a expressão aumentada da proteína p53 e com o aumento no índice de proliferação celular (PCNA). Todas as amostras analisadas expressaram positividade para o PCNA na camada basal do epitélio esofágico. Nosso estudo também demonstrou que a proliferação celular, avaliada pelo antígeno Ki-67 (MIB-1), esteve presente apenas na camada basal em todos os grupos com exceção de 6 pacientes que apresentaram positividade no terço médio do compartimento proliferativo do epitélio escamoso do esôfago: esofagite leve – 2 casos, esofagite moderada – 3 casos e esofagite acentuada – 1 caso.

Nos pacientes com esofagite leve, moderada e acentuada, o índice de proliferação celular, avaliado pelo Ki-67, foi de 30,8%, 47,1% e 48,3%, respectivamente. Os valores encontrados são mais marcantes do que na literatura, que apresentam índices de proliferação (Ki-67) entre 10 e 24% na maioria das amostras de esofagite analisadas (48). Essas diferenças podem ser, em parte, causadas pelas diferenças metodológicas nesses estudos, tais como: amostras pequenas e pouco representativas e/ou estudos baseados em diferentes áreas histológicas de peças de esofagectomias, nos quais um paciente contribuiu com vários cortes histológicos. Variações na realização do método imunohistoquímico, como diferentes tipos de anticorpos e aferição do marcador, também podem explicar discordância nos resultados encontrados. Em nosso estudo, a obtenção dos fragmentos de mucosa esofágica foi através da pinça de biópsia com estilete central que possibilita maior precisão e maior quantidade de tecido esofágico. O número de amostras avaliadas foi coincidente com o número de pacientes, representando assim cada paciente um único diagnóstico.

Demonstramos correlação significativa entre o aumento da atividade proliferativa, aferida pelo Ki-67, e os diferentes níveis de intensidade da esofagite crônica. Houve diferença no índice de proliferação entre os pacientes com esofagite leve e os pacientes com esofagite moderada e acentuada ($p < 0,05$). Estudo imunohistoquímico realizado por Nishiyama et al (10) analisou, por meio de biópsias endoscópicas as proteínas reguladoras do ciclo celular (p21, p27 e Ki-67), em 46 pacientes com evidências de refluxo e em 10 pacientes normais. A proliferação celular foi detectada, principalmente, na camada basal do epitélio esofágico, e os autores demonstraram uma correlação significativa da imunorreatividade do antígeno Ki-67, nos compartimentos proliferativos da mucosa escamosa com as alterações histológicas e endoscópicas da esofagite. Os nossos resultados corroboram tais resultados demonstrando que o índice de proliferação celular Ki-67, obtido por amostras endoscópicas, esteve associado às lesões inflamatórias da mucosa esofágica, especialmente, nos casos mais acentuados de esofagite crônica decorrente do refluxo gastroesofágico.

O impacto dos fatores fisiopatológicos sobre as alterações moleculares da mucosa esofágica complicada por esofagite não estão totalmente esclarecidos. Há poucos trabalhos sobre o estudo das anormalidades em nível molecular da mucosa escamosa em pacientes com NERD e com doença erosiva. A maioria dos trabalhos relaciona o esôfago de Barrett e sua progressão até o adenocarcinoma do esôfago. Com um melhor conhecimento da biologia molecular, durante as etapas iniciais da DRGE, é possível estabelecer uma terapêutica mais adequada para o controle dos mediadores inflamatórios sobre a mucosa esofágica, antes do surgimento das alterações moleculares, na tentativa de prevenir a progressão da DRGE para a metaplasia e, finalmente, para o adenocarcinoma esofágico.

Nossos resultados, no presente estudo, permitem concluir que a expressão da proteína p53 e o índice de proliferação celular, medido pelo Ki-67 (MIB-1) correlacionaram-se com os achados histológicos da mucosa esofágica associada ao processo inflamatório, sendo progressivamente maiores conforme a piora do grau de esofagite. Além disso, são relevantes dois aspectos: o primeiro é que há uma associação entre o aumento da proliferação e a alteração molecular; o segundo sustenta que essas alterações já são significativamente importantes a partir da fase de esofagite moderada. Tais resultados poderão ter um impacto no nível de acompanhamento endoscópico que deveremos dispensar a esses pacientes, visando diagnosticar, precocemente, a evolução de sua doença. Provavelmente, o uso desses marcadores de forma prospectiva, em pacientes com esofagite moderada e acentuada, poderia proporcionar uma melhor vigilância e, até mesmo, permitir intervenções no processo seqüencial da progressão para o adenocarcinoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Voutilainen M, Sipponen P, Mecklin Jp, Juhola M, Farkkila M: Gastroesophageal reflux disease: prevalence, clinical, endoscopic and histopathological findings in 1128 consecutive patients referred for endoscopy due to dyspeptic and reflux symptoms. *Dig* 2000, 61:6-13.
2. Achem SR. Endoscopy negative gastroesophageal reflux disease. The hypersensitive esophagus. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28:893-904.
3. Moraes-Filho JPP, Ceconello I, Gama-Rodrigues J, Castro LP, Henry MA, Meneghelli UG, Quigley E, Brazilian Consensus Group. Brazilian consensus on gastroesophageal reflux disease: proposals for assessment, classification, and management. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:241-248.
4. Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, Sontag SJ. There are no reliable symptoms for erosive esophagitis and Barrett's oesophagus: endoscopic diagnosis is still essential. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16 (4):735-42.

5. Manabe N, Yoshihara M, Sasaki A, Tanaka S, Haramura K, Chayama K. Reflux Esophagitis: Natural history and treatment. *J Gastroenterol and Hepatol* 2002; 17: 949-954.
6. Solaymani-Dodaran M et al. Risk of oesophageal cancer in Barrett's oesophagus and gastro-oesophageal reflux. *Gut* 2004; 53(8): 1070-1074.
7. Bremner CG, Lynch VP, Ellis HF. Barrett's esophagus: congenital or acquired? An experimental study of esophageal mucosal regeneration in the dog. *Surgery* 1970; 68: 209-216.
8. Correa P, Miller MJ. Carcinogenesis, apoptosis and cell proliferation. *Br Med Bull* 1998; 54: 152-62.
9. Flora-Filho R, Câmara-Lopes LH, Zilberstein B. Critérios histológicos na doença do refluxo gastroesofágico. Reavaliação da sensibilidade da pHmetria esofágica de 24 horas. *Arq Gastroenterol.* 2000; 37(4): 1-10.
10. Nishiyama Y, Koyama S, Andoh A, Moritani S, Kushima R, Fujiyama Y, Hattori T, Bamba T. Immunohistochemical analysis of cell cycle-regulating-protein (p21, p27, and Ki-67) expression in gastroesophageal reflux disease. *J Gastroenterol* 2002; 37(11): 905-11.
11. Moons LM, Kuster JG, Bultman E, Kuipers EJ, Van Dekken H, Tra WM, Kleijian A, Kwekkwboom J, van Vilet AH, Siersema PD. Barrett esophagus is characterized by a predominantly humoral inflammatory response. *J Pathol* 2005; 207(3) 269-76.
12. O'Riordan JM, Abdel-atif MM, Ravi N, MacNamara D, Byrne PJ, McDonald GS, Keeling PW, Kelleher D, Reynolds JV. Proinflammatory cytokine and nuclear factor kappa-B expression along the inflammation-metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(6): 1257-64.
13. Mandard AM, Marnay J, Lebeau C, Benar S, Mandar JC. Expression p53 in oesophageal squamous epithelium from surgical specimens resected for carcinoma of the esophagus, with special reference to uninvolved mucosa. *J Pathol* 1997; 181(2):153-7.
14. Chino O, Kijima H, Shimada H, Nishi T, Tanaka H, Oshiba G, Kise Y, Kenmochi T, Himeno H, Tsuchida T, Kawai K, Tanaka M, Machimura T, Tajima T, Makuuchi H. Clinic pathological studies of esophageal carcinoma in achalasia: analyses of

- carcinogenesis using histological and immunohistochemical procedures. *Anticancer Res* 2000, 20(5C): 3717-22.
15. Wang DY, Xiang YY, Tanaka M et al. High prevalence of p53 protein overexpression in patients with esophageal cancer in Linxian, China and its relationship to progression and prognosis. *Cancer* 1994; 74: 3089-3096.
 16. Nigro JM, Baker SJ, Preiseinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Brigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Volgestein B. Mutations in the p53 gene occur in diverse human types. *Nature* 1989; 342: 705-8.
 17. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-6.
 18. Tjian R. Molecular machines that control genes. *Sci Am* 1995; 00: 54-61.
 19. Krishnadath KK, Tilanus HW, Blankestein MV, Bosman FT, Mulder AH. Accumulation of p53 protein in normal, dysplastic, and neoplastic Barrett's oesophageal. *J Pathol* 1995; 75:175-180.
 20. Fagundes R B, Melo C R, Putten A C, Moreira L F, Barros S G. p53 immunexpression: an aid to conventional methods in the screening of precursor lesions of squamous esophageal cancer in patients at high-risk? *Cancer Detect Prev.* 2005; 29 (3): 227-32.
 21. Casson AG, Mukhopaday T, Cleary KR, Ro JY, Levin B, Roth JA. P53 gene mutations in Barrett's epithelium and oesophageal cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 4495-4499.
 22. Gerdes J, Becker MH, Key G, Cattoretti G. Immunohistological detection of tumor growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 1992; 168(1): 85-6.
 23. Gerdes J, Lemke H, Braisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle of a proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984, 133: 1710-15.
 24. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferation cells in microwave-processed formal in fixed paraffin section. *J Pathol* 1992; 168: 357-63.

25. Wang LD, Hong JY, Qiu SL et al. Accumulation of P53 protein in human esophageal precancerous lesions: a possible early biomarker for carcinogenesis. *Cancer Res* 1993; 53:1783-1787.
26. Feith M, Stein HJ, Mueller J, Siewert JR. Malignant degeneration of Barrett's esophagus: the role of the Ki-67 proliferation fraction, expression of E-cadherin and p53. *Dis Esophagus* 2004; 17(4):322-327.
27. Weston AP, Banerjee SK, Sharma P, Tran TM, Richards R, Cherian R. p53 protein overexpression in low grade dysplasia (LGD) in Barrett's esophagus: immunohistochemical marker predictive of progression. *Am J Gastroenterol*; 2001 96(5): 1355-62.
28. Chen X, Ouyang Q, Zhang WY, Li XS, Liang HL. The clinical, pathological features and expression of Ki-67 and COX-2 in severe reflux esophagitis and Barrett's esophagus. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2005; 36(2): 207-9.
29. Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, Triadafilopoulos G, Geboes K, Casson AG, Kerr D, Young LS. Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Pathol* 1999; 154 (4) 965-73
30. Fujiwara Y, Higuchi K, Hamaguchi M, Takashima T, Watanabe T, Tominaga K, Oshitani N, Matsumoto T, Arakawa T. Increased expression of transformation growth factor-alpha and epidermal growth factor receptors in rat chronic reflux esophagitis. *J Gastroenterol and Hepatol*. 2004; 19: 521-527.
31. Hillmann LC, Chiragakis L, Clarke AC, Kaushik SP, Kaye G. Barrett's esophagus: Macroscopic markers and the prediction of dysplasia and adenocarcinoma. *J Gastroenterol and Hepatol* 2003; 18:526-533.
32. Boni L, Benevento A, Shimi SMS, Cushieri A. Free radical production in the esophago-gastro-duodenal mucosa in response to acid and bile. *Dis Esophagus* 2006; 19:99-104.
33. Fitzgerald RC, Onwuegbusi BA, Bajaj-Elliott M, Saeed IT, Burnham WR, Farthing MJ. Diversity in the oesophageal phenotypic response to gastro-oesophageal reflux: immunological determinants. *Gut* 2002; 50(4): 451-9.
34. Ismail-Beiji F, Horton PF, Pope II CE. Histological consequences of Gastroesophageal reflux in an. *Gastroenterol* 1970; 58:163-74.
35. Riddell RH. The biopsy diagnosis of gastroesophageal reflux disease, "carditis," and Barrett's esophagus, and sequel of therapy. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:S31-50.

36. Weinstein WM, Bogoch ER, Bowes KL. The normal human esophageal mucosa: a histological reappraisal. *Gastroenterol* 1975; 68:40-4.
37. Wynford-Thomas D. p53 in tumor pathology: can we trust immunocytochemistry? *J Pathol* 1992, 166: 329-30.
38. Segal F, Kaspary AP, Prolla JC, Leistner S. p53 protein overexpression and p53 mutation analysis in patients with intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's esophagus. *Cancer Let* 2002; 210(2): 213-8.
39. Ribeiro Jr. U, Alves VA, Souza PMSB, Ribeiro AVS, Rawet V, Nonogaki S, Rodrigues JG, Habr-Gama A. Correlação das proteínas p53 e Ki-67 com o prognóstico de pacientes com adenocarcinoma de reto distal. *Rev Bras Coloproct* 2000; 20(4): 248-256.
40. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathol* 1990; 17 (6):489-503.
41. Devesa S, Blot WF, Fraumeni JF. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998; 83(10):2049-2053.
42. Cameron AJ, Ott BJ, Payne WS. The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus. *N Engl J Med* 1985; 313: 857-9.
43. Cameron AJ, Arora AS. Barrett's esophagus and reflux esophagitis: Is there a missing link? *Am J Gastroenterol* 2002; 97(2):273-278.
44. Farhadi A, Fields J, Banan A, Keshavarzian A. Reactive oxygen species: are they involved in the pathogenesis of GERD, Barrett's esophagus, and the latter's progression toward esophageal cancer? *Am J Gastroenterol* 2002; 97(1): 22-6.
45. Wetscher GJ, Hinder RA, Kingler P, et al. Reflux esophagitis in humans is a free radical event. *Dis Esoph* 1997; 10:29-32.
46. Iftikhar SY, Steele RJ, Watson S, James PD, Dilks K, Hardcastle JD. Assessment of proliferation of squamous, Barrett's and gastric mucosa in patients with columnar lined Barrett's oesophagus. *Gut* 1992; 33(6):733-737.

47. Ribeiro AVS, Ribeiro U, Sakai, Clarke MR, Fylyk SN, Ishioka S, Rodrigues JG, Finkelstein SD, Reynolds JC. Integrated p53 histopathologic/genetic analysis of premalignant lesions of the esophagus. *Cancer Detect Prev* 2000; 24(1): 13-23.
48. Ohbu M, Kobayashi N, Okayasu I. Expression of cell cycle regulatory proteins in the multistep process of oesophageal carcinogenesis: stepwise over-expression of cyclin E and p53, reduction of p21(WAF1/CIP1) and deregulation of cyclin D1 and p27(KIP1). *Histopathol* 2001; 39(6): 589-96.
49. Goldman H, Antonioli DA. Mucosal biopsy of the esophagus, stomach, and proximal duodenum. *Human Pathol* 1982; 13:423-48.
50. Polkowski W, van Lanschot JJ, ten Kate FJ, et al. The value of p53 and Ki-67 as markers for tumor progression in the Barrett's dysplasia-carcinoma sequence. *Surg Oncol* 1995; 4: 163-171.

**ANALYSIS OF IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF THE P53 PROTEIN
AND KI-67 ANTIGEN IN THE SQUAMOUS EPITHELIUM OF THE ESOPHAGUS IN
PATIENTS WITH GERD AND CHRONIC ESOPHAGITIS**

** (pré-artigo em Inglês para ser enviado à Revista Endoscopy)*

Authors:

Marcelo Binato

Renato Borges Fagundes

Luise Meurer

Maria Isabel Edelweiss

Richard Ricachenevsky Gurski

Place:

*Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) – General Surgery and Pathology Unit.
Rua Ramiro Barcelos, 2350 – CEP 90035-003. Bairro Rio Branco – Porto Alegre –
RS – Brasil. Fone: (51) 2101.8000.*

Address for Correspondence:

Marcelo Binato

Rua Francisco Manoel Nº 01/ AP 202 CEP 97015-260

Santa Maria – RS – Brasil. Fone: (55) 32225693

Email: mbinato@uol.com.br

ABSTRACT

Introduction: Patients with GERD and Barrett's esophagus are at a greater risk of developing adenocarcinoma of the esophagus. Both groups of patients are more prone to proliferative and molecular alterations caused by the gastroesophageal reflux. There is no certainty whether such alterations are present in early stages of the disease and to what degree.

Objectives: Evaluate the p53 protein and Ki-67 expression in the esophageal mucosa in patients with GERD without mucosal alterations and in patients with esophagitis at different degrees.

Methods: The study involved 138 patients with typical GER symptoms who were subjected to digestive endoscopy and biopsy of the esophageal mucosa, between January 2003 and December 2006. The p53 protein and Ki-67 antigen expression was determined by immunohistochemical study. Patients were divided into four groups following histopathological diagnosis: G1: 58 patients with normal squamous epithelium, G2: 42 patients with mild esophagitis, G3: 23 patients with moderate esophagitis, G4: 15 patients with severe esophagitis.

Results: p53 protein overexpression was found in 7% in G1, 21.4% in G2, 52.2% in G3 and 60% in G4. There was a significant difference in p53 positive in G1 in relation to groups 3 and 4 ($p < 0.001$), which was also found concerning G2 and G4 ($p < 0.05$). The average index of Ki-67 was $21.3 \pm 19.5\%$ in G1, $30.8 \pm 23.4\%$ in G2, $47.1 \pm 23.2\%$ in G3 and $48.3 \pm 25.7\%$ in G4. Significant difference of Ki-67 were found between groups: G1xG3 ($p < 0.001$); G1xG4 ($p < 0.001$); G2xG3 ($p = 0.026$); G2xG4 ($p = 0.046$). A positive and progressively increasing correlation was found between both markers and the worsening of esophagitis ($p < 0.001$).

Conclusion: The overexpression of p53 protein and Ki-67 index were found to be correlated to the histological findings of the esophageal mucosa affected by inflammatory process, particularly in the moderate and severe forms of chronic esophagitis. Such findings showed that molecular and proliferative alterations occur in stages that precede the occurrence of intestinal metaplasia in GERD patients.

Keywords: p53. Ki-67 (MIB-1). GERD. Esophagitis. Adenocarcinoma.

INTRODUCTION

The Gastroesophageal Reflux Disease (GERD) showed a great increase over the last decades. It is estimated that 40% of the adult population experiences symptoms of gastroesophageal reflux at some time during their lives, with 20% of this population having pyrosis symptoms once a week and 10% every day. (1). Therefore, GERD is one of the most frequent gastrointestinal diseases in Western countries, which affects somehow 30% of adults in the United States (2). In Brazil, approximately 12% of the adult population has typical symptoms of gastroesophageal reflux such as pyrosis and/or regurgitation (3). The frequency and severity of reflux symptoms are not always associated to inflammatory alterations in the esophageal mucosa (4). However, erosive esophagitis is found to be predominant in patients over 50 years old (1).

The method chosen for the diagnosis of macroscopic lesions of the esophageal mucosa caused by gastroesophageal reflux was the endoscopic study of the esophagus (3). Reflux esophagitis may lead to complications such as erosions, ulcers, stenosis, Barrett's esophagus and the development of adenocarcinoma of the esophagus (5; 6). However, the esophageal mucosa of many patients with reflux has a normal aspect (*non erosive reflux disease – NERD*) (1). Irritation and chronic inflammation are known carcinogens of many tissues and experimental studies affirm that reflux, in particular, biliary, plays an important role in esophageal carcinogenesis (7;8).

Histological analysis of the esophageal mucosa may support the diagnosis of gastroesophageal reflux by showing epithelial alterations such as hyperplasia of the basal layer and elongation of papillae, as well as the presence of inflammatory cells (neutrophils and eosinophils) (9; 10). Hyperplasia of the basal layer is caused by increased cell recovery, whereas the elongation of papillae is caused by the increased flow of nutrients into epithelial cells. Such alterations characterize the

gastroesophageal reflux in most patients with esophagitis. (9).

Premalignant conditions of the esophagus in chronic inflammation may be associated to a severe inflammatory and humoral response during the evolution of the disease (11). As in other chronic inflammatory conditions, the elevation of inflammatory mediators (immunoglobulins and plasma cells) and the production of oxygen free radicals are related to reflux esophagitis, and both contribute to increase the risk of esophageal cancer, particularly when associated to Barrett's esophagus (11; 12).

Molecular markers (p53, Ki-67, Bcl-2, TGF-alpha, EGF-R) have been studied in various inflammatory alterations such as reflux esophagitis, achalasia and epidermoid carcinoma of the esophagus, with the purpose of assessing the biological behavior of the esophageal epithelium associated to inflammation, particularly in high-risk areas for esophageal cancer (13-15,31). The Tp53 gene is one of the most studied tumor suppressor genes in human carcinomas, being responsible for regulating the cell cycle, repairing cell DNA damage and inducing programmed cell death, when necessary (16; 17). The Tp53 gene encodes the p53 protein (normal) responsible for transition control during stage G1-S of the cell cycle, in order to prevent DNA duplication, mostly in case of mutations (18). The mutation of Tp53 gene generates an altered p53 protein with a longer half-life (6 hours) than normal p53 protein (6 to 20 minutes). The intranuclear accumulation of p53 protein makes its identification possible by immunohistochemical methods (19). Therefore, the p53 protein overexpression has been detected in all stages of neoplastic progression (normal squamous mucosa – chronic esophagitis – metaplasia – dysplasia – carcinoma), and is considered a possible marker of the esophagus carcinogenesis process (13;19-21).

Little is known about how the regenerative process of the inflamed squamous mucosa modulates cell proliferation in esophageal epithelium. The Ki-67 antigen is a nuclear protein used as marker of cell proliferation in many tissues (22). The Ki-67

antigen, of uncertain function, is present in all stages of the cell cycle (G1, S, G2, e M), but absent in the resting stage – G0 (23;24). According to the medical literature, the cell proliferation index, measured by the Ki-67 antigen, together with other cell cycle regulating proteins (p21, p27), follows the progression of inflammatory alterations on the esophageal epithelium in patients with gastroesophageal reflux symptoms (10).

Our study aimed at evaluating the p53 protein expression and the Ki-67 (MIB-1) antigen proliferative activity in the squamous epithelium of the esophagus and in chronic esophagitis in patients with long-standing gastroesophageal reflux.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

Patients aged 30 or over, who were referred to the Digestive Endoscopy Unit of the Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) between January 2003 and December 2006, with typical symptoms of gastroesophageal reflux such as pyrosis and/or regurgitation at least once a week, for a minimum five years, were prospectively and consecutively examined.

Patients with coagulopathy, esophageal stenosis, esophageal varices, hepatopathy, digestive hemorrhage at least over the last 30 days, esophageal cancer, previous radiotherapy or chemotherapy treatment, hypersensitiveness to iodine, use of acid suppressor therapy over the last 60 days or esophageal or stomach surgery were excluded from the study.

Out of the 235 patients (sub-total), only those without esophageal mucosal lesion or with esophagitis of any degree, but histologically confirmed, were selected. Patients with columnar mucosa and adenocarcinoma of the esophagus were excluded.

Prior to endoscopic examination, an informed consent was obtained from

every patient. Also, a questionnaire was completed to define the demographic and clinical characteristics of the patients (annexes 1 and 2).

Upper Digestive Tract Endoscopy

A Fujinon 2200 endoscope, inserted by means of a conventional technique, was used for inspection of the esophagus, stomach and duodenum. With the endoscope placed near Z line, chromoscopy was performed with a 3% lugol solution, with the purpose of highlighting the distal limit of the squamous epithelium and the lesions caused by gastroesophageal reflux.

At least two fragments of mucosa were collected approximately two centimeters above the gastro-esophageal junction without lesion and in the erosion site(s) or unstained area(s).

The detachment of the diaphragm corresponded to the endoscopic impression of the diaphragm muscle. The Z line defined the squamous-columnar junction, while the gastro-esophageal junction was defined by the proximal margin of the gastric folds. The size of the hiatal hernia was defined by the distance of Z line to diaphragmatic detachment. The endoscopic graduation of erosive esophagitis was defined by the Los Angeles classification. (degree A: one or more erosions less than 5 mm long, degree B : one or more non-continuous erosions more than 5 mm long, degree C: continuous erosions involving less than 75% of the organ's circumference degree D: continuous erosions involving more than 75% of the organ's circumference).

Biopsies of the esophageal mucosa were performed with the use of an open biopsy forceps (7 millimeters) with a central stylet. Tissue samples were fixed in 10% formalin and the biopsied areas were recorded in a chart of the esophagus (annex 3).

Histopathological analysis

The fragments of the esophageal mucosa, stained with Hematoxylin-Eosin (H&E), were analyzed in optical microscope by two pathologists of the Department of Pathology of Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Histological findings were classified as follows:

1. squamous epithelium
2. presence of basal layer cells reaching more than 15% of the total epithelial layer;
3. elongation of papillae to more than half of the total epithelial layer;
4. exocitosis: presence of neutrophils and/or eosinophils and/or intraepithelial monocytes;

The histopathological diagnosis of esophagitis was defined by the presence of one or more findings described above, as established by Flora-Filho et al (9). Esophagitis was classified into mild, moderate and severe forms of the disease, according to the degree of the described inflammatory alterations to follow (35):

a) Neutrophils and eosinophils the categories are: mild (average of a cell for field of high magnification); moderated (more than one cell for field of high magnification), severe (massive infiltration of inflammatory cells).

b) Lymphocytes the categories are: mild (less than 3 cells for great increase field); moderated (10 to 50 cells field of high magnification); severe (more than 50 cells field of high magnification).

Immunohistochemical analysis

The immunohistochemical technique was conducted in the Immunohistochemistry Laboratory of the Department of Pathology of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Two 3-micrometer sections were cut

for every paraffin block and mounted in poly-L-lysine coated glass microscope slides. Sections were then deparaffinized by immersion in xylol for 30 minutes and hydrated in alcohol, at different concentrations (70 a 100%), at room temperature (ATA).

After hydration in alcohol, sections were washed again under running water for three minutes and immersed in distilled water for one more minute.

Endogenous peroxidase activity was blocked by immersion of the slides in hydrogen peroxide at 3% for 10 minutes. After antigen recovery in a microwave oven (3 cycles at maximum power output (800 W), for 8 minutes and 20 seconds), blockage of endogenous peroxidase and non-specific reactions was performed.

The primary antibody p53 (DAKO, code M7001 mouse anti p53; clones DO-7), that recognizes the normal and altered forms of the p53 protein, was incubated for 15 hours, at 4°C, in the 1:700 dilution. The primary antibody Ki-67 (DAKO, code MU2970397 mouse anti Ki-67; clones MIB-1), that recognizes the nuclear antigen Ki-67, was incubated for 15 hours, at 4°C, in the 1:400 dilution. Slides were kept in the refrigerator for 15 to 18 hours (10°C), washed and bathed in PBS, and treated with SLAB (Avidin-Biotin). They were washed again and treated with diaminobenzidine (DAB), which produces a dark brown color reaction. Finally, slides were stained with Hematoxylin, immersed in ammonia at 2% and alcohol, and mounted.

Material from breast cancer for the p53 protein and from caecal appendix for the Ki-67 antigen was used as positive control. As negative control a slide was used without the inclusion of the primary antibody. When the color of the cell nucleus was a dark brown color, similar to the positive control, in both markers, the cell was considered reactive.

The evaluation of p53 protein expression considered the proportion of stained cells in a minimum 10 visual fields of high magnification (400X). The parameter used to define the p53 protein expression was the presence of staining in

the nucleus, as shown by Wang et al (25).

The positive cases were those with more than 10% of stained cells by microscopic field of high magnification. Concerning the Ki-67 (MIB-1) antigen, the result was assessed by the proliferation index for every case, which is calculated from the average of stained cells and the total analyzed cells, with a minimum count of 500 cells, as previously described by Feith et al (33).

The immunohistochemical reading of slides was independently performed by two pathologists from the Department of Pathology of the HCPA, with experience in gastrointestinal pathology, and who had no previous knowledge of related clinical and endoscopically information. In case of disagreement, the final result was obtained by consensus between both pathologists, as described by Weston et al (27).

Statistical analysis

The Statistical Package for Social Science (SSPS) 12.0 version was used for data processing and storage. The statistical test used for comparative analysis of the p53 protein between the groups was the chi-square test of linear trend. The Ki-67 data was shown in averages and standard deviations. The continuous variables were compared between categories of the variance analysis (ANOVA). The identification of differences, whenever present, was made by the Turkey test. Linear correlations of p53 and Ki-67 variables with their respective groups were analyzed by the Kendall and Pearson correlation coefficient, respectively. It was considered to be significant when $p < 0.05$. Kappa test was used to control interobserver agreement.

Ethical considerations

The project of the present study was previously evaluated and approved by the Group of Research and Post graduation (GPPG) of the HCPA, according to all

recommended ethical norms. Patients were subjected to upper digestive tract endoscopy and placed under the care of the Inpatient Gastroenterology Unit of the HUSM. All patients gave their free and informed consent with privacy of the collected data being ensured. The study was conducted in compliance with the norms established under the resolution 196/96 of the Brazilian Medical Council and approved by the UFSM Research Ethics Committee and the GPPG/HCPA.

RESULTS

From January 2003 to December 2006, 138 patients who met the inclusion criteria were examined. Following an anatomopathological examination, the selected patients were divided into four groups, as follows: 58 patients with normal squamous epithelium (group 1), 42 patients with mild esophagitis (group 2), 23 patients with moderate esophagitis (group 3) and 15 patients with severe esophagitis (group 4). The percent of histologically normal epithelium was 42% (58/138) and of histological esophagitis was 58% (80/138) in the selected patients.

Immunohistochemical analysis of the 138 patients showed immunoreactivity in 34 patients (24.6%) for the p53 protein. 4/58 (7%) patients with normal epithelium, 9/42 (21,4%) patients with mild esophagitis, 12/23 (52.2%) of the patients with moderate esophagitis and 9/15 (60%) of the patients with severe esophagitis were considered positive for the p53 protein and showed overexpression (more than 10% stained cells) of p53 protein (Figure 1).

There was a significant difference in p53 protein positive reactivity in group 1 compared to groups 3 and 4 ($p < 0.001$), as well as between group 2 and 4 ($p < 0.05$), as shown in Figure 2.

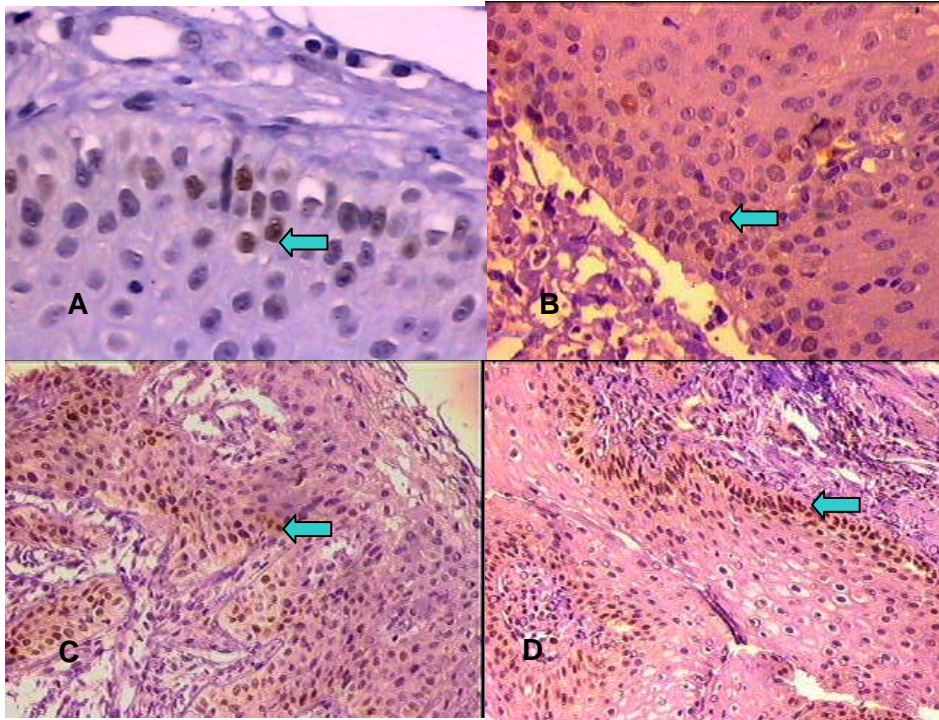


Figure 1. Microphotography of the immunohistochemical expression of the p53 protein – arrows: normal mucosa (A) (x400), mil esophagitis (B), moderate esophagitis (C) and severe esophagitis (D), (x 200).

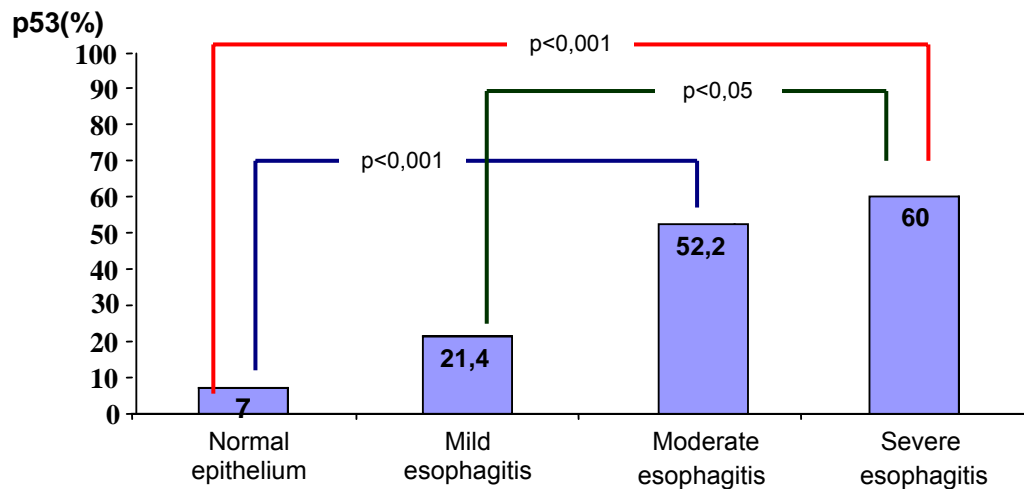


Figure 2. p53 activity in the normal epithelium – mild esophagitis – moderate esophagitis – severe esophagitis.

A linear correlation was identified between the studied groups for the p53 protein ($p < 0.001$) (Figure 3).

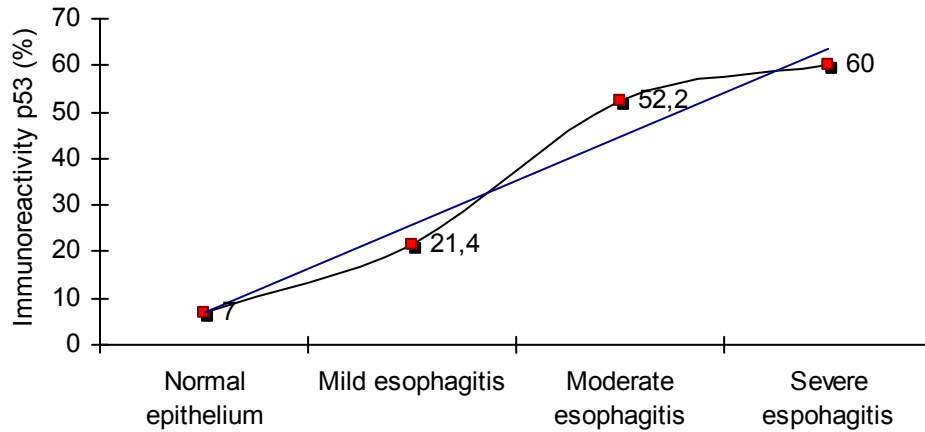


Figure 3. Correlation between p53 and normal epithelium – mild esophagitis – moderate esophagitis – severe esophagitis progression. 0.4 Kendall Coefficient.

Concerning the Ki-67 antigen, the average cell proliferation index measured in the basal layer was $31.4 \pm 24.3\%$. Averages were $21.3 \pm 19.5\%$ in patients with normal epithelium, $30.8 \pm 23.4\%$ in patients with mild esophagitis, $47.1 \pm 23.2\%$ in patients with moderate esophagitis and $48.3 \pm 25.7\%$ in patients with severe esophagitis (Figure 4).

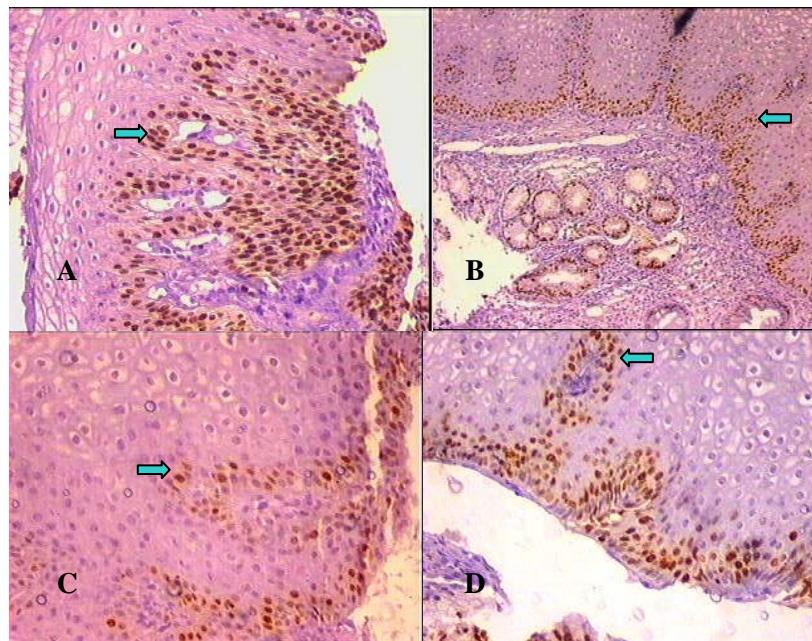


Figure 4. Microphotography of the immunohistochemical expression of the Ki-67 (MIB-1) antigen – arrows: normal epithelium (A) and mild esophagitis (B) with a 200X increase, moderate esophagitis (C) and severe esophagitis (D), 200X increase.

The Ki-67 antigen showed increased distribution from group 1 to group 4. There was a significant difference in the proliferation index (Ki-67) between group 1 and groups 3 and 4, and also between group 2 and groups 3 and 4 (Figure 5).

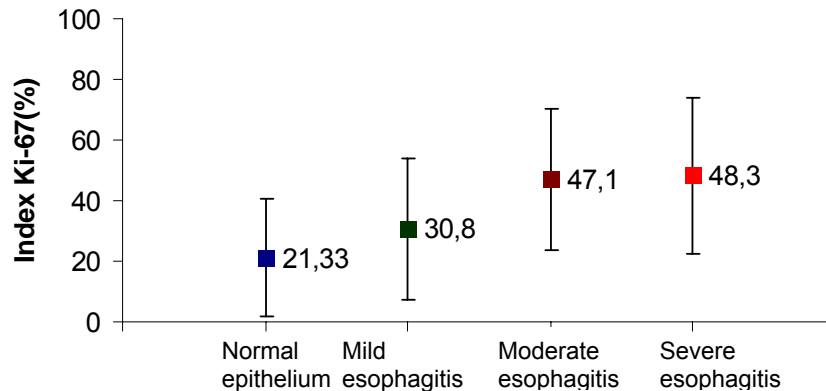


Figure 5. Ki-67 activity in the normal epithelium – mild esophagitis – moderate esophagitis – severe esophagitis sequence. G1xG3 ($p<0.001$); G1xG4 ($p<0.001$); G2xG3 ($p=0.026$); G2xG4 ($p=0.046$).

A moderate linear correlation was identified between the proliferation index Ki-67 (MIB-1) and the normal epithelium- mild esophagitis – moderate esophagitis – severe esophagitis sequence ($p<0.001$) (Figure 6).

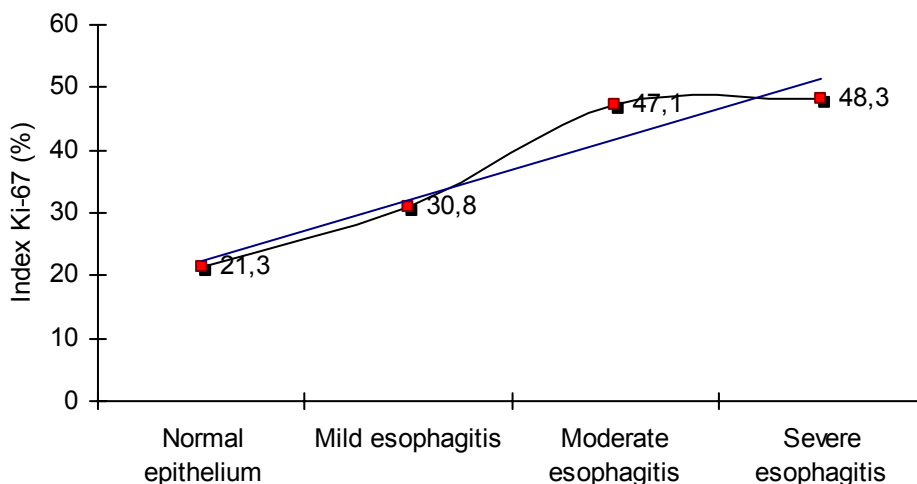


Figure 6. Correlation between Ki-67 and normal epithelium – mild esophagitis – moderate esophagitis- severe esophagitis progression. 0.4 Pearson Coefficient.

DISCUSSION

Chronic inflammatory processes are being increasingly associated to the development of carcinogenesis in digestive organs (10;12;28;31). According to the natural history of GERD, 40% of patients with esophagitis show spontaneous improvement, 50% have persistent esophagitis and around 10% develop Barrett's esophagus (29;30). Hillmann et al (31) conducted a prospective study of the impact of endoscopic findings on patients with Barrett's esophagus. The authors findings are as follows: presence of severe erosive esophagitis in initial endoscopic diagnosis; persistency of inflammatory process in spite of treatment; nodularity of columnar mucosa and stenosis indicated that patients were at a greater risk of developing dysplastic alterations and esophageal adenocarcinoma. Boni et al (32) showed in their immunohistochemical study that inflammatory mediators such as IL-8 and MCP-1 stimulated cell proliferation through the direct action of specific receptors on the esophageal epithelium. Several authors support the theory of association between inflammatory mediators and histological alterations of the esophageal epithelium (basal layer hyperplasia and elongation of the papilla) in esophagitis caused by gastroesophageal reflux, increasing the cell proliferation index, a molecular mechanism that plays an important role in carcinogenesis of the esophagus (11;12;33).

Method

Upper digestive tract endoscopy is one of the most important methods of evaluating GERD complications, particularly when associated to histopathological examination of the esophageal mucosa. Several studies have shown microscopic alterations of the esophageal mucosa obtained in endoscopic biopsies of patients with reflux esophagitis (9;34;35). Since the studies of Ismail-Beiji et al (34),

complemented by Weinstein et al (36), concerning the definition of the ideal site for obtaining esophageal fragments, distal esophagus histology findings in patients with GERD have changed very little (9). In the present study, we have limited the samples of esophageal mucosa in endoscopically normal patients to the location approximately 2 centimeters above the squamous-columnar junction, that is, above the esophagus segments affected by the so-called physiological reflux. Continuous gastroesophageal reflux leads to various inflammatory alterations of the esophageal mucosa such as erythema, erosions and ulcers (35). Histologically, elongation of papillae and basal layer hyperplasia are the regenerative response of the esophageal epithelium associated to the intense mitotic activity in the basal layer (31). Although the criteria for diagnosis of GERD (clinical, endoscopic and functional) are very dynamic, there is consensus that histological esophagitis, alone or with other criteria, is one of the main findings in the diagnosis of GERD (9).

One of the main limitations of the immunohistochemical method in the evaluation of the p53 protein expression occurs when mutation of the Tp53 gene does not determine p53 protein increase, or when there is immunoreactivity in the absence of mutation of the Tp53 gene (37;38). Although DNA (PCR) sequencing is the safest method for evaluating the mutation of the Tp53 gene, immunohistochemistry is considered a more feasible technique for evaluating the functional state of the Tp53 gene because the stabilization of p53 protein half-life, by any mechanism, allows its identification by immunohistochemical methods. Another positive aspect of immunohistochemistry is the fact that it is a simple, largely available method that allows association of topographic observation of the marker expression (39).

Our results were obtained by immunohistochemical study of endoscopic

biopsy samples of the esophageal mucosa. The relationship between real mutation and overexpression of p53 protein were not examined now, since this technique does not allow such observations. The use of DO-7 antibody allows the recognition of the normal and altered forms of p53 protein. Nevertheless, since the normal p53 protein has an extremely short half life, positive cell staining has a strong correlation with the abnormal accumulation of p53 protein. (39). Besides, the progressive increase of the altered protein concentration may determine a negative (predominant) effect on the normal protein activity, through the formation of a protein complex: altered protein *versus* normal protein (49;50). The present study follows a line of research that investigates esophageal carcinogenesis in patients with GERD. Other molecular markers are also being studied in order to throw light on the mechanisms related to the inflammation – metaplasia- esophageal cancer sequence. Proliferative activity has been given much emphasis in this regard. It can also be assessed by other techniques, as follows: incorporation of tritiated thymidine into cell DNA, nuclear antigen of cell proliferation (PCNA) and immunohistochemical evaluation of Ki-67 nuclear antigen (40). The Ki-67 antigen has become the most common marker in the evaluation of cell proliferation, due to its great accuracy and better technical feasibility compared to the previously mentioned methods. Though not very often, measurement of the referred antigen by image analysis has been reported. The conventional count using the percent of marked cells/total evaluated cells is largely performed and used to quantify the proliferative activity of a given tumor or tissue. One of the limitations to the use of the Ki-67 monoclonal antibody is the loss of the nuclear antigen in samples fixed in formalin, which makes it necessary to use fresh tissue samples. However, the use of MIB-1 clone, a real anti-Ki67, makes it possible to detect this antigen in microwave-processed formalin fixed paraffin section (23;24).

Results

The molecular events that characterize the inflammation-metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence are not yet completely clear (12). Adenocarcinoma of the esophagus is the most common esophageal cancer in the United States and in Western Europe (41-43). One of the main hypotheses to explain the fast growth of adenocarcinoma in developed countries is the prevalence of GERD. Thus, one of the mechanisms involved in the carcinogenesis process in individuals with gastroesophageal reflux would be the increase of oxidative stress on the esophageal mucosa (44). Many patients with adenocarcinoma of the esophagus have a history of chronic gastroesophageal reflux, and the increased production of oxygen free radicals in the presence of esophagitis determine a greater damage to cell DNA (12). Also, the permanent stimulus of cell proliferation induced by reflux is an important physiopathological factor in the progression of esophageal carcinogenesis (45). The choice of p53 and Ki-67 (MIB-1) molecular markers in the present study was due to the important role played by both markers in cell proliferation control and their participation in the process of esophageal carcinogenesis. It was found in the present study that the squamous mucosa of the esophagus, when affected by inflammatory process caused by gastroesophageal reflux, showed a p53 protein expression of 7% in the normal squamous mucosa, 21.4% in mild esophagitis, 52.2% in moderate esophagitis and 60% in severe esophagitis. We detected positive reactivity for the p53 protein in 4 patients with squamous epithelium without histological. The overexpression of p53 protein is seldom detected in the normal mucosa of the esophagus. Some authors have reported the accumulation of this protein in the normal mucosa and in basal layer hyperplasia of the esophageal epithelium in patients at higher risk of developing

esophageal adenocarcinoma. Also, it is known that even in the absence of mucosal lesions, chronic reflux may produce proliferative and molecular alterations (15;25). Concerning the stratification of esophagitis intensity levels, of immunohistochemical demonstrated a higher prevalence of positive cases in the moderate esophagitis and severe esophagitis groups compared to mild esophagitis and normal squamous epithelium groups, also indicating an evident correlation between the p53 protein overexpression and the progression of the histological degree of chronic esophagitis. According to these findings, there was a clear correlation between the degree of esophagitis severity and the initial alterations in this marker before the occurrence of premalignant morphological alterations of the esophageal mucosa.

Fagundes et al (20) have studied the immunohistochemical expression of the p53 protein in the esophageal mucosa in 182 patients (alcoholics/smokers) with no esophageal symptoms but at high risk of epidermoid carcinoma of the esophagus and in 20 healthy volunteers (non-smokers and non-alcoholics). All participants were subjected to endoscopy study or the esophagus associated to chromoscopy with a 3% Lugol solution. Overexpression of p53 protein was detected in 12% of the patients with normal squamous mucosa, 14% of patients with mild esophagitis, 33% of patients with severe esophagitis, 36% in patients with low grade dysplasia and 100% in patients with epidermoid carcinoma of the esophagus. The authors demonstrated association of p53 expression in the esophageal mucosa and its progressive increase to worsening of chronic esophagitis, dysplasia and esophageal cancer.

In the present study, the average expression of Ki-67 antigen in basal layer in patients with normal epithelium was 21.4%, in accordance to the literature (26;46). In their study of the (Ki-67) proliferation index in the squamous mucosa, metaplastic

columnar mucosa and gastric mucosa of 23 patients with Barrett's esophagus, Iftihar et al (46) detected proliferation score over 15% in histologically normal samples of the esophageal epithelium. In a prospective study, Ribeiro et al (47) assessed the degree of inflammation, hyperplasia and dysplasia in 128 endoscopic samples of 16 patients with achalasia in an advanced stage. They concluded that inflammation in those patients correlated to the overexpression of p53 protein and to the increase of cell proliferation index (PCNA). All studied samples expressed positive reactivity for PCNA in the basal layer of the esophageal epithelium. Our study has also demonstrated that cell proliferation measured by the Ki-67 (MIB-1) antigen occurred only in the basal layer in all groups except for 6 patients who showed positive reactivity in the middle layer of the proliferative compartment of the squamous epithelium of the esophagus: mild esophagitis – 2 cases, moderate esophagitis – 3 cases and severe esophagitis – 1 case.

The proliferation index, as measured by the Ki-67, in patients with mild, moderate and severe esophagitis was 30.8%, 47.1% and 48.3%, respectively. The values found are more significant than those in the medical literature, which varied between 10 and 24% in most of the analyzed samples of esophagitis, concerning the proliferation indexes measured by the Ki-67 (48). Such discrepancies may be partly caused by methodological differences between studies, e.g. small and not very representative samples and/or studies based on different histological sites of the esophagectomies, where one patient provided several histological sections. Variations in the immunohistochemical method such as the use of different types of antibodies and marker measurement can also explain the divergence of results. In our study, the obtaining of fragments from the esophageal mucosa was performed by a biopsy forceps with central stylet, which allows greater accuracy and use of a larger

portion of esophageal tissue, and also a number of samples based on the same number of patients. Each patient was given a unique diagnosis.

Our study demonstrated a significant correlation between the increase of proliferative activity measured by the Ki-67 antigen and the different levels of chronic esophagitis. There was a difference in the proliferation index between patients with mild esophagitis and patients with moderate and severe esophagitis ($p < 0.05$). The immunohistochemical study conducted by Nishiyama et al (10) examined, by means of endoscopic biopsies, regulation proteins of the cell cycle (p21, p27 and Ki-67), in 46 patients with evidence of reflux and in 10 normal subjects. Cell proliferation was mostly detected in the basal layer of the esophageal epithelium, and the authors showed a significant correlation between immunoreactivity of the Ki-67 antigen in the proliferative compartments of the squamous mucosa and histological and endoscopic alterations of esophagitis. Our results corroborate such findings indicating that the Ki-67 proliferation index, obtained by endoscopic samples, was associated to inflammatory lesions of the esophageal mucosa, specially in the most severe cases of chronic esophagitis caused by gastroesophageal reflux.

The impact of physiopathological factors on molecular alterations of the esophageal mucosa affected by esophagitis are not completely clear. Few studies have addressed squamous mucosa abnormalities in patients with NERD and erosive disease. Most studies relate Barrett's esophagus and its progression up to adenocarcinoma of the esophagus. A better understanding of molecular biology during the initial stages of GERD may help establishing a more suitable therapeutics of control of inflammatory mediators on the esophageal mucosa, prior to occurrence of molecular alterations, in an attempt to prevent progression of GERD to metaplasia and then esophageal adenocarcinoma.

Our findings led us to conclude that the p53 protein expression and the proliferation index measured by the Ki-67 (MIB-1) antigen correlated to histological findings of the esophageal mucosa associated to the inflammatory process, getting progressively higher as esophagitis gets progressively worse. Besides, two aspects were clarified, as follows: first, there is an association between the increase of proliferation and molecular alteration and, second, such alterations become more evident in the moderate esophagitis stage. These results may have an impact on the required level of endoscopic follow-up of patients, aiming at the early diagnosis of their diseases. The prospective use of these markers in patients with moderate and severe esophagitis is likely to provide a better control and also allow intervention to prevent the sequence of events that lead to adenocarcinoma.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Voutilainen M, Sipponen P, Mecklin Jp, Juhola M, Farkkila M: Gastroesophageal reflux disease: prevalence, clinical, endoscopic and histopathological findings in 1128 consecutive patients referred for endoscopy due to dyspeptic and reflux symptoms. *Dig* 2000, 61:6-13.
2. Achem SR. Endoscopy negative gastroesophageal reflux disease. The hypersensitive esophagus. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28:893-904.
3. Moraes-Filho JPP, Cecconello I, Gama-Rodrigues J, Castro LP, Henry MA, Meneghelli UG, Quigley E, Brazilian Consensus Group. Brazilian consensus on gastroesophageal reflux disease: proposals for assessment, classification, and management. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:241-248.
4. Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, Sontag SJ. There are no reliable symptoms for erosive esophagitis and Barrett's oesophagus: endoscopic diagnosis is still essential. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16 (4):735-42.
5. Manabe N, Yoshihara M, Sasaki A, Tanaka S, Haramura K, Chayama K. Reflux Esophagitis: Natural history and treatment. *J Gastroenterol and Hepatol* 2002; 17: 949-954.

6. Solaymani-Dodaran M et al. Risk of oesophageal cancer in Barrett's oesophagus and gastro-oesophageal reflux. *Gut* 2004; 53(8): 1070-1074.
7. Bremner CG, Lynch VP, Ellis HF. Barrett's esophagus: congenital or acquired? An experimental study of esophageal mucosal regeneration in the dog. *Surgery* 1970; 68: 209-216.
8. Correa P, Miller MJ. Carcinogenesis, apoptosis and cell proliferation. *Br Med Bull* 1998; 54: 152-62.
9. Flora-Filho R, Câmara-Lopes LH, Zilberstein B. Critérios histológicos na doença do refluxo gastroesofágico. Reavaliação da sensibilidade da pHmetria esofágica de 24 horas. *Arq Gastroenterol.* 2000; 37(4): 1-10.
10. Nishiyama Y, Koyama S, Andoh A, Moritani S, Kushima R, Fujiyama Y, Hattori T, Bamba T. Immunohistochemical analysis of cell cycle-regulating-protein (p21, p27, and Ki-67) expression in gastroesophageal reflux disease. *J Gastroenterol* 2002; 37(11): 905-11.
11. Moons LM, Kuster JG, Bultman E, Kuipers EJ, Van Dekken H, Tra WM, Kleijian A, Kwekkwboom J, van Vilet AH, Siersema PD. Barrett esophagus is characterized by a predominantly humoral inflammatory response. *J Pathol* 2005; 207(3) 269-76.
12. O'Riordan JM, Abdel-latif MM, Ravi N, MacNamara D, Byrne PJ, McDonald GS, Keeling PW, Kelleher D, Reynolds JV. Proinflammatory cytokine and nuclear factor kappa-B expression along the inflammation-metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(6): 1257-64.
13. Mandard AM, Marnay J, Lebeau C, Benar S, Mandar JC. Expression p53 in oesophageal squamous epithelium from surgical specimens resected for carcinoma of the esophagus, with special reference to uninvolved mucosa. *J Pathol* 1997; 181(2):153-7.
14. Chino O, Kijima H, Shimada H, Nishi T, Tanaka H, Oshiba G, Kise Y, Kenmochi T, Himeno H, Tsuchida T, Kawai K, Tanaka M, Machimura T, Tajima T, Makuuchi H. Clinic pathological studies of esophageal carcinoma in achalasia: analyses of carcinogenesis using histological and immunohistochemical procedures. *Anticancer Res* 2000, 20(5C): 3717-22.

15. Wang DY, Xiang YY, Tanaka M et al. High prevalence of p53 protein overexpression in patients with esophageal cancer in Linxian, China and its relationship to progression and prognosis. *Cancer* 1994; 74: 3089-3096.
16. Nigro JM, Baker SJ, Preiseinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Brigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Volgestein B. Mutations in the p53 gene occur in diverse human types. *Nature* 1989; 342: 705-8.
17. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-6.
18. Tjian R. Molecular machines that control genes. *Sci Am* 1995; 00: 54-61.
19. Krishnadath KK, Tilanus HW, Blankestein MV, Bosman FT, Mulder AH. Accumulation of p53 protein in normal, dysplastic, and neoplastic Barrett's oesophageal. *J Pathol* 1995; 75:175-180.
20. Fagundes R B, Melo C R, Putten A C, Moreira L F, Barros S G. p53 immunoexpression: an aid to conventional methods in the screening of precursor lesions of squamous esophageal cancer in patients at high-risk? *Cancer Detect Prev.* 2005; 29 (3): 227-32.
21. Casson AG, Mukhopadaya T, Cleary KR, Ro JY, Levin B, Roth JA. P53 gene mutations in Barrett's epithelium and oesophageal cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 4495-4499.
22. Gerdes J, Becker MH, Key G, Cattoretti G. Immunohistological detection of tumor growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 1992; 168(1): 85-6.
23. Gerdes J, Lemke H, Braisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle of a proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984, 133: 1710-15.
24. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferation cells in microwave-processed formal in fixed paraffin section. *J Pathol* 1992; 168: 357-63.

25. Wang LD, Hong JY, Qiu SL et al. Accumulation of P53 protein in human esophageal precancerous lesions: a possible early biomarker for carcinogenesis. *Cancer Res* 1993; 53:1783-1787.
26. Feith M, Stein HJ, Mueller J, Siewert JR. Malignant degeneration of Barrett's esophagus: the role of the Ki-67 proliferation fraction, expression of E-cadherin and p53. *Dis Esophagus* 2004; 17(4):322-327.
27. Weston AP, Banerjee SK, Sharma P, Tran TM, Richards R, Cherian R. p53 protein overexpression in low grade dysplasia (LGD) in Barrett's esophagus: immunohistochemical marker predictive of progression. *Am J Gastroenterol*; 2001 96(5): 1355-62.
28. Chen X, Ouyang Q, Zhang WY, Li XS, Liang HL. The clinical, pathological features and expression of Ki-67 and COX-2 in severe reflux esophagitis and Barrett's esophagus. *Sichuan Da Xue Boa Yi Xue an* 2005; 36(2): 207-9.
29. Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, Triadafilopoulos G, Geboes K, Casson AG, Kerr D, Young LS. Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Pathol* 1999; 154 (4) 965-73
30. Fujiwara Y, Higuchi K, Hamaguchi M, Takashima T, Watanabe T, Tominaga K, Oshitani N, Matsumoto T, Arakawa T. Increased expression of transformation growth factor-alpha and epidermal growth factor receptors in rat chronic reflux esophagitis. *J Gastroenterol and Hepatol*. 2004; 19: 521-527.
31. Hillmann LC, Chiragakis L, Clarke AC, Kaushik SP, Kaye G. Barrett's esophagus: Macroscopic markers and the prediction of dysplasia and adenocarcinoma. *J Gastroenterol and Hepatol* 2003; 18:526-533.
32. Boni L, Benevento A, Shimi SMS, Cushieri A. Free radical production in the esophago-gastro-duodenal mucosa in response to acid and bile. *Dis Esophagus* 2006; 19:99-104.
33. Fitzgerald RC, Onwuegbusi BA, Bajaj-Elliott M, Saeed IT, Burnham WR, Farthing MJ. Diversity in the oesophageal phenotypic response to gastro-oesophageal reflux: immunological determinants. *Gut* 2002; 50(4): 451-9.
34. Ismail-Beiji F, Horton PF, Pope II CE. Histological consequences of Gastroesophageal reflux in an. *Gastroenterol* 1970; 58:163-74.

35. Riddell RH. The biopsy diagnosis of gastroesophageal reflux disease, "carditis," and Barrett's esophagus, and sequel of therapy. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:S31-50.
36. Weinstein WM, Bogoch ER, Bowes KL. The normal human esophageal mucosa: a histological reappraisal. *Gastroenterol* 1975; 68:40-4.
37. Wynford-Thomas D. p53 in tumor pathology: can we trust immunocytochemistry? *J Pathol* 1992, 166: 329-30.
38. Segal F, Kaspary AP, Prolla JC, Leistner S. p53 protein overexpression and p53 mutation analysis in patients with intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's esophagus. *Cancer Let* 2002; 210(2): 213-8.
39. Ribeiro Jr. U, Alves VA, Souza PMSB, Ribeiro AVS, Rawet V, Nonogaki S, Rodrigues JG, Habr-Gama A. Correlação das proteínas p53 e Ki-67 com o prognóstico de pacientes com adenocarcinoma de reto distal. *Rev Bras Coloproct* 2000; 20(4): 248-256.
40. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathol* 1990; 17 (6):489-503.
41. Devesa S, Blot WF, Fraumeni JF. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998; 83(10):2049-2053.
42. Cameron AJ, Ott BJ, Payne WS. The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus. *N Engl J Med* 1985; 313: 857-9.
43. Cameron AJ, Arora AS. Barrett's esophagus and reflux esophagitis: Is there a missing link? *Am J Gastroenterol* 2002; 97(2):273-278.
44. Farhadi A, Fields J, Banan A, Keshavarzian A. Reactive oxygen species: are they involved in the pathogenesis of GERD, Barrett's esophagus, and the latter's progression toward esophageal cancer? *Am J Gastroenterol* 2002; 97(1): 22-6.
45. Wetscher GJ, Hinder RA, Kingler P, et al. Reflux esophagitis in humans is a free radical event. *Dis Esoph* 1997; 10:29-32.

46. Iftikhar SY, Steele RJ, Watson S, James PD, Dilks K, Hardcastle JD. Assessment of proliferation of squamous, Barrett's and gastric mucosa in patients with columnar lined Barrett's oesophagus. *Gut* 1992; 33(6):733-737.
47. Ribeiro AVS, Ribeiro U, Sakai, Clarke MR, Fylyk SN, Ishioka S, Rodrigues JG, Finkelstein SD, Reynolds JC. Integrated p53 histopathologic/genetic analysis of premalignant lesions of the esophagus. *Cancer Detect Prev* 2000; 24(1): 13-23.
48. Ohbu M, Kobayashi N, Okayasu I. Expression of cell cycle regulatory proteins in the multistep process of oesophageal carcinogenesis: stepwise over-expression of cyclin E and p53, reduction of p21(WAF1/CIP1) and deregulation of cyclin D1 and p27(KIP1). *Histopathol* 2001; 39(6): 589-96.
49. Goldman H, Antonioli DA. Mucosal biopsy of the esophagus, stomach, and proximal duodenum. *Human Pathol* 1982; 13:423-48.
50. Polkowski W, van Lanschot JJ, ten Kate FJ, et al. The value of p53 and Ki-67 as markers for tumor progression in the Barrett's dysplasia-carcinoma sequence. *Surg Oncol* 1995; 4: 163-171.

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO ANTÍGENO KI-67 (MIB-1) NA MUCOSA
COLUNAR DO ESÔFAGO DISTAL EM PACIENTES COM DRGE**

** (pré-artigo para ser enviado à Revista Human Pathology)*

Versão em Português

Autores:

Marcelo Binato

Renato Borges Fagundes

Luise Meurer

Maria Isabel Edelweiss

Richard Ricachenevsky Gurski

Local de Realização:

Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Serviços de Cirurgia Geral e de Patologia.

*Rua Ramiro Barcelos, 2350 – CEP 90035-003. Bairro Rio Branco – Porto Alegre –
RS – Brasil. Fone: (51) 2101.8000.*

Endereço para Correspondência:

Marcelo Binato

Rua Francisco Manoel Nº 01/ AP 202 CEP 97015-260

Santa Maria – RS – Brasil. Fone: (55) 32225693

Email: mbinato@uol.com.br

RESUMO

Introdução: A mucosa colunar sem metaplasia intestinal no esôfago distal é considerada a etapa que antecede a seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma. Apenas a histologia não consegue diferenciar quais os pacientes que irão desenvolver a intestinalização da mucosa colunar. É necessário à busca por marcadores moleculares que possam predizer a progressão dos pacientes para fases mais avançadas da doença.

Objetivos: Determinar o índice Ki-67 na mucosa colunar de pacientes com sintomas de doença do refluxo gastroesofágico, submetidos à endoscopia digestiva e biópsia.

Métodos: Os 62 pacientes que apresentaram mucosa colunar no esôfago distal foram divididos em dois grupos: G1: 30 pacientes com epitélio colunar sem metaplasia intestinal e G2: 32 pacientes com epitélio colunar com metaplasia intestinal. O Ki-67 foi avaliado por técnica imunohistoquímica, com a utilização do anticorpo monoclonal Ki-67 (MIB-1) na diluição de 1:400. O índice Ki-67 foi determinado em cada compartimento proliferativo da cripta intestinal (terço inferior, terzo médio e superfície epitelial).

Resultados: No G1, a atividade proliferativa (Ki-67) ficou restrita ao terzo inferior da glândula em 83,3% dos pacientes; 3,3% apresentaram positividade até o terzo médio e 13,3% com imunorreatividade até a superfície epitelial da cripta esofágica. No G2, a atividade proliferativa (Ki-67) ficou restrita ao terzo inferior da glândula em 46,9% dos pacientes; 21,9% apresentaram positividade até o terzo médio e 31,2% com imunorreatividade até a superfície epitelial. Foi observado um aumento significativo na prevalência da atividade proliferativa nos compartimentos acima do terzo inferior da glândula, em pacientes com mucosa colunar metaplásica ($p < 0,001$).

Conclusão: A expansão da proliferação celular esteve significativamente associada ao processo de intestinalização da mucosa colunar no esôfago distal. Portanto, a presença de atividade proliferativa acima do terzo inferior da cripta intestinal, em pacientes com mucosa colunar, pode ajudar na identificação de pacientes com maior chance de intestinalização e em consequência maior risco de progressão na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma.

Palavras-Chave: Ki-67 (MIB-1). Esôfago de Barrett. Mucosa colunar. Metaplasia intestinal.

INTRODUÇÃO

A definição atual do esôfago de Barrett ocorreu a partir de 1988, quando o *American College of Gastroenterology (ACG)* definiu o esôfago de Barrett como a substituição do epitélio escamoso estratificado, que normalmente reveste o esôfago, por um epitélio colunar, de qualquer extensão, que possa ser identificado pela endoscopia e confirmado, histologicamente, pela presença de metaplasia intestinal (1). Essa condição está presente em mais de 10% dos pacientes com sintomas de doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) de longa duração. O esôfago distal revestido por epitélio colunar sem metaplasia intestinal é considerado “esôfago revestido por epitélio colunar”, o qual em até 20% dos casos pode ter o diagnóstico de metaplasia intestinal em exames subseqüentes, o que caracteriza a forma progressiva dessa condição e determina a necessidade de acompanhamento destes pacientes (2).

A relação entre os sintomas da DRGE e o risco de desenvolver o adenocarcinoma é decorrente da associação entre o refluxo gastroesofágico e o esôfago de Barrett (3). O epitélio com metaplasia intestinal está predisposto à transformação maligna com cerca de 64 a 86% dos adenocarcinomas esofágicos originando-se a partir do esôfago de Barrett (4;5). Embora o mecanismo exato pelo qual o refluxo causa câncer de esôfago seja incerto, acredita-se que a inflamação e a irritação crônica sejam os determinantes do processo carcinogênico (6;7). Conseqüentemente, uma vigilância endoscópica com biópsia sucessiva torna-se o procedimento padrão para o acompanhamento desse tipo de epitélio no esôfago distal.

Na prática clínica, a displasia é o marcador histológico mais aceito na atualidade para identificar os pacientes com maior risco de desenvolver adenocarcinoma, na seqüência metaplasia-displasia-carcinoma. Entretanto, a displasia como marcador prognóstico possui várias limitações, sendo uma das

mais importantes o fato de se tratarem de grupos heterogêneos de pacientes. Os casos com displasia de alto grau podem apresentar adenocarcinoma oculto em até 40% das vezes (5;8). Isso torna a displasia de alto grau um marcador questionável na vigilância clínica da progressão neoplásica do esôfago de Barrett (9). A evolução natural dos casos de displasia de baixo grau também é incerta, em virtude de fatores como a variabilidade diagnóstica intra e interobservador, problemas de amostragem e maiores taxas de regressão para epitélio não neoplásico (1). Dessa forma, a descoberta por novos marcadores biológicos capazes de complementar os achados histológicos e prever a evolução do esôfago de Barrett é fundamental.

O antígeno Ki-67 está presente em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M), exceto na fase G0, em consequência da perda da parte lábil desse antígeno nuclear (8). O aumento da expressão do antígeno ocorre à medida que a célula progride através do ciclo celular, tanto em epitélios normais quanto malignos (10-12). A proliferação celular pode ser avaliada pelo número de células ativas no ciclo celular (índice de proliferação) e pela localização nos compartimentos proliferativos da cripta intestinal (13). O índice de proliferação celular (Ki-67) tem sido estudado como fator prognóstico de vários tipos de câncer além do esofágico, tais como: colorretal, bexiga, mama e linfoma não-Hodgkin (10;14;15). O compartimento proliferativo, normalmente, é restrito ao terço inferior da cripta intestinal do epitélio, no chamado “pescoço” da glândula. A expansão da proliferação celular pelos demais compartimentos proliferativos da cripta intestinal, com células marcadas do terço inferior até a superfície epitelial, caracteriza um potencial maligno da mucosa do trato gastrointestinal (11).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a proliferação celular Ki-67(MIB-1)

na mucosa do esôfago distal de pacientes com DRGE e sua expressão nos compartimentos proliferativos da cripta intestinal, no epitélio colunar com e sem metaplasia intestinal do esôfago.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes

Foram avaliados, prospectivamente e de forma consecutiva, pacientes com mais de 30 anos de idade, encaminhados ao Serviço de Endoscopia Digestiva do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) entre janeiro de 2003 e dezembro de 2006, com sintomas típicos de refluxo gastroesofágico, como pirose e/ou regurgitação, pelo menos uma vez por semana, no mínimo há 5 anos. Foram critérios de exclusão as seguintes condições: coagulopatia, estenose de esôfago, varizes esofágicas, hepatopatia, hemorragia digestiva a menos de 30 dias, câncer de esôfago, tratamento radioterápico ou quimioterápico prévios, hipersensibilidade ao iodo, uso atual de terapia ácida supressora nos últimos 60 dias, cirurgia sobre o esôfago ou estômago. Dos pacientes selecionados, foram então incluídos no estudo, apenas os pacientes com mucosa colunar visível à endoscopia digestiva alta. Excluíram-se os pacientes com mucosa normal, esofagite e adenocarcinoma esofágico.

Todos os participantes foram informados dos procedimentos da pesquisa e para o que se propunha o estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e responderam um questionário para definir as características sócio-demográficas antes do exame endoscópico do tubo digestivo alto (Anexo 1 e 2).

Endoscopia digestiva alta

Após o exame do esôfago, estômago e duodeno o endoscópio foi

posicionado próximo à linha Z e foi realizada a cromoscopia com Solução de Lugol a 3% para uma melhor definição da junção esofagogástrica e para acentuar áreas de esôfago revestidas por epitélio colunar no esôfago distal.

A linha Z foi definida pela junção escamocolunar enquanto a junção esofagogástrica foi demarcada pela margem proximal das pregas gástricas. O pinçamento diafragmático correspondeu à impressão endoscópica do músculo diafragma. A extensão da mucosa colunar no esôfago foi determinada pela distância da margem proximal e distal da mucosa colunar em relação à arcada dentária superior e ao término das pregas gástricas no esôfago, respectivamente. A ausência de metaplasia intestinal na biópsia em área sugestiva de esôfago de Barrett firmou o diagnóstico de mucosa colunar no esôfago distal. Já o diagnóstico de esôfago de Barrett foi definido pela presença de metaplasia intestinal na biópsia realizada na área de mucosa colunar visível, independentemente da extensão dessa mucosa no esôfago distal. O esôfago de Barrett segmento curto foi definido quando essa mucosa tinha até 2 centímetros, e conceituado como longo, quando apresentava 3 centímetros ou mais de epitélio esofágico metaplásico.

Biópsia

A mucosa colunar visível no esôfago distal foi biopsiada, de acordo com o protocolo de Seattle, com biópsias a cada 1 ou 2 centímetros nos quatro quadrantes. Com o auxílio de pinça fórceps com estilete central, cuja abertura das cúspides é de 7 milímetros, a biópsia foi, inicialmente, obtida próxima à junção esofagogástrica e, subsequentemente, em direção proximal em toda extensão da mucosa colunar no esôfago. Todas as amostras teciduais foram colocadas em formalina a 10% para posterior inclusão em parafina. Duas patologistas do Departamento de Patologia do

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) revisaram de forma independente todas as amostras, após coloração pela Hematoxilina-Eosina (H&E) e Alcian blue em pH 2,5. A metaplasia intestinal foi diagnosticada pela presença de epitélio colunar com células caliciformes e positivas para o Alcian blue.

Análise imunohistoquímica

A técnica imunohistoquímica foi realizada conforme rotina do Laboratório de Imunohistoquímica do Departamento de Patologia da UFSM. Para cada bloco de parafina foram realizados dois cortes histológicos com 4 micras, e montados em lâminas revestidas por poli-L-lisina. Em seguida, os cortes foram desparafinizados por imersão em xilol por 30 minutos e hidratados em álcool de diferentes concentrações (70 a 100%) à temperatura ambiente (ATA). Após a hidratação no álcool, os cortes foram novamente lavados em água corrente por três minutos e mergulhados em água destilada por mais um minuto. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por imersão das lâminas em peróxido hidrogênio a 3% por 10 minutos. Após a recuperação antigênica em forno de microondas, com três ciclos na potência máxima (800 W) por 8 minutos e 20 segundos, procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena e das reações inespecíficas. O anticorpo primário Ki-67 (DAKO, código MU2970397 mouse anti Ki-67; clones MIB-1), que reconhece o antígeno Ki-67, foi incubado por 15 horas, a 4°C, na diluição 1:400. As lâminas ficaram na geladeira por 15 a 18 horas à temperatura de 10°C. Após esse período, foram lavadas e banhadas no PBS, com aplicação posterior do LSAB (Avitina Biotina). Após nova lavagem, foi utilizado o cromógeno diaminobenzidina (DAB), que tem a característica de fornecer a coloração castanha à reação. Finalmente, após coloração pela Hematoxilina-Haans e passagem em amônia a 2% e álcool, as

lâminas foram montadas.

O controle positivo foi realizado com apêndice cecal, enquanto o controle negativo foi determinado pela omissão do anticorpo primário. Foi considerada reativa a célula cujo núcleo apresentou coloração castanha evidente, semelhante à do controle. A distribuição dos núcleos corados (positivos) foi avaliada através de microscópio óptico, nos compartimentos proliferativos da cripta intestinal (terço inferior, terço médio e superfície epitelial) em mucosa colunar do esôfago, conforme descrito previamente por Wada et al (16).

A leitura imunohistoquímica das lâminas foi realizada pelas mesmas patologistas que fizeram a leitura da histopatologia convencional de forma independente e sem o conhecimento das informações clínicas e endoscópicas. Quando discordante, o resultado final foi obtido por consenso entre as patologistas.

Análise estatística

Para armazenamento e processamento dos dados, foi utilizado o Statistical Package for Social Science (SSPS), versão 12.0. Os dados para o Ki-67 foram apresentados em médias e desvios-padrão e comparados entre categorias pela análise de variâncias (ANOVA). A localização das diferenças, quando presentes, foi realizada pelo teste Tukey. Para a análise da expansão da proliferação celular nos compartimentos proliferativos da cripta intestinal foi usado o teste qui-quadrado de tendência linear. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

Considerações éticas

Este trabalho teve seu projeto previamente avaliado e aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA, seguindo todas as normas éticas

preconizadas. Os pacientes foram submetidos à endoscopia digestiva alta pelo atendimento assistencial do Serviço de Gastroenterologia do HUSM. Foi utilizado o consentimento informado e os pacientes tiveram a privacidade de seus dados coletados protegida. O estudo seguiu as normas emanadas da resolução 196/96 do CFM e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CCS da UFSM e pelo GPPG/HCPA.

RESULTADOS

Do total de duzentos e trinta e cinco pacientes (235) com sintomas de refluxo gastroesofágico de longa duração (>5 anos) avaliados, foram selecionados 62 (26,3%) pacientes que apresentaram diagnóstico endoscópico de mucosa colunar no esôfago distal. Após estudo anátomo-patológico das amostras teciduais, os 62 pacientes foram divididos em dois grupos: 30 pacientes com mucosa colunar sem metaplasia intestinal (48,4%) e 32 pacientes com mucosa colunar com metaplasia intestinal (51,6%).

Considerando a distribuição da imunorreatividade (Ki-67), nos compartimentos proliferativos, dos pacientes com epitélio colunar sem metaplasia intestinal, observamos atividade proliferativa restrita ao terço inferior da glândula em 25 casos (83%), 1 caso com células positivas até terço médio (3%) e 4 casos (13%) com imunorreatividade até a superfície epitelial da cripta esofágica. Já os pacientes com mucosa colunar com metaplasia intestinal apresentaram 15 casos (46,9%) com atividade proliferativa restrita ao terço inferior da glândula, 7 casos (21,9%) com núcleos positivos até o terço médio e 10 casos (31,2%) com imunorreatividade até a superfície epitelial (Figura 1).

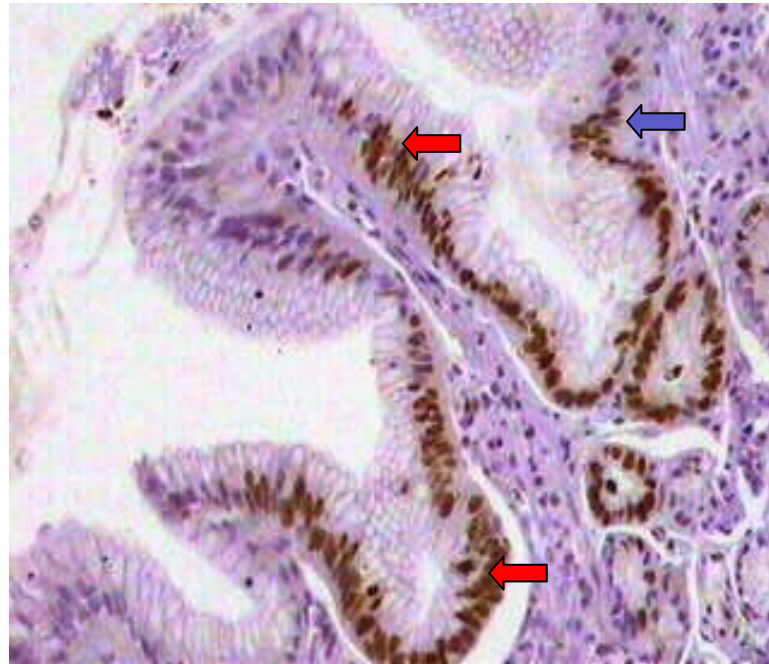


Figura 1. Atividade proliferativa Ki-67 (MIB-1) nos compartimentos proliferativos da mucosa colunar com metaplasia intestinal (terço inferior e terço médio da glândula – setas vermelhas; superfície epitelial – seta azul).

O índice de proliferação avaliado pelo Ki-67 (MIB-1) nos compartimentos proliferativos da cripta intestinal nos pacientes com mucosa colunar sem metaplasia intestinal foi de $37 \pm 26,3$, 16 ± 14 , 6 ± 3 e nos pacientes com mucosa colunar com metaplasia intestinal foi de $52 \pm 24,6$, 12 ± 8 , 4 ± 3 , respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Prevalência e índice de proliferação Ki-67 nos compartimentos proliferativos.

	Mucosa colunar s/ MI (%)	Média±DP (%)	Mucosa colunar c/ MI (%)	Média±DP (%)
Terço Inferior	25 (83,3)	$37 \pm 26,3$	15 (46,9)	$52 \pm 24,6$
Terço médio	1 (3,3)	16 ± 14	7 (21,9)	12 ± 8
Superfície epitelial	4 (13,3)	6 ± 3	10 (31,2)	4 ± 3
Total	30 (100)		32 (100)	

A prevalência de casos positivos (Ki-67), nos pacientes com epitélio colunar sem metaplasia intestinal acima do compartimento proliferativo normal, foi de 16,6%; Já nos pacientes com epitélio colunar com metaplasia intestinal, a prevalência de

casos positivos acima do compartimento proliferativo normal da cripta intestinal foi de 53,1%. Identificamos que o número de pacientes com imunorreatividade pelo Ki-67 (MIB-1) acima do terço inferior da glândula, foi significativamente maior no grupo com epitélio colunar com metaplasia intestinal em relação àqueles sem metaplasia intestinal ($p < 0,001$) (Figura 2).

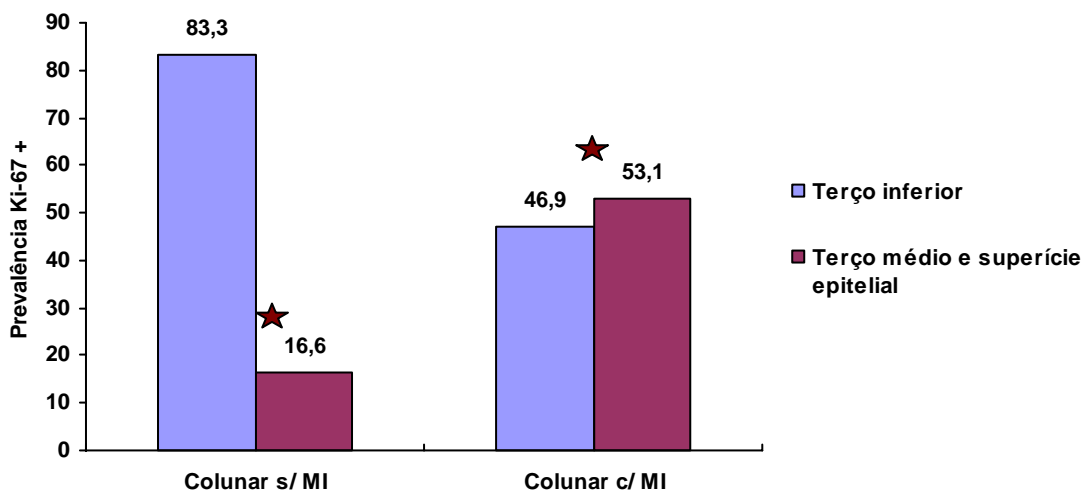


Figura 2. Estratificação da imunorreatividade (Ki-67) nos compartimentos proliferativos da cripta intestinal nos pacientes com mucosa colunar com e sem metaplasia intestinal ($p < 0,001$).

DISCUSSÃO

Uma variedade de oncogenes, genes supressores tumorais e proteínas ligadas ao controle do ciclo celular têm representado um papel importante no desenvolvimento do adenocarcinoma do esôfago (4;17;18). Nos últimos quinze anos, aumentou muito o número de estudos sobre a proliferação celular e sua importância na carcinogênese esofágica (11;12;19). A determinação imunohistoquímica do índice de proliferação celular e sua localização nos compartimentos proliferativos da cripta intestinal têm sido relacionados à progressão na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma (8;14;20).

Método

Diversos estudos têm utilizado como marcadores de proliferação celular, o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e o antígeno nuclear Ki-67 (8;10;19;21). Ambos podem ser avaliados por técnicas imunohistoquímicas. O PCNA demonstra a proliferação das células apenas na fase de transição G1/S, enquanto o Ki-67 reflete a atividade proliferativa em todas as fases ativas do ciclo celular, especialmente na fase de mitose (11). A avaliação quantitativa da proliferação celular do Ki-67 tem sido realizada por técnicas sofisticadas de elevado custo, que utilizam imagens digitalizadas, e também pela citometria de fluxo, pouco acessível à maioria dos centros diagnósticos histopatológicos (11;22;23). Outra limitação da análise da citometria de fluxo é a necessidade de amostras de tecido fresco e a execução trabalhosa (23,24).

A análise semi-quantitativa da proliferação celular pelo Ki-67, através do microscópio óptico, tem sido eleita pelos patologistas em virtude de sua grande factibilidade e acurácia. Para esse tipo de análise, tem-se utilizado o índice Ki-67, que considera o percentual de células marcadas/total de células avaliadas, em uma determinada área representativa da amostra tecidual (11).

O estudo qualitativo da atividade proliferativa tem como base o tipo de tecido e a localização topográfica das células marcadas nos compartimentos proliferativos dos epitélios (11). Gerdes et al (10) descreveram a utilização do antígeno Ki-67 (MIB-1) na avaliação da atividade proliferativa, nos compartimentos da cripta intestinal, em pacientes com mucosa colunar no esôfago distal. A utilização do anticorpo monoclonal Ki-67 (clone MIB-1) possibilitou a detecção do antígeno de superfície nuclear em amostras teciduais incluídas na parafina e, rotineiramente, processadas com recuperação antigênica em forno de microondas (10;25).

Feith et al (14) analisaram a expressão do Ki-67 (MIB-1) na seqüência metaplasia-displasia-carcinoma, por cortes de diferentes áreas histológicas em 24 peças de adenocarcinomas do esôfago distal, e detectaram não só a elevação no índice de proliferação celular ($34,9 \pm 11,1\%$), como a presença de células positivas no terço médio e superfície epitelial, em regiões com metaplasia colunar sem displasia. Nossos resultados também demonstraram que a escolha do método imunohistoquímico, na avaliação da atividade proliferativa, foi útil para classificar, topograficamente, a imunorreatividade pelo Ki-67 (MIB-1), no epitélio colunar do esôfago distal, mesmo em amostras obtidas por biópsia endoscópica, especialmente, nos casos com presença de metaplasia intestinal.

Outro aspecto a ser salientado é a potencial limitação no diagnóstico da metaplasia intestinal, e na presença de lesões displásicas, pelo chamado *sampling error*, o qual pode ocorrer em pacientes com mucosa colunar no esôfago distal, onde não foi encontrada, pela biópsia, metaplasia intestinal ou displasia. Esse é um aspecto salientado em vários trabalhos que relatam desaparecimento da metaplasia após tratamento adequado do refluxo gastroesofágico (28). Metodologicamente, procuramos minimizar esse viés, realizando biópsias em todos os pacientes, sempre pelo mesmo endoscopista e seguindo o protocolo de Seattle, que foi descrito, exatamente, para uniformizar o local e padrão das biópsias a serem realizadas.

Resultados

A proliferação celular desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de diferentes tipos de câncer (15). Uma das razões de sua importância, na progressão da seqüência epitélio escamoso-metaplasia-displasia-adenocarcinoma, é o aumento do índice de proliferação celular e sua expansão

pelos compartimentos proliferativos do epitélio esofágico (11;12). Feith et al (14) relataram que a atividade proliferativa (Ki-67), no epitélio colunar com metaplasia intestinal sem displasia e no epitélio escamoso, era restrita aos compartimentos proliferativos normais de cada epitélio (“pescoço” da glândula e camada basal, respectivamente), que representam a zona natural da proliferação celular. Os autores concluíram que a expansão da proliferação, pelos compartimentos proliferativos, representa uma etapa inicial na progressão do esôfago de Barrett ao adenocarcinoma esofágico. Nessa mesma direção, Kim et al (26) também identificaram que o aumento da proliferação celular pelos compartimentos proliferativos, com imunorreatividade na superfície epitelial da cripta intestinal, é um indicador de crescimento celular desordenado.

Hong et al (11) estudaram a expressão imunohistoquímica (Ki-67) por análise de imagens digitalizadas em 43 pacientes com esôfago de Barrett. Demonstraram que o índice de proliferação Ki-67 (33,5%) e sua expansão pelos compartimentos proliferativos correlacionaram-se com a progressão neoplásica na seqüência metaplasia-displasia-carcinoma. Observaram também que, nas amostras de esôfago de Barrett sem displasia, a imunorreatividade ficou restrita à zona proliferativa normal da cripta intestinal. Nenhuma imunorreatividade foi detectada na superfície epitelial. Os casos com displasia de baixo e alto grau apresentaram, proporcionalmente, um maior índice de proliferação (Ki-67) e expansão pelos compartimentos proliferativos com imunorreatividade até a superfície epitelial da cripta intestinal. Os autores concluíram que a identificação de imunorreatividade pelo Ki-67, além da zona normal de proliferação da cripta intestinal, é interpretada não somente como evidência do aumento da proliferação celular, mas também como um potencial de degeneração maligna da metaplasia intestinal no esôfago de Barrett

(11;12;14;27).

O presente trabalho detectou a presença de imunorreatividade avaliada pelo antígeno Ki-67 (MIB-1) no terço inferior, terço médio e superfície epitelial da cripta intestinal, tanto em pacientes com mucosa colunar sem metaplasia intestinal, quanto nos pacientes com mucosa colunar com metaplasia intestinal. Esse achado demonstra que mesmo em fases anteriores à intestinalização da mucosa colunar, já ocorre certo nível de aumento da proliferação celular. Talvez os pacientes que, mesmo sem a presença da metaplasia intestinal, já apresentam uma proliferação em direção a superfície epitelial, desenvolvam uma condição maior de sofrerem a transformação para mucosa colunar com metaplasia intestinal e com pior prognóstico de progressão, na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma.

Ishizuka et al (27) analisaram a expressão imunohistoquímica do antígeno Ki-67 em pacientes com diagnóstico endoscópico de mucosa colunar no esôfago distal. Dos 91 pacientes selecionados, a biópsia demonstrou 26 com tipo histológico fúndico, 16 juncional (cárdico) e 49 epitélios colunar especializado. A extensão de núcleos positivos no terço médio e na superfície epitelial foi maior nos pacientes com epitélio colunar e metaplasia intestinal com uma prevalência de 51% dos casos. O grupo epitélio colunar juncional apresentou uma prevalência de 25% dos casos com núcleos positivos acima da zona normal de proliferação celular. Os autores concluíram à semelhança de Hong et al (11), que a imunorreatividade no terço médio e superfície epitelial da cripta esofágica representaram um aumento importante da proliferação celular. Chamaram também a atenção para o potencial de degeneração maligna nos casos de esôfago de Barrett, na presença desse aumento da atividade proliferativa.

Dessa forma, tendo como base a localização da atividade proliferativa acima

da zona normal de proliferação, os pacientes com esse padrão de imunorreatividade, mesmo sem evidências significativas na elevação do índice de proliferação (Ki-67), nos respectivos compartimentos proliferativos, deveriam ser acompanhados por uma vigilância mais periódica. Nossas observações foram similares a esses autores e indicaram uma prevalência de 16,6% e 53% dos casos com atividade proliferativa, acima da zona normal de proliferação da glândula, nos pacientes com epitélio colunar sem metaplasia intestinal e epitélio colunar com metaplasia intestinal, respectivamente. Sabe-se que a intestinalização da mucosa colunar está relacionada a presença de refluxo alcalino, e que estímulos alcalinos estão relacionados ao aumento da proliferação *in vitro* (21). Portanto, é possível que esses pacientes com mucosa colunar sem metaplasia intestinal, mas com aumento superficial da proliferação celular, devam ser acompanhados, uma vez que poderão ter um comportamento clínico similar ao daqueles com esôfago de Barrett. Esse subgrupo de pacientes e todos os pacientes aqui estudados, serão acompanhados a longo prazo e sua evolução poderá gerar dados mais claros sobre tais questionamentos.

Jankowski et al (19) estudaram a expressão imunohistoquímica de proteínas reguladoras de crescimento celular, por meio de biópsias endoscópicas, em 30 pacientes com mucosa colunar e diferentes apresentações histológicas de esôfago de Barrett (fúndico ou cardíaco-10, intestinal-10 e adenocarcinoma em esôfago de Barrett-10). Observaram uma elevação significativa do índice de proliferação celular pelo Ki-67 e dos fatores de crescimento alfa e epidérmico nos pacientes com epitélio colunar com metaplasia intestinal e adenocarcinoma comparado com os outros tipos de epitélio colunar presente no esôfago distal.

Iftikar et al (13) estudaram a expressão imunohistoquímica do Ki-67 no

esôfago de Barrett com e sem adenocarcinoma associado. Os autores não encontraram diferença significativa do índice de proliferação celular entre o epitélio colunar gástrico (controle) e o epitélio colunar no esôfago distal, sugerindo um comportamento biológico semelhante entre os dois tipos de epitélio.

Nosso estudo verificou que a distribuição da imunorreatividade pelo Ki-67 não ficou restrita ao compartimento proliferativo normal nos pacientes com mucosa colunar no esôfago distal. Observamos, diferentemente de outros estudos, a presença de expansão da atividade proliferativa do terço inferior da glândula até a superfície epitelial nos dois grupos estudados, e mais que isso, uma significativa diferença no índice de expansão entre os pacientes com mucosa colunar com e sem metaplasia intestinal ($p < 0,001$).

Os resultados encontrados, neste estudo, demonstraram haver uma associação da proliferação celular pelos compartimentos proliferativos da cripta intestinal (terço inferior, terço médio e superfície epitelial) com o processo de intestinalização da mucosa colunar no esôfago distal, em pacientes com sintomas de refluxo gastroesofágico de longa duração. Estudos de seguimento no futuro, com a utilização de marcadores moleculares como o Ki-67 entre outros, poderão indicar a importância destes marcadores em prever a evolução das alterações histológicas na mucosa colunar no esôfago distal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sampliner RE. Practice guidelines on the diagnosis, surveillance, and therapy of Barrett's esophagus. The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(7):1028-1032.
2. Moraes-Filho JPP, Cecconello I, Gama-Rodrigues J, Castro LP, Henry MA, Meneghelli UG, Quigley E, Brazilian Consensus Group. Brazilian consensus on gastroesophageal reflux disease: proposals for assessment, classification, and

- management. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:241-248.
3. Weston AP, Krmpotich PT, Cherian R, Dixon A, Topalovski M. Prospective long term endoscopic and histologic follow-up of short segment Barrett's esophagus: Comparison with traditional long segment Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 1997; 93: 407-13.
 4. Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's Adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001; 233(3):322-37.
 5. Younes M, Ertan A, Lechago LV, Somoano JR, Lechago J. p53 protein accumulation is a specific marker of malignant potential in Barrett's metaplasia. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 697-701
 6. Vaezi MF, Richter JE. Role of acid and duodenogastroesophageal reflux in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterol* 1996; 111(5):1192-1199.
 7. Wetscher GJ, Schwelberg H, unger A, et al. Reflux-induced apoptosis of the esophageal mucosa is inhibited in Barrett's esophagus. *Am Surg* 1998; 176: 569-573.
 8. Gerdes J, Lemke H, Braisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle of a proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984, 133: 1710-15.
 9. Zaninotto G, Parenti AR, Ruol A, et al. Oesophageal resection for high grade dysplasia in Barrett's oesophagus. *Br J Surg* 2000; 87: 1102-5.
 10. Gerdes J, Becker MH, Key G, Cattoretti G. Immunohistological detection of tumor growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 1992; 168(1): 85-6.
 11. Hong MK, Laskin WB, Herman BE, et al. Expansion of the Ki-67 proliferative compartment correlates with degree of dysplasia in Barrett's esophagus. *Cancer* 1995; 75: 423-429.
 12. Polkowski W, van Lanschot JJ, ten Kate FJ, et al. The value of p53 and Ki-67 as markers for tumor progression in the Barrett's dysplasia-carcinoma sequence. *Surg Oncol* 1995; 4: 163-171.
 13. Iftikhar SY, Steele RJ, Watson S, James PD, Dilks K, Hardcastle JD. Assessment

of proliferation of squamous, Barrett's and gastric mucosa in patients with columnar lined Barrett's oesophagus. *Gut* 1992; 33(6):733-737.

14. Feith M, Stein HJ, Mueller J, Siewert JR. Malignant degeneration of Barrett's esophagus: the role of the Ki-67 proliferation fraction, expression of E-cadherin and p53. *Dis Esophagus* 2004; 17(4):322-327.
15. Porschen R, Kriegel A, Langen C, Classen S, Hilse M, Lohe B et al. Assessment of proliferative activity in carcinomas of the human alimentary tract by Ki-67 immunostaining. *Int J Cancer* 1991; 47(5):686-691.
16. Wada R, Yamaguchi T, Tanizaki T. Pathological and molecular –biological studies on sequence from reflux esophagitis to development of Barrett's adenocarcinoma. *Dig Endosc* 2005, 17: 64-68.
17. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340(11):825-831.
18. O'Riordan JM, Abdel-latif MM, Ravi N, MacNamara D, Byrne PJ, McDonald GS, Keeling PW, Kelleher D, Reynolds JV. Proinflammatory cytokine and nuclear factor kappa-B expression along the inflammation-metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(6): 1257-64.
19. Jankowski J, McMenemin R, Hopwood D, Penston J, Wormsley KG. Anormal expression of growth regulatory factors in Barrett's oesophagus. *Clin Sci* 1991; 81: 663-668.
20. Hameeteman W, Tytgat GN, Houthoff HJ, van den Tweel JG. Barrett's esophagus: development of dysplasia and adenocarcinoma. *Gastroenterol* 1989; 96(1):1249-1256.
21. Fitzgerald RC, Omary MB, Triadafilopoulos G. Dynamic effects of acid on Barrett's esophagus. An ex vivo proliferation and differentiation model. *J Clin Invest* 1996; 98(9):2120-2128.
22. Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS. Barrett's esophagus: cell cycle abnormalities in advancing stages of neoplastic progression. *Gastroenterol* 1993; 105(1):119-129.

23. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. Barrett's esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterol* 1987; 93(1):1-11.
24. Reid MM. Flow cytometry and Kleihauer tests. *J Clin Pathol* 1996; 49(4):354.
25. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferation cells in microwave-processed formal in fixed paraffin section. *J Pathol* 1992; 168: 357-63.
26. Kim R, Clarke MR, Melhem MF, Young MA, Vanbibber MM, Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro U, Reynolds JC. Expression of p53, PCNA, and C-erbB-2 in Barrett's metaplasia and adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 1997 42: 2453-62.
27. Ishizuka I, Andoh A, Koyma S, Moritani A, Kushima R, Hattori T, Fujiyama Y. Immunohistochemical analysis of short-segment Barrett's esophagus. *J Gastroenterol and Hepatol* 2004; 19: 1410-1416.
28. Gurski RR, Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR, Bremner CG, Chandrasoma PT et al. Barrett's esophagus can and does regress after antireflux surgery: a study of prevalence and predictive features. *J Am Coll Surg* 2003; 196(5):706-712.

**IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF KI-67 (MIB-1) ANTIGEN IN COLUMNAR
MUCOSA OF THE DISTAL ESOPHAGUS IN PATIENTS WITH GERD**

** (pré-artigo em Inglês para ser enviado à Revista Human Pathology)*

Authors:

Marcelo Binato

Renato Borges Fagundes

Luise Meurer

Maria Isabel Edelweiss

Richard Ricachenevsky Gurski

Place:

Hospital de Clínicas de Porto Alegre. General Surgery and Pathology units.

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – CEP 90035-003. Bairro Rio Branco – Porto Alegre –

RS – Brasil. Fone: (51) 2101.8000.

Address for Correspondence:

Marcelo Binato

Rua Francisco Manoel Nº 01/ AP 202 CEP 97015-260

Santa Maria – RS – Brasil. Fone: (55) 32225693

Email: mbinato@uol.com.br

ABSTRACT

Introduction: Columnar mucosa without intestinal metaplasia in distal esophagus is considered to be the stage that precedes the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. Histology alone cannot establish the percentage of patients that will develop intestinalization of columnar mucosa. Therefore, it is necessary to seek molecular markers capable of predicting progression to more severe stages of the disease.

Objectives: Determine the proliferative activity of columnar mucosa in patients with gastroesophageal reflux subjected to digestive endoscopy and biopsy between 2003 and 2006.

Methods: The Ki-67 antigen was assessed by immunohistochemical technique with use of monoclonal antibody Ki-67 (MIB-1) in the 1:400 dilution. Proliferative activity was determined by the Ki-67 index in every proliferative compartment of the intestinal crypt. The 62 patients who had columnar mucosa in the distal esophagus were divided into two groups: G1: 30 patients with columnar epithelium without intestinal metaplasia and G2: 32 patients with columnar epithelium with intestinal metaplasia.

Results: In G1, proliferative activity of the Ki-67 was limited to the lower layer of the gland in 83% of the patients, 3% showed positive reactivity up to the middle layer and 13% showed immunoreactivity up to the epithelial surface of the esophageal crypt. In G2, proliferative activity of the Ki-67 was limited to the lower layer of the gland in 46.9% of the patients, 21.9% showed positive reactivity up to the middle layer and 31.2% showed immunoreactivity up to the epithelial surface. A significant increase in the prevalence of proliferative activity in the compartments above the lower layer of the gland in patients with metaplastic columnar mucosa was found ($p < 0.001$).

Conclusion: The expansion of cell proliferation was significantly associated to the process of intestinalization of the columnar mucosa in the distal esophagus. Therefore, the presence of proliferative activity above the lower layer of the intestinal crypt in patients with columnar mucosa may assist in the identification of patients more prone to malignant transformation of the gastric mucosa or intestinalization and, consequently, at a greater risk of disease progression (metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence).

Keywords: Ki-67 (MIB-1). Barrett's esophagus. Columnar mucosa. Intestinal metaplasia.

INTRODUCTION

The current definition of Barrett's esophagus has been adopted since 1988 when the American College of Gastroenterology (ACG) defined Barrett's esophagus as the replacement of stratified squamous epithelium that normally lines the esophagus, with columnar epithelium, of any extent, that may be endoscopically identified and histologically confirmed by the presence of intestinal metaplasia (1). This condition is present in more than 10% of the patients with long standing Gastroesophageal Reflux Disease (GERD). The distal esophagus lined by columnar epithelium without intestinal metaplasia is considered a "columnar-lined esophagus", and up to 20% of the cases may be diagnosed as intestinal metaplasia in subsequent examinations, which characterizes the progressive form of this condition and determines the need of patient follow-up (2).

The relationship between GERD symptoms and the risk of developing adenocarcinoma is caused by the association of gastroesophageal reflux and Barrett's esophagus (3). The epithelium with specialized intestinal metaplasia is prone to malignant transformation in around 64-86% of cases of esophageal adenocarcinomas originated from Barrett's esophagus (4;5). Although the exact mechanism through which reflux causes esophageal cancer remains uncertain, it is believed that inflammation and chronic irritation may be the determinant factors in this carcinogenic process (6;7). Consequently, endoscopic surveillance with subsequent biopsy has become the standard follow-up procedure of this epithelium in distal esophagus. Dysplasia is the most accepted histological marker in the identification of patients at a higher risk of developing adenocarcinoma in the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence, in clinical practice today. However, dysplasia has several limitations as a prognosis marker. One of the most significant limitations is the fact that patients come from heterogeneous groups. Patients with high-grade of dysplasia may have occult adenocarcinoma in up to 40% of the cases (5;8), which turns high-grade

dysplasia into a questionable marker in clinical surveillance of neoplastic progression of Barrett's esophagus (9). The natural evolution of low-grade dysplasia is also uncertain due to factors such as intra and interobserver diagnosis variability, sampling problems and higher regression rates for non-neoplastic epithelium (1). Therefore, the discovery of new biological markers capable of complementing histological findings and predicting the evolution of Barrett's esophagus is of paramount importance.

The Ki-67 antigen is present in all active stages of cell cycle (G1, S, G2 and M) except in G0 stage, due to loss of the labile part of this nuclear antigen (8). The increase of antigen expression occurs as the cell progresses through the cycle, both in normal and malignant epithelial cells (10-12). Cell proliferation can be assessed by the number of active cells in cell cycle (proliferation index) and by its location in the proliferative compartments of the intestinal crypt (13). The cell proliferation index (Ki-67) has been studied as a prognosis factor of various other types of cancer such as colorectal, bladder, breast and non-Hodgkin lymphoma (10;14;15). The proliferative compartment is normally restricted to the lower layer of the intestinal crypt, in the so-called "neck" of the gland. The expansion of cell proliferation into the other proliferative compartments of intestinal crypt, with marked cells from the lower layer up to the epithelial surface, characterizes a malignant potential of the gastrointestinal tract (11).

The present study aimed at assessing cell proliferation Ki-67 (MIB-1) in the mucosa of the distal esophagus in patients with GERD and its expression in the proliferative compartments of the intestinal crypt in columnar epithelium with or without intestinal metaplasia of the esophagus.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Patients aged 30 or over, who were referred to the Digestive Endoscopy Unit

between January 2003 and December 2006, with typical symptoms of gastroesophageal reflux such as pyrosis and/or regurgitation at least once a week, for a minimum five years, were prospectively and consecutively examined. Patients with coagulopathy, esophageal stenosis, esophageal varices, hepatopathy, digestive haemorrhage at least over the last 30 days, esophageal cancer, previous radiotherapy or chemotherapy treatment, hypersensitiveness to iodine, use of acid suppressor therapy over the last 60 days or esophageal or stomach surgery were excluded from the study.

Only those patients with columnar mucosa visible at upper gastrointestinal endoscopy in the selected group of patients were included in the study. Patients with columnar mucosa, esophagitis and adenocarcinoma of the esophagus were excluded.

Prior to endoscopic examination of the upper alimentary tract, an informed consent was obtained from every patient. Also, a questionnaire was completed to help define the demographic and clinical characteristics of the patients (annexes 1 and 2).

Upper Gastrointestinal Endoscopy

After endoscopic examination of esophagus, stomach and duodenum, the endoscope was placed near Z line and chromoscopy was performed with a 3% Lugol solution, with the purpose of providing a better definition of the gastroesophageal junction and highlighting the area of columnar-lined esophagus in distal esophagus.

Z line was defined by the squamous-columnar junction, while the gastroesophageal junction was defined by the proximal margin of the gastric folds.

The detachment of the diaphragm corresponded to the endoscopic impression of the diaphragm muscle. The length of the columnar mucosa of the

esophagus was determined by the distance of the proximal and distal margins of the mucosa in relation to the upper dental arch and to the end of gastric folds in the esophagus, respectively. The absence of intestinal metaplasia shown by the biopsy in suggestive area of Barrett's esophagus defined the diagnosis of columnar mucosa in the distal esophagus. Barrett's esophagus was defined by the presence of intestinal metaplasia in the biopsy performed in the visible columnar mucosal area, regardless the extent of such mucosa in the distal esophagus. The definition of short segment Barrett's esophagus was used when the mucosa extended less than 3 cm and long segment Barrett's esophagus was defined when this mucosa corresponded to 3 cm or more of metaplastic columnar epithelium.

Biopsy

The visible columnar mucosa in the distal esophagus was biopsied according to the Seattle protocol, with 4 quadrant biopsies every 1-2 cm. Biopsy of the gastroesophageal junction and, subsequently, in the proximal direction, of the entire columnar-lined esophagus was performed with the use of a biopsy forceps with central stylet (7 mm opening). All tissue samples were fixed in 10% formalin and later embedded in paraffin. Examination of all samples after staining in Hematoxylin-Eosin (H&E) and Alcian blue in pH 2.5 was independently performed by two pathologists of the Department of Pathology of Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Specialized intestinal metaplasia was diagnosed by the presence of columnar epithelium with caliciform cells with positive reactivity to Alcian blue.

Immunohistochemical analysis

The immunohistochemical technique was conducted in the

Immunohistochemistry Laboratory of the Department of Pathology of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Two 3-micrometer sections were cut for every paraffin block and mounted in poly-L-lysine coated glass microscope slides. Sections were then deparaffinized by immersion in xylol for 30 minutes and hydrated in alcohol, at different concentrations (70 a 100%), at room temperature (ATA).

After hydration in alcohol, sections were washed again under running water for three minutes and immersed in distilled water for one more minute. Endogenous peroxidase activity was blocked by immersion of the slides in hydrogen peroxide at 3% for 10 minutes. After antigen recovery in a microwave oven (3 cycles at maximum power output (800 W), for 8 minutes and 20 seconds), blockage of endogenous peroxidase and non-specific reactions was performed.

The primary antibody Ki-67 (DAKO, code MU2970397 mouse anti Ki-67; clones MIB-1), that recognizes the nuclear antigen Ki-67, was incubated for 15 hours, at 4°C, in the 1:400 dilution. Slides were kept in the refrigerator for 15 to 18 hours (10°C), washed and bathed in PBS, and treated with SLAB (Avidin-Biotin). They were washed again and treated with diaminobenzidine (DAB), which produces a dark brown color reaction. Finally, slides were stained with Hematoxylin-Haans, immersed in ammonia at 2% and alcohol, and mounted.

Material from cecal appendix was used as positive control, whereas the negative control was determined by the omission of the primary antibody. When the color of the cell nucleus was a dark brown color, similar to the positive control, in both markers, the cell was considered reactive.

The distribution of stained (positive) nucleuses was assessed by optical microscope in the proliferative compartments of the columnar mucosa (lower layer, middle layer and epithelial surface of the intestinal crypt) in the esophagus, as

previously described by Wada et al (16).

Immunohistochemical reading of the slides was independently performed by the same pathologists who performed the reading of conventional histopathology. They had no previous knowledge of related clinical and endoscopically information. In case of disagreement, the final result was obtained by consensus between both pathologists.

Statistical analysis

The Statistical Package for Social Science (SSPS) 12.0 version was used for data processing and storage. The Ki-67 data was shown in averages and standard deviations and compared between categories through variance analysis (ANOVA). The identification of differences, whenever present, was made by the Tukey test. For analysis of cell proliferation expansion into the proliferative compartments, the chi-square test of linear trend was used. It was considered to be significant when $p < 0.05$.

Ethical considerations

The project of the present study was previously evaluated and approved by the Group of Research and Post graduation (GPPG) of the HCPA, according to all recommended ethical norms. Patients were subjected to upper endoscopy and placed under the care of the Inpatient Gastroenterology Unit of the HUSM. All patients gave their free and informed consent with privacy of the collected data being ensured. The study was conducted in compliance with the norms established under the resolution 196/96 of the Brazilian Medical Council and approved by the UFSM Research Ethics Committee and the GPPG/HCPA.

RESULTS

Sixty two patients (26.3%) who were diagnosed with columnar-lined esophagus in the distal esophagus out of two hundred and thirty-five (235) patients with symptoms of long standing gastroesophageal reflux (>5 years) evaluated, were selected. After anatomopathological study of tissue samples, the 62 patients were divided into two groups: 30 (48.4%) patients with columnar mucosa without intestinal metaplasia and 32 (51.6%) patients with columnar mucosa with intestinal metaplasia.

Considering the distribution of immunoreactivity (Ki-67) in the proliferative compartments in patients with columnar epithelium without intestinal metaplasia, we have found proliferative activity restricted to the lower layer of the gland in 25 cases (83%), 1 case with positive cells up to the middle layer (3%) and 4 cases (13%) with immunoreactivity up to the epithelial surface of the esophageal crypt. As for the patients with columnar mucosa with intestinal metaplasia, there were 15 cases (46.9%) with proliferative activity restricted to the lower layer of the gland, 7 cases (21.9%) with positive nucleuses up to the middle layer and 10 cases (31.2%) with immunoreactivity up to the epithelial surface (Figure 1).

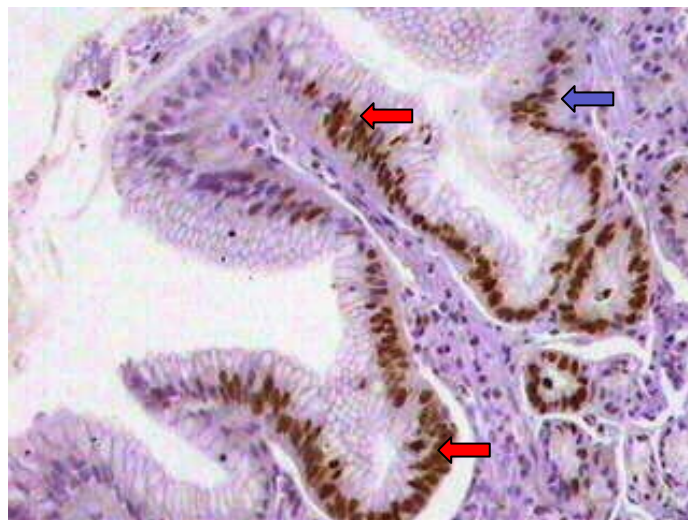


Figure 1. Ki-67 (MIB-1) proliferative activity in the proliferative compartments of the columnar mucosa with intestinal metaplasia (lower layer and middle layer of the gland – red arrows; epithelial surface – blue arrow).

The proliferation index evaluated by Ki-67 (MIB-1) in the proliferative compartments of the intestinal crypt (lower layer, middle layer and epithelial surface), in the patients with epithelium colunar without intestinal metaplasia belonged to 37 ± 26.3 , 16 ± 14 , 6 ± 3 and in the patients with epithelium colunar with intestinal metaplasia belonged to 52 ± 24.6 , 12 ± 8 , 4 ± 3 , respectively (Table 1).

Table 1. Prevalence of activity and Ki-67 proliferation index in proliferative compartments.

	Columnar mucosa without IM (%)	Average \pm DP (%)	Columnar mucosa with IM (%)	Average \pm DP(%)
Lower layer	25 (83.3)	37 ± 26.3	15 (46.9)	52 ± 24.6
Middle layer	1 (3.3)	16 ± 14	7 (21.9)	12 ± 8
Epithelial surface	4 (13.3)	6 ± 3	10 (31.2)	4 ± 3
Total	30 (100)		32 (100)	

The prevalence of positive cases (Ki-67) in patients with columnar epithelium without intestinal metaplasia above the normal proliferative compartment was 16.6%, whereas in patients with columnar epithelium with intestinal metaplasia, the prevalence of positive cases above the normal proliferative compartment of the intestinal crypt (middle layer and epithelial surface) was 53.1% (Figure 2).

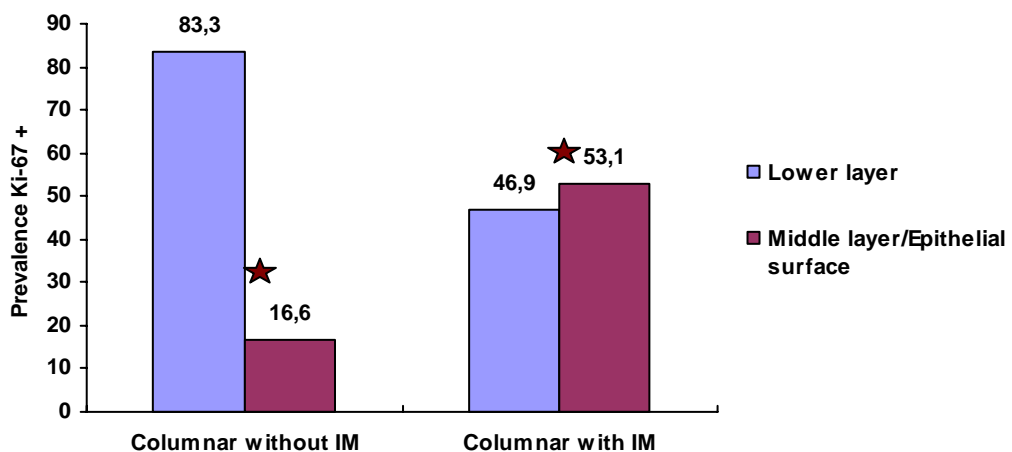


Figure 2. Stratification of immunoreactivity (Ki-67) of patients with columnar mucosa between the middle layer/epithelial surfaces of the gland ($p < 0.001$).

DISCUSSION

A great variety of oncogenes, tumor suppressor genes and proteins related to cell cycle control are known to play an important role on the development of adenocarcinoma of the esophagus (4;17;18). Over the last 15 years there was a significant increase in the number of studies on cell proliferation and its role in esophageal carcinogenesis (11;12;19). Immunohistochemical determination of the proliferation index and its location in the proliferative compartments of the intestinal crypt have been related to the progression in the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence (8;14;20).

Method

Several studies have used the nuclear antigen Ki-67 and the cell proliferation antigen (PCNA) as cell proliferation markers (8;10;19;21). Both can be assessed by immunohistochemical techniques. The Ki-67 reflects the proliferative activity in all active stages of the cell cycle, especially in the mitose phase, whereas the PCNA demonstrates cell proliferation only in the G1/S transition stage (11). Quantitative assessment of cell proliferation of Ki-67 has been performed by means of expensive and sophisticated techniques that use digitalized images, as well as by flow cytometry, which is not accessible to most histopathological diagnosis centers (11;22;23). Another limitation of flow cytometry analysis is the need of fresh tissue samples and its complexity (23,24).

Pathologists usually perform semi-quantitative analysis of cell proliferation by Ki-67 in optical microscope due to its great feasibility and accuracy. For such analysis, the Ki-67 index has been used, which considers the percent of marked cells/total number of cells assessed, in a given representative section of tissue

sample (11).

The qualitative study of proliferative activity is based on the type of tissue and the topographic location of marked cells in the proliferative compartments of epithelia (11). Gerdes et al (10) described the use of the Ki-67 (MIB-1) antigen in the evaluation of proliferative activity in the compartments of the intestinal crypt, in patients with columnar mucosa in distal esophagus. The use of the monoclonal Ki-67 clone MIB-1 antibody made possible to detect this antigen in microwave-processed formalin fixed paraffin section (10;25).

Feith et al (14) analysed the Ki-67 (MIB-1) expression in the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence by cuts of different histological sites in 24 pieces of adenocarcinomas of the distal esophagus and detected not only the elevation of the proliferation index ($34.9 \pm 11.1\%$) but also the presence of positive cells in the middle layer and epithelial surface in areas with columnar metaplasia without dysplasia. We also showed that the use of the immunohistochemical method in the evaluation of Ki-67 (MIB-1) allowed the topographic classification of immunoreactivity in the columnar epithelium of the distal esophagus, even in samples obtained by endoscopic biopsy, particularly in cases where intestinal metaplasia was present.

It is worth stressing the potential limitation of the so-called sampling error in the diagnosis of intestinal metaplasia and in the presence of dysplastic lesions, which may occur in patients with columnar mucosa of the distal esophagus where no intestinal metaplasia or dysplasia was detected by the biopsy. Such aspect is discussed in many studies that report metaplasia regression after adequate gastroesophageal reflux treatment (28). In order to minimize this bias, all biopsies in our patients were performed by the same endoscopist and according to the Seattle protocol, in order to ensure that biopsy sites and standard are uniform.

Results

Cell proliferation plays a significant role in the development of different types of cancer (15). One of the reasons to explain its impact on the progression of the squamous epithelium-metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence is the increase of the proliferation index and its expansion into the proliferative compartments of esophageal epithelium (11;12). Feith et al (14) reported that (Ki-67) proliferative activity in the columnar epithelium with intestinal metaplasia without dysplasia and in squamous epithelium was restricted to the normal proliferative compartment of each epithelium ("neck" of the gland and basal layer, respectively), which represents the area where cell proliferation normally occurs. The authors concluded that cell proliferation expansion into the proliferative compartments represents an initial stage in the progression of Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. Kim et al (26) also found that the increase of cell proliferation expansion into proliferative compartments, with immunoreactivity in the epithelial surface of the intestinal crypt, indicates disordered cell growth.

Hong et al (11) studied the (Ki-67) immunohistochemical expression by means of digitalized images in 43 patients with Barrett's esophagus. They showed that the Ki-67 proliferation index (33.5%) and its expansion into proliferative compartments correlated to the neoplastic progression in the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. The authors noticed that immunoreactivity was restricted to the gland zone and the lower layer of the intestinal crypt in samples of Barrett's esophagus without dysplasia. No immunoreactivity was detected in the epithelial surface. The cases of low and high-grade dysplasia showed, proportionally, a higher Ki-67 proliferation index and expansion into the proliferative compartments with immunoreactivity in the epithelial surface of the intestinal crypt. According to the

authors, the identification of Ki-67 immunoreactivity besides the normal proliferation zone of the intestinal crypt provides evidence of cell proliferation increase and also represents a potential for malignant degeneration of intestinal metaplasia in Barrett's esophagus (11;12;14;27).

The present study showed the presence of immunoreactivity assessed by the Ki-67 (MIB-1) antigen in the lower layer, middle layer and epithelial surface or the intestinal crypt, in patients with columnar mucosa without intestinal metaplasia and in patients with columnar mucosa with intestinal metaplasia. This finding indicates that cell proliferation occurs even in stages that precede intestinalization of the columnar mucosa. It is possible that those patients who showed cell proliferation into the epithelial surface even without metaplasia are more prone to evolution to columnar mucosa with intestinal metaplasia, with a worse diagnosis concerning the progression of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence.

Ishizuka et al (27) analysed the immunohistochemical expression of the Ki-67 antigen in patients with endoscopic diagnosis of columnar mucosa in the distal esophagus. The biopsy showed 26 patients with fundic histological type, 16 junctional (cardiac) patients and 49 patients with specialized columnar epithelium out of the 91 selected patients. The length of positive nucleuses in the middle layer and epithelial surface was higher in patients with columnar epithelium with intestinal metaplasia (51% of the cases). The junctional columnar epithelium group occurred in 25% of the cases with positive nucleuses above the area where cell proliferation normally occurs. Like Hong et al (11), the authors concluded that immunoreactivity in the lower layer and in the epithelial surface of the esophageal crypt led to a significant increase of cell proliferation. They have also stressed that such increase in proliferative activity has a potential for malignant degeneration in cases of Barrett's

esophagus.

Thus, due to the expansion of proliferative activity outside the area where cell proliferation normally occurs, a periodic follow-up of patients with immunoreactivity pattern, even without significant evidence of increase of the (Ki-67) proliferation index in the respective proliferative compartments is recommended. Our findings were similar to the above mentioned and indicate a predominance of 16.6% and 53% of cases with proliferative activity above the lower layer of the gland in patients with columnar epithelium without intestinal metaplasia and columnar epithelium with intestinal metaplasia, respectively. The intestinalization of the columnar mucosa is known to be related to the presence of alkaline reflux. Also, alkaline stimuli are related to the stimulus to in vitro proliferation (21). Therefore, it is possible that these patients with non-metaplastic columnar mucosa but with superficial increase of cell proliferation may require a closer follow-up, since their clinical behaviour may be similar to those patients with Barrett's esophagus. This subgroup of patients, as well as all the other patients of our study, shall have a long-term follow-up and their evolution may throw more light into some of these issues.

Jankowski et al (19) studied the immunohistochemical expression of growth regulating proteins in endoscopic biopsies in 30 patients with diagnosis of columnar mucosa and different histological presentations of Barrett's esophagus (fundic or cardiac-10 type, intestinal-10 and adenocarcinoma in Barrett's Esophagus-10 type). They noticed a significant increase of the Ki-67 proliferation index and of the growth factor-alpha and epidermal growth factor in patients with columnar epithelium with intestinal metaplasia and adenocarcinoma compared to the other types of columnar epithelium in the distal esophagus.

Iftikar et al (13) studied the immunohistochemical expression of the Ki-67 in

Barrett's esophagus with and without association of adenocarcinoma. The authors found no significant difference concerning the index of cell proliferation between the gastric columnar epithelium (control) and the columnar epithelium in the distal esophagus, which suggests a similar biological behavior in the two types of epithelium.

We found that the distribution of immunoreactivity, as assessed by the Ki-67 antigen, was not restricted to the normal proliferative compartment in patients with columnar mucosa in the distal esophagus. Unlike the other studies, we noticed the presence of proliferative activity expansion from the lower layer of the gland into the epithelial surface, in the two study groups. Also, we found a significant difference in the expansion index between patients with columnar mucosa with and without intestinal metaplasia ($p < 0.001$).

The results of the present study showed association between cell proliferation into the proliferative compartments of the intestinal crypt (lower layer, middle layer and epithelial surface) and the process of intestinalization of the columnar mucosa in the distal esophagus in patients with long-standing symptoms of gastroesophageal reflux. Further studies including the use of the Ki-67 and other molecular markers may also seek to confirm the importance of such markers in predicting the evolution of histological alterations in the columnar mucosa in the distal esophagus.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Sampliner RE. Practice guidelines on the diagnosis, surveillance, and therapy of Barrett's esophagus. The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(7):1028-1032.
2. Moraes-Filho JPP, Ceconello I, Gama-Rodrigues J, Castro LP, Henry MA, Meneghelli UG, Quigley E, Brazilian Consensus Group. Brazilian consensus on gastroesophageal reflux disease: proposals for assessment, classification, and management. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:241-248.

3. Weston AP, Krmpotich PT, Cherian R, Dixon A, Topalovski M. Prospective long term endoscopic and histologic follow-up of short segment Barrett's esophagus: Comparison with traditional long segment Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 1997; 93: 407-13.
4. Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's Adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001; 233(3):322-37.
5. Younes M, Ertan A, Lechago LV, Somoano JR, Lechago J. p53 protein accumulation is a specific marker of malignant potential in Barrett's metaplasia. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 697-701
6. Vaezi MF, Richter JE. Role of acid and duodenogastroesophageal reflux in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterol* 1996; 111(5):1192-1199.
7. Wetscher GJ, Schwelberg H, unger A, et al. Reflux-induced apoptosis of the esophageal mucosa is inhibited in Barrett's esophagus. *Am Surg* 1998; 176: 569-573.
8. Gerdes J, Lemke H, Braisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle of a proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984, 133: 1710-15.
9. Zaninotto G, Parenti AR, Ruol A, et al. Oesophageal resection for high grade dysplasia in Barrett's oesophagus. *Br J Surg* 2000; 87: 1102-5.
10. Gerdes J, Becker MH, Key G, Cattoretti G. Immunohistological detection of tumor growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol* 1992; 168(1): 85-6.
11. Hong MK, Laskin WB, Herman BE, et al. Expansion of the Ki-67 proliferative compartment correlates with degree of dysplasia in Barrett's esophagus. *Cancer* 1995; 75: 423-429.
12. Polkowski W, van Lanschot JJ, ten Kate FJ, et al. The value of p53 and Ki-67 as markers for tumor progression in the Barrett's dysplasia-carcinoma sequence. *Surg Oncol* 1995; 4: 163-171.

13. Iftikhar SY, Steele RJ, Watson S, James PD, Dilks K, Hardcastle JD. Assessment of proliferation of squamous, Barrett's and gastric mucosa in patients with columnar lined Barrett's oesophagus. *Gut* 1992; 33(6):733-737.
14. Feith M, Stein HJ, Mueller J, Siewert JR. Malignant degeneration of Barrett's esophagus: the role of the Ki-67 proliferation fraction, expression of E-cadherin and p53. *Dis Esophagus* 2004; 17(4):322-327.
15. Porschen R, Kriegel A, Langen C, Classen S, Hilse M, Lohe B et al. Assessment of proliferative activity in carcinomas of the human alimentary tract by Ki-67 immunostaining. *Int J Cancer* 1991; 47(5):686-691.
16. Wada R, Yamaguchi T, Tanizaki T. Pathological and molecular –biological studies on sequence from reflux esophagitis to development of Barrett's adenocarcinoma. *Dig Endosc* 2005, 17: 64-68.
17. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340(11):825-831.
18. O'Riordan JM, Abdel-latif MM, Ravi N, MacNamara D, Byrne PJ, McDonald GS, Keeling PW, Kelleher D, Reynoulds JV. Proinflammatory cytokine and nuclear factor kappa-B expression along the inflammation-metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(6): 1257-64.
19. Jankowski J, McMenemin R, Hopwood D, Penston J, Wormsley KG. Anormal expression of growth regulatory factors in Barrett's oesophagus. *Clin Sci* 1991; 81: 663-668.
20. Hameeteman W, Tytgat GN, Houthoff HJ, van den Tweel JG. Barrett's esophagus: development of dysplasia and adenocarcinoma. *Gastroenterol* 1989; 96(1):1249-1256.
21. Fitzgerald RC, Omary MB, Triadafilopoulos G. Dynamic effects of acid on Barrett's esophagus. An ex vivo proliferation and differentiation model. *J Clin Invest* 1996; 98(9):2120-2128.
22. Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS. Barrett's esophagus: cell cycle abnormalities in advancing stages of neoplastic progression. *Gastroenterol* 1993; 105(1):119-129.

23. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. Barrett's esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterol* 1987; 93(1):1-11.
24. Reid MM. Flow cytometry and Kleihauer tests. *J Clin Pathol* 1996; 49(4):354.
25. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferation cells in microwave-processed formal in fixed paraffin section. *J Pathol* 1992; 168: 357-63.
26. Kim R, Clarke MR, Melhem MF, Young MA, Vanbibber MM, Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro U, Reynolds JC. Expression of p53, PCNA, and C-erbB-2 in Barrett's metaplasia and adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 1997 42: 2453-62.
27. Ishizuka I, Andoh A, Koyma S, Moritani A, Kushima R, Hattori T, Fujiyama Y. Immunohistochemical analysis of short-segment Barrett's esophagus. *J Gastroenterol and Hepatol* 2004; 19: 1410-1416.
28. Gurski RR, Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR, Bremner CG, Chandrasoma PT et al. Barrett's esophagus can and does regress after antireflux surgery: a study of prevalence and predictive features. *J Am Coll Surg* 2003; 196(5):706-712.

CONCLUSÕES

Artigo I

1. A prevalência da expressão da proteína p53 e do antígeno Ki-67 (MIB-1) em pacientes com DRGE e com mucosa normal, esofagite crônica, epitélio colunar sem metaplasia intestinal, epitélio colunar com metaplasia intestinal e adenocarcinoma foram de 7%, 37,5%, 30%, 62,5% e 71,4% para a proteína p53 e de $21,3 \pm 19,5\%$, $38,8 \pm 24,9\%$, $37,7 \pm 26,3\%$, $52,8 \pm 24,6\%$ e $57,1 \pm 25,1\%$ para o Ki-67, respectivamente.
2. Houve correlação linear positiva ($r=0,4$) entre o aumento da imunorreatividade da proteína p53 ($p<0,001$) e do índice de proliferação celular Ki-67 (MIB-1) ($p<0,05$) com a piora histológica evolutiva na seqüência epitélio normal – esofagite crônica – epitélio colunar sem metaplasia intestinal – epitélio colunar com metaplasia intestinal e adenocarcinoma do esôfago. Esses achados demonstraram que as alterações proliferativas ocorrem simultaneamente às mudanças moleculares, podendo ambas estar relacionadas ao processo de intestinalização do epitélio colunar do esôfago distal.

Artigo II

1. A prevalência da expressão da proteína p53 e do antígeno Ki-67 (MIB-1) na mucosa esofágica de pacientes com mucosa normal, esofagite leve, esofagite moderada e esofagite acentuada foi de 7%, 21,4%, 52,2% e 60% para a proteína p53 e de $21,3 \pm 19,5\%$, $30,8 \pm 23,4\%$, $47,1 \pm 23,2\%$ e $48,3 \pm 25,7\%$ para o Ki-67, respectivamente.

2. Houve correlação linear positiva ($r=0,4$) entre o aumento da imunorreatividade da proteína p53 ($p<0,001$) e do índice de proliferação celular Ki-67 (MIB-1) ($p<0,001$) com a piora do grau de esofagite. Além disso, houve significativa alteração destes marcadores já na fase de esofagite moderada demonstrando que alterações proliferativas e moleculares iniciam-se já na fase anterior as fases pré-neoplásicas.

Artigo III

1. A prevalência da imunorreatividade nos compartimentos proliferativos da cripta intestinal (terço inferior, médio e superfície epitelial) nos pacientes com epitélio colunar sem metaplasia intestinal foi de 83,3%, 3,3% e 13,3 % respectivamente, e nos pacientes com epitélio colunar com metaplasia intestinal foi de 46,9%, 21,9%, 31,2%, respectivamente.
2. Houve um aumento significativo na prevalência de atividade nos compartimentos proliferativos acima do terço inferior da cripta intestinal em pacientes com epitélio colunar com metaplasia intestinal ($p<0,001$), demonstrando uma associação positiva entre a presença da metaplasia intestinal e expansão da atividade proliferativa nos compartimentos superficiais.

ANEXOS

ANEXO 1 – CONSENTIMENTO INFORMADO

Justificativa e Objetivo da Pesquisa

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é uma das condições mais freqüentes na prática médica e como consequência desse refluxo gastroesofágico podem surgir alterações teciduais identificáveis macro e microscopicamente através da endoscopia e da biópsia da mucosa esofágica. O Rio Grande do Sul é uma das regiões do mundo aonde mais se encontra o Câncer de Esôfago e este projeto de pesquisa pretende desenvolver um estudo para definir grupos de risco para esta doença.

Procedimento Utilizado

O método utilizado será a endoscopia digestiva alta. Este procedimento é amplamente utilizado em nosso meio, sendo um método seguro e efetivo de examinar o interior do esôfago, estômago e duodeno através de um tubo longo flexível. É utilizado para diagnosticar doenças do esôfago, estômago e duodeno, realizar biópsias, remover pólipos, passar sondas e permitir parar sangramentos através de substâncias esclerosantes de vasos.

Queremos examinar o seu esôfago através de uma sonda endoscópica. Antes do exame você receberá um comprimido, que será colocado sob sua língua, que lhe deixará levemente sonolento e lhe permitirá tolerar melhor o exame. A sonda será introduzida pela boca, após o borrifamento da sua garganta com um spray anestésico. A maioria das pessoas tolera muito bem este exame, que dura aproximadamente de 10 a 15 minutos.

Riscos ou Desconfortos Potenciais

Para que o exame seja bem realizado é necessário um período de jejum de 8 a 12 horas. Algumas pessoas podem sentir vontade de vomitar, tossir ou mesmo um mal-estar na garganta durante ou após a introdução da sonda endoscópica. Será coletado material (biópsias) para pesquisa das alterações já mencionadas, sendo que os pacientes toleram muito bem a realização das mesmas com pequeno desconforto, e dependendo do número de amostras a serem obtidas pode determinar um pequeno aumento no tempo do exame. Após o exame você poderá ficar com a garganta irritada por um a dois dias o que não irá interferir na sua alimentação. Existe também um risco, **muito pequeno**, de complicações pelos exames, tais como reações alérgicas, sangramento ou perfuração do esôfago, podendo nesses casos ser necessárias transfusões de sangue e/ou cirurgia.

O resultado do exame estará pronto em, aproximadamente 7 a 10 dias e você será informado e orientado para tratamento se necessário.

Benefícios Esperados

A endoscopia digestiva alta é considerada exame complementar no diagnóstico e tratamento de muitas doenças do esôfago entre elas o câncer de esôfago. Caso encontrarmos alguma alteração em seu esôfago que possa no futuro evoluir para

esta neoplasia, poderemos orientá-lo com relação a melhor conduta possível.

Procedimentos Alternativos

Atualmente não existem exames diagnósticos e terapêuticos alternativos com a mesma acurácia da endoscopia digestiva alta no diagnóstico e tratamento da doença do refluxo gastroesofágico. Outros métodos como exame radiológico contrastado do esôfago e pHmetria de 24 horas não detectam alterações iniciais na mucosa esofágica e não permitem a realização de biópsias para estudo anátomo-patológico quando necessário.

Formas de Acompanhamento e Assistência

Fica aqui esclarecido que o médico responsável pelo atendimento do paciente durante o período de pesquisa, fará seu acompanhamento, prestando-lhe toda assistência necessária, colocando-se à disposição para prestar eventuais informações, devendo ser contatado na eventualidade de dano relacionado à pesquisa.

Eu, _____ fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre cada procedimento, no qual estarei envolvido, dos desconfortos ou dos riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa em face destas informações.

O profissional _____, certificou-me de que as informações fornecidas terão caráter confidencial.

O pesquisador Responsável por este Projeto de Pesquisa é o Professor Marcelo Binato (telefone: 9971-2497), tendo este documento sido revisado e aprovado pelo comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em 30 / 01 / 2003.

Assinatura do Paciente

Assinatura do Pesquisador

Santa Maria, / / 2003

ANEXO 2 – QUESTIONÁRIO**Nº:** **Nome:****Data:** ____ / ____ / ____

Sexo: Idade:

Endereço:

Bairro:

SAME:

Telefone:

Cidade:

SINTOMAS:

Pirose () Regurgitação () N/V () Rouquidão ()

Disfagia () Dor torácica não Asma () Tosse Crônica () Outras:
cardíaca ()**FREQÜÊNCIA DOS SINTOMAS:**

() Diária () até 2x/sem () 1 x/sem () Mensal

() Não () Sintomas Noturnos
mencionado**HÁBITOS DE VIDA:**

Fumo

Tempo:

Cigarros/dia:

Álcool

Tempo:

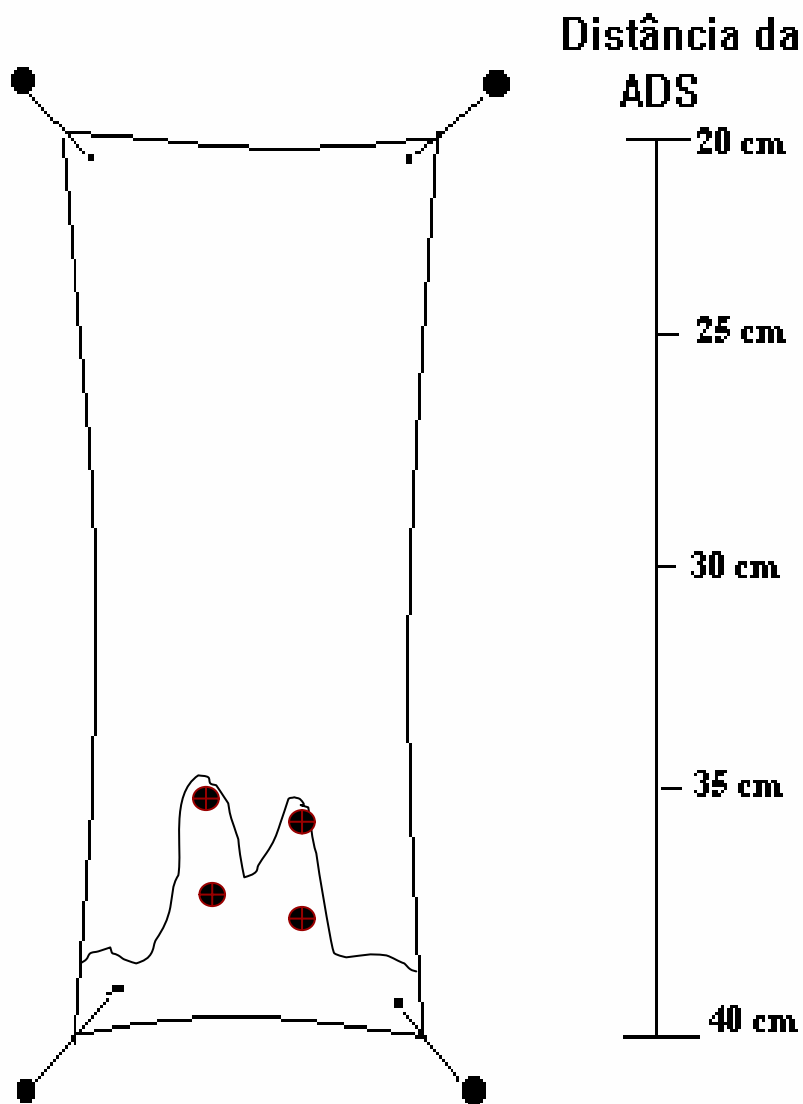
Frequência:

Quantidade:

Medicamentos:

ASPECTO ENDOSCÓPICO:

	ENDOSCOPIA	LUGOL	cm da Linha Z
Mucosa normal			
Irregularidade Linha Z			
Ilhotas			
Projeções digitiformes			
Circunferencial			
Erosões / Ulcerações			
Outro (descrever)			
Classificação LA	A () ()B	()C ()D	
Linha Z: cm	JEG: cm	Pinçamento Diafragmático	cm

ANEXO 3 – MAPA ESQUEMÁTICO DO ESÔFAGO

Representação esquemática de digitação de mucosa colunar no esôfago distal após endoscopia digestiva alta em paciente com sintomas de refluxo gastroesofágico de longa duração.

⊕ Local das biópsias em mucosa colunar