

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EXPRESSÃO DAS CITOQUERATINAS 7 E 20 NAS CÉLULAS
CALICIFORMES E CÉLULAS COLUNARES AZUIS EM PACIENTES COM
SUSPEITA ENDOSCÓPICA DE ESÔFAGO DE BARRETT**

ALUNO: JOÃO CARLOS CANTARELLI JUNIOR

ORIENTADOR: PROF. DR. CLEBER DARIO PINTO KRUEL

**CO-ORIENTADORES: PROF. Dr. RENATO BORGES FAGUNDES
PROFa. Dra. LUISE MEURER**

2006

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

**EXPRESSÃO DAS CITOQUERATINAS 7 E 20 NAS CÉLULAS
CALICIFORMES E CÉLULAS COLUNARES AZUIS EM PACIENTES COM
SUSPEITA ENDOSCÓPICA DE ESÔFAGO DE BARRETT**

JOÃO CARLOS CANTARELLI JUNIOR

Dissertação de Mestrado apresentada
à Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul para Concorrer ao Título de
Mestre pelo Curso de Pós-Graduação
em Medicina – Área de Concentração
em Gastroenterologia.

Orientador:
Prof. Dr. CLEBER DARIO PINTO
KRUEL
Co-orientador:
Prof. Dr. RENATO BORGES
FAGUNDES

**PORTO ALEGRE
2006**

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| FICHA CATALOGRÁFICA | 2 |
| DEDICATÓRIA | 3 |
| AGRADECIMENTOS | 4 |
| RESUMO | 5 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 7 |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 8 |
| 1. DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO E ESÔFAGO DE BARRETT | 8 |
| 2. CITOQUERATINAS | 12 |
| JUSTIFICATIVA | 17 |
| OBJETIVOS | 18 |
| MÉTODOS | 19 |
| 1. MATERIAIS | 19 |
| 2. PROCEDIMENTOS DE COLETA DE DADOS | 20 |
| 3. DEFINIÇÕES | 21 |
| 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 22 |
| 5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS | 23 |
| RESULTADOS | 24 |
| DISCUSSÃO | 38 |
| CONCLUSÃO | 47 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS | 48 |
| REFERÊNCIAS | 49 |
| ARTIGO CIENTÍFICO (VERSÃO PORTUGUÊS) | 57 |
| ARTIGO CIENTÍFICO (VERSÃO INGLÊS) | 77 |
| PRODUÇÃO CIENTÍFICA DO AUTOR | 97 |
| ANEXO (DADOS ENDOSCÓPICOS E HISTOLÓGICOS) | 98 |

C229i Cantarelli Junior, João Carlos

Imunoreatividade das citoqueratinas 7 e 20 nas células caliciformes e células colunares azuis em pacientes com suspeita endoscópica de Esôfago de Barrett / João Carlos Cantarelli Junior ; orient. Cleber Dario Pinto Kruel ; co-orient. Renato Borges Fagundes, Luise Meurer. – 2006.

103 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências em Gastroenterologia. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Esôfago de Barrett 2. Queratina 3. Células caliciformes I. Kruel, Cleber Dario Pinto II. Fagundes, Renato Borges III. Meurer, Luise IV. Título.

NLM: WI 250

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

À minha querida esposa Deise, pelo apoio, paciência e dedicação dispensados no período de desenvolvimento do meu mestrado.

AGRADECIMENTOS

Quero aqui expressar a minha gratidão às pessoas que, de uma forma ou outra, desempenharam um papel fundamental durante a elaboração desta dissertação de mestrado:

Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Kruel (Orientador);

Prof. Dr. Renato Borges Fagundes (Co-orientador);

Prof. Dra. Luise Meurer (Co-orientadora);

Dra. Marta Pires da Rocha (Médica patologista);

Srta. Daniela Benzano (Estatística - GPPG);

Srta. Flávia Rejane Giusti Grossmann (Laboratório de Patologia Clínica);

André Nicola (Aluno de graduação – Medicina);

RESUMO

Introdução: O esôfago de Barrett é uma condição associada ao refluxo gastroesofágico e que predispõe ao surgimento de displasia e adenocarcinoma. Durante a endoscopia digestiva alta, a suspeita do esôfago de Barrett ocorre quando projeções de epitélio colunar são visualizados acima da junção esofagogástrica, e o diagnóstico somente é confirmado quando biópsias neste epitélio demonstram a presença de metaplasia intestinal. A metaplasia intestinal é definida pela observação de células caliciformes (*goblet cells*) à coloração de hematoxilina/eosina e com positividade para alcian blue ph 2,5. Entretanto, um tipo muito freqüente de células, as chamadas células colunares azuis (*columnar blue cells*), podem ser observadas durante o exame histológico. Estas células têm a aparência de células colunares gástricas à hematoxilina/eosina, mas ao contrário destas, coram-se positivamente com alcian blue. Alguns autores consideram que estas células podem representar um estágio transicional entre célula colunar e célula caliciforme. Porém, quando estão presentes, e na ausência de células caliciformes, não são consideradas para a definição do diagnóstico de esôfago de Barrett. Estudos recentes têm sugerido que certos padrões de expressão das citoqueratinas 7 e 20 podem ser usados como fator diferencial entre metaplasia intestinal do esôfago e da cárdia. Porém, a expressão destas citoqueratinas nas células colunares azuis ainda não foi caracterizada. O objetivo deste estudo foi investigar a expressão imunohistoquímica das citoqueratinas 7 e 20 nas células caliciformes e nas células colunares azuis em pacientes com suspeita endoscópica de Esôfago de Barrett.

Métodos: Após pesquisa nos arquivos de laudos endoscópicos e histopatológicos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, oitenta e seis casos, constituídos de biópsias oriundas de pacientes com suspeita de Esôfago de Barrett na endoscopia digestiva alta, foram incluídos no estudo. As lâminas coradas pela hematoxilina/eosina e alcian blue foram revisadas para identificação de células caliciformes e células colunares azuis, e posteriormente submetidos à técnica de imunohistoquímica para CK7 e CK20.

Resultados: Células calciformes estiveram presentes em 76 casos e células colunares azuis em 50 casos. O resultado da reatividade de cada citoqueratina demonstrou que a CK7 apresentou expressão em 77,3% dos casos com células calciformes e em 86% daqueles com células colunares azuis ($p=0,25$), enquanto que a CK20 apresentou expressão nas células calciformes em 89,3% e 62% nas células colunares azuis ($p<0,001$). Na análise da expressão conjunta destas citoqueratinas, o padrão CK7(+)/CK20(+) foi o mais freqüente em ambas células ($p=0,19$).

Conclusões: A reatividade imunohistoquímica da CK7 e CK20 nas células colunares azuis e nas células calciformes apresentam algumas características semelhantes, sugerindo que a célula colunar azul pode representar um estágio de transição para célula calciforme, porém são necessários estudos comparativos com outros marcadores relacionados à diferenciação celular do epitélio metaplásico do EB para validar esta hipótese.

LISTA DE ABREVIATURAS

AB = Alcian blue

CK = Citoqueratina

CK7 = Citoqueratina 7

CK20 = Citoqueratina 20

DRGE = Doença do Refluxo Gastro-esofágico.

EB = Esôfago de Barrett

EDA = Endoscopia digestiva alta

HE = Hematoxilina/eosina

JEC = Junção escamocolumnar

JEG = Junção esôfagogástrica

MI = Metaplasia intestinal

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO E ESÔFAGO DE BARRETT

A Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) engloba um amplo espectro de manifestações, as quais podem ser definidas como sintomas ou complicações do refluxo. Em uma extremidade encontramos pacientes com sintomas típicos de DRGE e sem evidência de lesão esofágica, situação também referida como DRGE não-erosiva ou endoscopia-negativa. Na outra extremidade estão os pacientes com esofagite erosiva ou complicações do refluxo (ulceração, estenose, esôfago de Barrett e adenocarcinoma).^{1,2}

Os sintomas da DRGE apresentam uma alta prevalência na população geral. Dados da literatura revelam que estes sintomas acometem mais de 44% da população pelo menos uma vez por mês¹ e cerca de 20% uma vez por semana,¹⁻³ sendo que em estudos populacionais, cerca de 4% - 9% dos adultos apresentam pirose diariamente.³ Em relação a dados brasileiros, um estudo de base populacional realizado por Nader et al,⁴ na cidade de Pelotas-RS, demonstrou prevalência de pirose de 48,2% para o último ano, 32,2% para o último mês e 18,2% para a última semana.

Entre os sintomas de DRGE, a pirose e regurgitação são os mais característicos. Pirose é definida como um desconforto ou sensação de queimação retroesternal que origina-se no epigastrio e pode irradiar-se até a base do pescoço. É o sintoma encontrado com maior frequência e, quando se constitui no achado dominante ou único, apresenta um alto valor preditivo de DRGE. Regurgitação é caracterizada pelo retorno sem esforço de conteúdo esofágico ou gástrico até a faringe não associado às náuseas ou vômitos. Regurgitação de conteúdo esofágico é indicativa de acalasia, enquanto a de conteúdo gástrico é consistente com DRGE. Outros sintomas como dor torácica, disfagia, odinofagia, sensação de "globus", laringite, asma, tosse, rouquidão e soluços são também potenciais sintomas de DRGE, porém pouco específicos.²

Em termos de complicações do refluxo, o esôfago de Barrett (EB) tem recebido especial interesse por ser considerado um fator de risco para adenocarcinoma esofágico, cuja

incidência no mundo ocidental vem aumentando rapidamente nas últimas décadas.⁵⁻⁹ O EB é uma condição adquirida que ocorre como consequência do refluxo gastroesofágico crônico, onde há substituição do epitélio escamoso estratificado, que normalmente recobre a porção distal do esôfago, por epitélio colunar especializado.^{5,6,9,10} Seu desenvolvimento ocorre quando o refluxo gastroesofágico danifica a mucosa e a cura deste dano ocorre através de um processo metaplásico, onde células colunares substituem as células escamosas.⁶ Porém, o mecanismo através do qual a injúria desencadeia metaplasia, e por que isto ocorre em alguns, mas não em todos os indivíduos com refluxo, ainda permanece desconhecido.^{5,10}

Os fatores de maior risco para EB são: sexo masculino, raça branca, sintomas de refluxo de longa duração e início de sintomas em idade precoce. Outros fatores como nível sócio-econômico, tabagismo, alcoolismo, medicações que diminuem a pressão do esfíncter esofágico inferior, obesidade, dieta pobre em fibras e frutas apresentam evidências ainda controversas.^{5,8}

A endoscopia digestiva alta (EDA) ocupa um importante papel no diagnóstico do EB. Este procedimento tem sido indicado para excluir esta condição em pacientes com DRGE, porém o tempo específico para se iniciar esta abordagem ainda não está bem definido.⁷ Por isso, tem sido recomendado que a EDA deva ser limitada a pacientes com fatores de risco para EB, principalmente para aqueles com sintomas de refluxo de longa duração (mais de 5 anos) e idade maior que 50 anos.^{5,6,9}

Durante o exame endoscópico, a suspeita de EB é estabelecida quando a junção escamocolunar (JEC ou linha Z) está deslocada acima da junção esôfago-gástrica (JEG) e tem uma aparência irregular ou assimétrica, com projeções de mucosa de coloração rosa-salmão estendendo-se pelo epitélio escamoso.^{10,11} O EB pode ainda apresentar outras configurações, que incluem a presença de um segmento circunferencial, ilhas isoladas de mucosa colunar próximas à JEC ou uma linha Z irregular.¹¹ Baseado na extensão do epitélio colunar acima da JEG, o EB é tradicionalmente dividido em dois tipos: EB curto (menor que 3cm) e EB longo (maior que 3cm). Por outro lado, uma definição mais recente considera o EB como o reconhecimento de epitélio colunar à endoscopia de qualquer extensão, cuja biópsia confirma a presença de metaplasia intestinal (MI).^{7,9,10} A MI em uma JEG de aparência normal (MI da cárdia) fica excluída deste conceito.^{7,10}

Estudos sobre prevalência do EB apresentam dados conflitantes. Em pacientes com sintomas de refluxo gastroesofágico submetidos à endoscopia, é estimada uma prevalência de 6 - 12%.⁵ Entretanto, se for considerada a sua extensão, a prevalência do EB maior de 3cm tem sido citada por alguns autores variando de 3 - 12%.^{3,5,6,10} Quanto ao EB menor que 3cm, uma prevalência de 6 - 15% têm sido atribuída a este grupo de pacientes.^{5,6} Outros estudos ainda têm atribuído uma prevalência MI em EB curto de 2% até 61,3% em diversas situações clínicas.¹²⁻¹⁶ No Rio Grande do Sul, um estudo de Fagundes et al¹⁷ observou uma prevalência de EB de 0,6% em paciente submetidos a endoscopia digestiva alta por motivos diversos e, quando foram considerados apenas os pacientes com sintomas de refluxo, a prevalência foi de 2,5%.

Havendo a suspeita de EB à endoscopia digestiva alta, biópsias em um intervalo de 1 - 2cm e em 4 quadrantes devem ser realizadas ao longo de toda a extensão do epitélio colunar para a detecção de metaplasia intestinal.^{5,10,11} Histologicamente, o EB representa uma forma incompleta de MI caracterizada pela presença de células caliciformes (*goblet cells*) à coloração com hematoxilina/eosina (HE) e que contém mucinas ácidas, as quais são facilmente detectadas com a utilização de alcian blue pH 2,5 (AB).^{13,18} Uma vez determinado o diagnóstico, os pacientes com EB devem ser arrolados em um programa de vigilância endoscópica para displasia e adenocarcinoma.^{5-7,10}

Apesar destes parâmetros diagnósticos, o exame endoscópico ainda impõe dificuldades para o adequado diagnóstico do EB. Em primeiro lugar, a precisa localização da JEG pode ser difícil de definir quando hérnia hiatal está presente.^{5,7,10,11,19} Em segundo lugar, a presença de eritema e/ou esofagite erosiva pode ser visualmente confundida com EB, e pode ser necessária a reavaliação destes pacientes, após o tratamento da esofagite, para a detecção de MI.^{7,9,11,20} Em uma revisão recente, Armstrong²¹ descreveu as dificuldades no diagnóstico endoscópico do EB, ressaltando principalmente a definição inadequada dos pontos de referência endoscópicos, a falta de padronização quanto à extensão do EB, o registro pouco acurado da localização das biópsias, a não identificação de displasia na presença de esofagite e a comunicação variável entre o endoscopista e o patologista.

Além dos detalhes acima mencionados, o diagnóstico histológico da metaplasia intestinal pode apresentar algumas dificuldades para o patologista. Em primeiro lugar, a

mucosa gástrica do tipo cárdica pode conter células foveolares com uma configuração em forma de barril, mas que não são circundadas por células colunares típicas do EB, e têm positividade menor, ou são negativas, à coloração com AB. Estas células foveolares distendidas têm sido denominadas células pseudocaliciformes (*pseudogoblet cells*) e podem ser causa de diagnóstico superestimado de MI e diagnóstico falso-positivo de EB.²² Em segundo lugar, existem células localizadas no epitélio superficial que são tão comuns quanto as células caliciformes e que apresentam um aspecto semelhante a células colunares gástricas à HE, mas que, ao contrário destas, contêm mucinas ácidas e coram-se positivamente com AB, e são chamadas células colunares azuis.²²⁻²⁴ Alguns autores consideram que estas células podem representar um tipo transicional de células metaplásicas, intermediárias entre células colunares gástricas e células caliciformes.^{22,25} Porém, até o momento, nenhuma correlação significativa foi observada entre a presença de mucinas ácidas (sialomucinas e sulfomucinas) e as características observadas em pacientes com ou sem células caliciformes, incluindo a presença ou ausência de sintomas de refluxo, extensão do epitélio colunar metaplásico, presença de esofagite, cardite ou infecção por *Helicobacter pylori*.²⁶ Devido a estas considerações, fazer o diagnóstico de EB, baseado em células com positividade ao AB e na ausência de células caliciformes, ainda é motivo de controvérsia^{18,26,27}. Um consenso recente sobre diagnóstico histopatológico de EB considera que a detecção das células colunares azuis não é suficiente para definir o diagnóstico de EB.²⁸

Estas controvérsias reforçam a importância de se definir a relação existente entre as células caliciformes e as células colunares azuis. É fundamental identificar se as células colunares azuis representam ou não um estágio “pré-caliciforme”, visto que a presença destas células pode superestimar ou subestimar o diagnóstico do EB, ocasionando inclusão desnecessária ou exclusão de pacientes em programas de vigilância endoscópica. O uso de um marcador que possa resolver estas incertezas seria extremamente importante. A expressão imunohistoquímica das citoqueratinas 7 (CK7) e 20 (CK20) tem sido estudada na MI da JEG, porém sua reatividade nas células colunares azuis ainda não foi caracterizada.

2. CITOQUERATINAS

As células humanas são estruturadas em um complexo citoesqueleto formado por três unidades principais: microfilamentos contendo actina, microtúbulos contendo tubulina e os filamentos intermediários. Estes últimos encontram-se divididos em seis tipos distintos, dentre os quais os tipos I e II constituem as formas mais complexas e são denominadas citoqueratinas.²⁹

As citoqueratinas abrangem um total de 20 diferentes subunidades, com peso molecular variando de 40-70 kDa. Podem ser divididas de acordo com seu peso molecular (baixo ou alto peso) ou pelo ponto de vista isoelétrico (forma ácida ou básica). Citoqueratinas do tipo I (CK9 a CK20) são formas ácidas e de menor peso molecular, enquanto que as do tipo II (CK1 a CK8) são formas básicas e de maior peso molecular. Em geral, a maioria das citoqueratinas apresenta uma co-expressão entre os tipos I e II, ou seja, uma citoqueratina de baixo peso molecular forma par com uma de baixo peso, ou ainda uma forma ácida forma par com uma forma básica.²⁹

A detecção das citoqueratinas é obtida através de técnicas de imunohistoquímica, com a utilização de anticorpos anti-citoqueratina. No início da era da imunohistoquímica, estes anticorpos não reagiam com uma citoqueratina específica, devido ao fato de serem constituídos de uma mistura de anticorpos monoclonais e policlonais. Atualmente, com a evolução da técnica, encontramos disponíveis comercialmente vários anticorpos monoclonais de alta qualidade e que reagem com todos os diferentes tipos de citoqueratinas.²⁹

Nem todas as citoqueratinas são sintetizadas simultaneamente em uma célula. Os diferentes subgrupos são expressos durante o curso final da diferenciação celular, em estágios diferentes de desenvolvimento e em epitélios diferentes. Por isso, todos os epitélios (simples e complexos) podem ser classificados de acordo com a expressão das citoqueratinas. Quando algum destes epitélios sofre transformação maligna, seu perfil de citoqueratina permanece constante. Uma vez que a expressão das citoqueratinas varia enormemente entre os diferentes epitélios, elas têm sido amplamente usadas na identificação de vários carcinomas. Entre os 20 tipos acima referidos, as citoqueratinas 7 e 20 fazem parte de um grupo que possui um alto valor discriminativo entre os diferentes tipos de carcinomas.²⁹

A citoqueratina 7 (CK7) é uma subunidade do tipo II, cuja expressão em tecidos normais abrange aproximadamente todos os epitélios simples, epitélio respiratório pseudoestratificado e epitélio transicional. Sua expressão em neoplasias está restrita a um subgrupo de adenocarcinomas de origem epitelial glandular. A grande maioria dos adenocarcinomas de pulmão, ovário, útero, mama, pâncreas, tumores de glândulas salivares e tireóide, colangiocarcinoma e carcinoma de células transicionais são positivos para CK7.²⁹ Em contraste, somente uma pequena porcentagem dos casos de adenocarcinoma colo-retal e gástrico são CK7 positivos. Dois terços dos casos de mesoteliomas malignos são CK7 positivos. Carcinomas epidermóides da pele, do esôfago e da cabeça e pescoço são usualmente negativos para CK7. Entretanto, carcinomas epidermóides originados de epitélio escamoso do cérvix uterino são freqüentemente positivos para CK7.^{29,30}

A citoqueratina 20 (CK20) é uma subunidade do tipo I, cuja expressão está restrita ao epitélio foveolar gástrico, epitélio das vilosidades e criptas intestinais, células de Merkel orais e cutâneas, corpúsculos gustativos e células do epitélio transicional. É praticamente ausente na pele, mama, epitélio respiratório, glândulas salivares e fígado, nem tem sido identificada em células não-epiteliais.^{29,31} Em neoplasias, sua expressão é confinada a poucos órgãos. Quase todos os casos de carcinoma de cólon, a maioria dos tumores de células de Merkel da pele, cerca de metade dos adenocarcinomas gástricos e pancreáticos são CK 20 positivos.²⁹⁻³¹ Carcinomas de células transicionais apresentam diferentes níveis distintos de expressão da CK20 (68% x 29% em dois estudos).^{29,30}

A análise simultânea das citoqueratinas 7 e 20 também demonstra uma grande utilidade no diagnóstico de diversos tipos de neoplasias. De acordo com a sua expressão, pode ser dividida em 4 padrões:^{29,30}

- a) CK7(+)/CK20(+): a maioria dos casos desta categoria são carcinomas dos tratos gastrointestinal e urinário. Este padrão está presente em grande parte dos casos de carcinomas pancreáticos (62 - 64%), em colangiocarcinomas (43 - 65%), carcinomas de células transicionais (25 - 65%) e carcinomas gástricos (13 - 32%).
- b) CK7(+)/CK20(-): quase todos os casos de adenocarcinomas de mama, pulmão, endométrio e ovário (endometrióide, seroso papilífero e de células claras),

tumores de tireóide (folicular, papilar e medular) e de glândulas salivares apresentam CK7(+)/CK20(-). Mais de 90% dos adenocarcinomas relacionados com o esôfago de Barrett e cerca de 2/3 dos mesoteliomas malignos também demonstram este padrão.

c) CK7(-)/CK20(+): virtualmente todos os casos de carcinoma colo-retal (90-95%), 78% dos casos de tumores de células de Merkel da pele e 35% dos casos de adenocarcinoma gástrico apresentam o padrão CK7 - / CK20 +.

d) CK7(-)/CK20(-): cerca de 90% dos carcinomas do córtex adrenal, 90% dos carcinomas prostáticos, a maioria dos hepatocarcinomas, tumores carcinóides pulmonares, carcinóides do aparelho gastrointestinal e carcinomas de células renais são CK 7(-)/CK20(-).

Devido a este potencial discriminativo, a co-expressão das citoqueratinas 7 e 20 tem sido tema de discussão em referência a dois aspectos. O primeiro relaciona-se à diferenciação dos adenocarcinomas que envolvem a JEG, e o segundo quanto à distinção da metaplasia intestinal nesta mesma região.

Quanto ao primeiro aspecto, os adenocarcinomas da JEG podem apresentar limites anatômicos difíceis de determinar, principalmente se volumosos e de grande extensão, e com isto, o diagnóstico de sua origem pode tornar-se impossível. Como estas neoplasias apresentam características comuns (tipo histológico e relação com MI), a utilização de um marcador histológico que diferencie a origem esofágica ou gástrica destes tumores poderia ser essencial.³²⁻³⁴ Em um trabalho recente, Ormsby et al³² avaliaram a co-expressão das citoqueratinas 7 e 20 em espécimes de ressecção cirúrgica de pacientes com adenocarcinomas relacionados ao EB e com adenocarcinomas gástricos do tipo intestinal. Neste estudo foi demonstrado que o imunofenótipo CK7(+)/CK20(-) estava presente em 90% dos adenocarcinomas esofágicos e em apenas 21% dos adenocarcinomas gástricos. Taniere et al³³ realizaram um estudo semelhante, objetivando determinar a expressão das citoqueratinas 7, 19 e 20 em adenocarcinomas do esôfago distal e estômago proximal. A análise dos resultados demonstrou que o padrão CK7(+)/CK20(-) estava presente em 74,1% dos adenocarcinomas do esôfago distal e em 23,8% dos adenocarcinomas do estômago proximal. Em outro estudo, Shen et al³⁴ avaliaram os padrões de citoqueratinas 7 e 20 em

pacientes chineses com baixo risco para EB e com alto risco para adenocarcinoma gástrico. A pesquisa resultou que apenas 1 de 50 pacientes (2%) com adenocarcinoma gástrico sem envolvimento da cárdia apresentava o padrão CK7+/CK20-. Por outro lado, um estudo de FLUCKE et al³⁵ concluíram que não houve diferenças estatísticas nos padrões de citoqueratinas 7 e 20 em uma série de adenocarcinomas do esôfago distal, da JEG e do estômago proximal.

Em relação ao segundo aspecto, a MI envolvendo a JEG tem apresentado um cenário desafiador. A MI do esôfago distal pode ser indistinguível histologicamente daquela do estômago proximal, mesmo com a utilização de coloração específica para mucinas.^{5,12,18,36} Existem evidências sugerindo diferenças no risco de evolução para displasia entre EB e MI da cárdia, e com isto, a vigilância endoscópica para adenocarcinoma é recomendada somente para EB.^{5,7,12,26,28} Na tentativa de solucionar estas questões, surgiram vários estudos objetivando determinar o valor da CK7 e CK20 na diferenciação destas metaplasias. Inicialmente, Ormsby et al³⁶ definiram padrões de expressão distintos para EB (padrão tipo Barrett) e metaplasia intestinal da cárdia (padrão tipo gástrico). Neste estudo foi avaliada a expressão imunohistoquímica da CK7 e CK20 em biópsias e peças cirúrgicas de pacientes com evidência histológica prévia de esôfago de Barrett longo e metaplasia intestinal gástrica. O padrão designado como tipo Barrett apresentou CK7 com reatividade na superfície epitelial e glândulas superficiais e profundas, enquanto que a expressão da CK20 ficou restrita à superfície epitelial e glândulas superficiais. O padrão tipo gástrico demonstrou reatividade ausente ou irregular para CK7 e expressão da CK20 ocorreu no epitélio superficial e glândulas superficiais e profundas. Na análise dos resultados, o padrão tipo Barrett foi detectado em 94% dos espécimes de ressecção esofágica e em 100% dos espécimes de biópsias esofágicas, demonstrando sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo para o diagnóstico de EB longo de 97%, 100% e 100%, respectivamente. O padrão tipo gástrico foi observado em 100% dos espécimes de ressecção e biópsias gástricas. Outros estudos^{35,38,39,40,46} analisando o padrão CK7/CK20 em esôfago de Barrett e metaplasia intestinal gástrica obtiveram conclusões semelhantes aos achados obtidos por Ormsby et al.³⁶ Adicionalmente, alguns autores avaliaram os padrões de citoqueratinas 7 e 20 em pacientes com EB curto. O padrão mais encontrado foi o do tipo Barrett, e a sua frequência nestes estudos variou de 76,66% até 95%

dos casos.⁴⁰⁻⁴³ Outros pesquisadores também examinaram a expressão destas citoqueratinas na metaplasia intestinal em junção esôfago-gástrica de aspecto normal e concluíram que os padrões tipo Barrett e não-Barrett de CK7/CK20 podem ser úteis na determinação da etiologia da metaplasia intestinal (refluxo gastroesofágico versus *Helicobacter pylori*).⁴⁴⁻⁴⁶

Por outro lado, outros investigadores obtiveram resultados discordantes. El-Zimaity et al⁴⁷ observaram que o padrão tipo Barrett demonstrou uma sensibilidade e especificidade de apenas 45% e 65% (versus 97% e 100% no estudo de Ormsby et al³⁶). Um estudo de Mohammed et al⁴⁸ apresentou dados similares, com sensibilidade e especificidade de 65% e 56%. Glickman et al⁴⁹, por sua vez, relataram que o padrão tipo Barrett esteve presente em 91% dos EB longo, em 94% dos EB curto e 90% das metaplasias em JEG de aspecto normal. DeMeester et al.⁵⁰ observaram que o padrão tipo Barrett foi verificado em 78% dos pacientes com MIC, em 85% naqueles com mucosa do tipo cárdica e em 100% nos com EB. Em outros estudos, os autores concluíram que as citoqueratinas 7 e 20 não seriam ferramentas úteis para fazer a diferenciação entre metaplasia intestinal do esôfago e da cárdia.⁵¹⁻⁵⁴

Entretanto, um achado intrigante foi mencionado em alguns destes estudos. Os autores observaram que áreas de epitélio colunar não-especializado (sem células caliciformes) também apresentaram forte positividade para CK7, ou então demonstraram o padrão tipo Barrett de CK7/CK20 em uma proporção significativa de casos.^{38,40,46,48-50} Este achado sugere que, no epitélio metaplásico, células caliciformes e células colunares podem apresentar reatividades semelhantes para CK7/CK20. Como células colunares também podem apresentar positividade à coloração para AB, é de se presumir que estas possam apresentar reatividades para CK7/CK20 equivalentes ao das células caliciformes. Até o momento, nenhum estudo descreveu a expressão destas citoqueratinas nas células colunares azuis nem comparou esta expressão com a das células caliciformes. Portanto, o objetivo deste estudo é examinar a reatividade imunohistoquímica das citoqueratinas 7 e 20 nas células caliciformes e nas células colunares azuis em pacientes com suspeita endoscópica de EB.

JUSTIFICATIVA

O esôfago de Barrett é considerado uma condição secundária ao refluxo gastroesofágico e com potencial para o desenvolvimento para o adenocarcinoma esofágico. A natureza letal deste câncer e a baixa eficácia dos tratamentos disponíveis em lesões avançadas justificam a vigilância endoscópica dos pacientes de risco, tentando diminuir a morbi-mortalidade por esta patologia através do diagnóstico precoce.

Para o diagnóstico do esôfago de Barrett é necessária a confirmação da suspeita endoscópica pela presença de células calciformes na histologia. Entretanto, dificuldades diagnósticas podem ocorrer quando células colunares azuis são observadas em técnicas histológicas convencionais.

Existe um grande esforço na procura de marcadores que nos permita melhorar a caracterização de grupos de risco, o diagnóstico precoce e o seguimento das lesões precursoras do adenocarcinoma esofágico. Desta forma, a determinação do papel das células colunares azuis têm uma importância em termos de vigilância endoscópica para adenocarcinoma do esôfago distal.

Uma vez que a mucosa esofágica é facilmente acessível para investigação endoscópica e histológica, a análise imunohistoquímica das citoqueratinas 7 e 20 poderá evidenciar se existe relação entre as células colunares azuis e as células calciformes, e desta forma, permitir uma seleção mais adequada destes pacientes. Acreditamos que, deste ponto de vista, fica justificado o estudo, tanto sob o aspecto de promoção da saúde como pelos aspectos econômicos, representados pela aplicação dos recursos em pacientes que realmente teriam benefícios com a vigilância endoscópica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Estudar a reatividade imunohistoquímica das citoqueratinas 7 e 20 nas células caliciformes e células colunares azuis em biópsias de pacientes com suspeita endoscópica de esôfago de Barrett.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Determinar se a reatividade das citoqueratinas 7 e 20 nas células colunares azuis são iguais ou diferentes daqueles expressos nas células caliciformes.

MÉTODOS

O delineamento idealizado para esta pesquisa foi um estudo transversal, onde os fatores de estudo foram as células caliciformes e células colunares azuis e o desfecho a expressão imunohistoquímica das citoqueratinas 7 e 20 nestas células.

1. MATERIAIS

- Critérios de Seleção:

Foram selecionadas biópsias obtidas por endoscopia digestiva alta em pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, realizadas no período de 2002 a 2003.

- Critérios de Inclusão:

Foram incluídas as biópsias selecionadas que preencheram os seguintes critérios:

1. Laudos histopatológicos originados pela realização de biópsias em áreas suspeitas de EB no esôfago distal durante procedimento endoscópico.
2. Cortes histológicos com orientação adequada, apresentando pelo menos:
 - dois segmentos de epitélio com no mínimo 5 (cinco) células caliciformes por campo microscópico (400x);
 - dois segmentos de epitélio com no mínimo 5 (cinco) células colunares azuis por campo microscópico (400x);
 - dois segmentos com células caliciformes e dois segmentos com células colunares em uma mesma lâmina, mas separados entre si, com no mínimo 5 células por campo microscópico (400x);

- Critérios de Exclusão:

Foram excluídas as biópsias que apresentaram os seguintes critérios:

3. Corte histológicos que não estiveram acessíveis para a pesquisa ou que não foram adequados para análise histológica e/ou imunohistoquímica.
4. Laudos endoscópicos não acessíveis para a pesquisa.
5. Laudos endoscópicos sem suspeita de EB.
6. Presença de outros diagnósticos histológicos associados (displasia, câncer, infecções).

2. PROCEDIMENTOS DE COLETA DE DADOS

As biópsias foram selecionadas a partir de uma busca manual nos arquivos de laudos do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, utilizando-se como palavras-chave “biópsias” e “esôfago” no campo onde indica a origem do material, e “metaplasia intestinal”, “células caliciformes”, “células colunares azuis” ou “Barrett” no campo onde está descrita a conclusão. A partir das lâminas selecionadas foram revisados os laudos endoscópicos dos respectivos casos para a correlação do diagnóstico endoscópico com o histológico. Os casos selecionados que apresentavam lâminas adequadamente coradas pela HE e AB para a identificação das respectivas células, foram revisados e após incluídas no estudo. Os casos em que a lâminas não estavam adequados para

As biópsias incluídas foram submetidos à técnica de imunohistoquímica, com a finalidade de estudar a reatividade das células caliciformes e células colunares azuis para as citoqueratinas 7 e 20. Os procedimentos de imunohistoquímica foram realizados no Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O material foi avaliado por dois patologistas (Dra. Luise Meurer e Dra. Marta Pires da Rocha) de forma independente. Os casos discordantes ou duvidosos foram solucionados através de um consenso entre os dois observadores. Nenhum dos patologistas teve conhecimento dos laudos anatomo-patológicos e endoscópicos dos casos selecionados. Os dados obtidos foram registrados em uma ficha de coleta de dados para posterior análise (anexo).

3. DEFINIÇÕES

Endoscopia digestiva alta

Nos laudos endoscópicos, a suspeita de EB foi definida pela presença de junção escamocolunar deslocada acima da junção esôfago-gástrica, de aparência irregular ou assimétrica, com projeções de epitélio colunar estendendo-se pelo epitélio escamoso. De acordo com a extensão deste epitélio, o EB foi subdividido em EB longo (maior que 3cm) e EB curto (menor que 3cm).

Análise Histológica

Nas amostras de biópsias endoscópicas obtidas a partir de blocos de inclusão em parafina e coradas pelos métodos da HE e AB, foram analisadas as seguintes células:

- a. **Células caliciformes** - células com bordas laterais distendidas e núcleos comprimidos em sua base, localizados na superfície epitelial, região foveolar ou glândulas.^{22,26}
- b. **Célula colunar azul** - células colunares semelhantes à células superficiais gástricas, localizadas apenas na superfície epitelial.^{22,24,25}

Técnica de imunohistoquímica

Cortes histológicos com espessura média de 4 micrômetros, obtidos em lâminas silanizadas a partir de blocos de inclusão em parafina originados de biópsias fixadas em formalina a 10%, foram desparafinizados e hidratados em água destilada. A inibição da peroxidase endógena foi feita com peróxido de hidrogênio a 5% em água destilada. Para recuperação antigênica, as lâminas foram aquecidas em forno de microondas, com tampão citrato pH 6,0, em potência máxima, durante 21 minutos. Para o bloqueio das reações inespecíficas, foi utilizada solução de leite em pó desnatado 5% com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Foram utilizados os anticorpos anti-citoqueratina 7 (clone OV-TL 12/30, Biogenex) e anti-citoqueratina 20 (clone K_s 20.8, Biogenex), ambos na diluição 1:100. Esta diluição foi escolhida por ser aquela utilizada rotineiramente pelo Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A detecção dos anticorpos primários foi feita usando o complexo estreptavidina-biotina, tendo como cromógeno 3-3-diaminobenzidine-

tetrahydrochloride (DAB). A contracoloração foi feita com hematoxilina. Controles positivos foram usados para cada um dos anticorpos (tecidos de mama para CK7 e de cólon para CK20), enquanto que os controles negativos foram obtidos substituindo o anticorpo primário por solução tampão.

A avaliação das citoqueratinas 7 e 20 foi realizada através da coloração (positiva ou negativa) da membrana e do citoplasma das células em estudo. A presença de coloração tipo inespecífica ou de fundo foi referida como negativa. Foram considerados positivos os casos que apresentaram mais de 10% de células coradas por campo microscópico de alta magnificação (400 aumentos). Nas áreas com células caliciformes, os padrões foram registrados conforme a sua reatividade na superfície e profundidade do epitélio, enquanto que nas áreas com células colunares azuis apenas a coloração do epitélio superficial foi considerada.²⁴ Em todos os casos, a reatividade das citoqueratinas nos diferentes segmentos celulares foi comparada simultaneamente com os achados da coloração pelo AB. Para fins de comparação dos padrões resultantes nas duas células, somente as respectivas reatividades do epitélio superficial foram utilizadas. Estes padrões superficiais foram denominados como tipo Barrett [CK7(+)/CK20(+)] ou como tipo não-Barrett [CK7(+)/CK20(-), CK7(-)/CK20(+), CK7(-)/CK20(-)].

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados um nível de significância de 0,05 e um poder de 80%. Para obter uma diferença de pelo menos 20% entre os dois grupos, foi estimada uma amostra de 44 casos com células caliciformes e 44 casos com células colunares azuis.

Os dados foram processados e analisados com o auxílio do programa SPSS (versão 12.0) e EPI INFO 6. Foram estabelecidos intervalos de confiança de 95% para a observação das diferenças entre as variáveis em estudo. Foram obtidas tabelas de frequência para todas as variáveis estudadas, as quais foram descritas através de percentuais e as significâncias avaliadas pelo teste exato de Fisher. Adicionalmente foram determinados o coeficiente de concordância interobservador (kappa) na análise independente dos casos pelos patologistas, tanto na identificação das células caliciformes e células colunares azuis quanto na

interpretação da imunohistoquímica. A concordância interobservador foi classificada conforme os seguintes parâmetros: fraca (<0.20), regular (0.21 – 0.40), moderada (0.41 – 0.60), boa (0.61 – 0.80) e muito boa (>0.80).⁵⁵

5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi registrado no GPPG sob n° 04-294 e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA.

O material utilizado na pesquisa consistiu de amostras de biópsias de pacientes com suspeita de Esôfago de Barrett, obtidas através de endoscopia digestiva alta por indicações clínicas diversas. Este material encontra-se armazenado no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e ficou sob responsabilidade dos pesquisadores deste estudo.

Todas as amostras foram obtidas a partir dos blocos de parafina armazenados, sem qualquer contato pessoal com os pacientes.

Os dados endoscópicos e anatomopatológicos foram utilizados de forma anônima e os analisados de forma agregada. O uso destes dados e os resultados produzidos por este estudo não implicam em alterações no tratamento ou no seguimento destes pacientes.

Baseados nas considerações acima, a utilização de Termo de Consentimento Informado na presente pesquisa tornou-se dispensável e os pesquisadores se comprometeram em manter a confidencialidade dos dados obtidos.

RESULTADOS

Conforme a revisão dos laudos endoscópicos e anatomo-patológicos, 187 casos foram selecionados. Todas as biópsias realizadas previamente nestes casos foram revisadas, e 86 biópsias preencheram os critérios de inclusão. Os dados endoscópicos e histológicos destes casos estão discriminados em anexo. Cinquenta e nove biópsias (68.6%) foram obtidas de pacientes com suspeita endoscópica de EB longo e 27 biópsias (31.4%) de EB curto (gráfico 1). As freqüências das células identificadas na análise histológica e sua relação com os achados endoscópicos estão sumarizadas na tabela 1. A avaliação independente das células calciformes e células colunares azuis resultou em uma concordância interobservador (*kappa*) de 0.75. Este valor foi decorrente da discordância na identificação das células colunares azuis em 13 casos. Não houve discordância quanto ao reconhecimento das células calciformes.

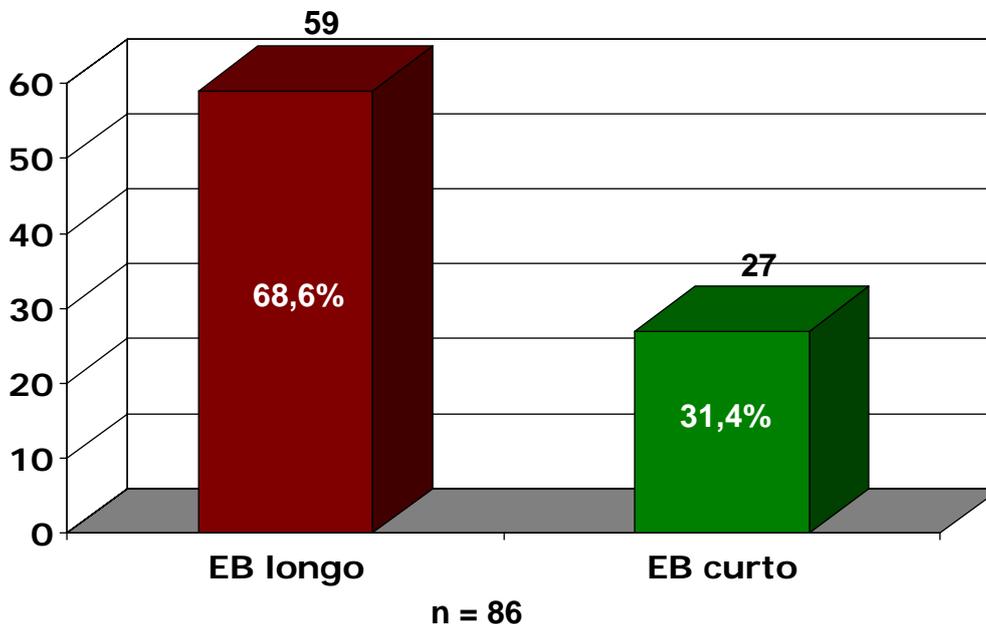


Gráfico 1. Distribuição dos pacientes de acordo com a extensão do esôfago de Barrett (EB) suspeito durante a endoscopia digestiva alta.

Tabela 1. Frequências das células caliciformes (CC), células colunares azuis (CA), ou ambas as células (CC/CA) em biópsias de pacientes com endoscopia sugestiva de esôfago de Barrett longo (EBL) e esôfago de Barrett curto (EBC).

| | CC | CA | CC/CA | TOTAL |
|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| EBL | 27 (31,4%) | 3* (3,5%) | 29 (33,7%) | 59 (68,6%) |
| EBC | 9 (10,5%) | 8* (9,3%) | 10 (11,6%) | 27 (31,4%) |
| TOTAL | 36 (41,9%) | 11 (12,8%) | 39 (45,3%) | 86 |

*p=0,003

Em 36 casos, somente células caliciformes foram observadas (figura 1). Onze casos apresentaram apenas células colunares azuis (figura 2), predominando naqueles com suspeita de EB curto. Nos 39 casos restantes, havia áreas com células colunares azuis e áreas com células caliciformes simultaneamente (figura 3). No total, células caliciformes estiveram presentes em 75 biópsias (87.2%), enquanto que as células colunares azuis foram evidenciadas em 50 biópsias (58.1%) (gráfico 2).

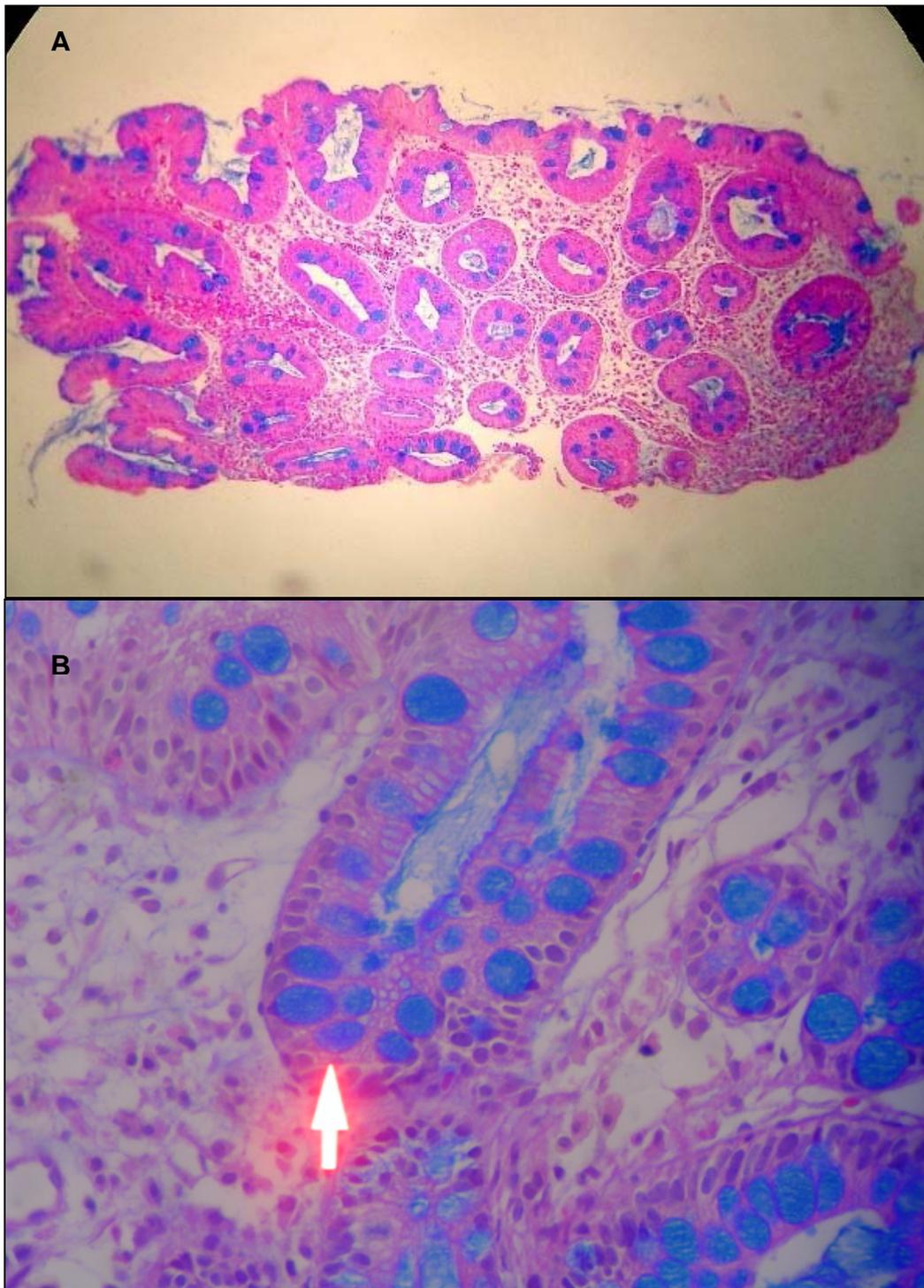


Figura 1. Biópsias em epitélio colunar do esôfago distal contendo células caliciformes na superfície e profundidade. (A: 200x; B: 400x).

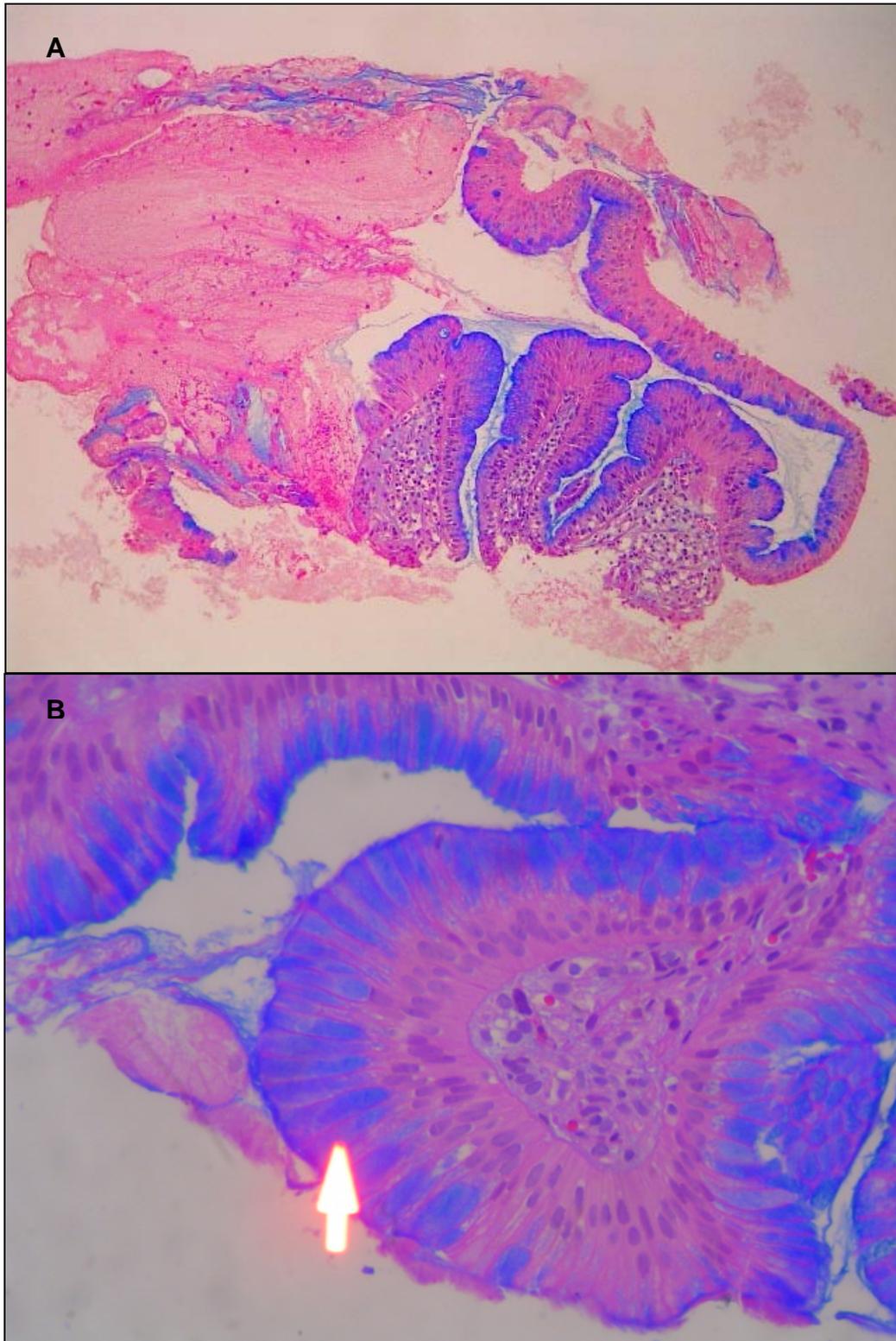


Figura 2. Biópsias em epitélio colunar de esôfago distal com células colunares azuis na superfície epitelial. (A: 200x; B: 400x).

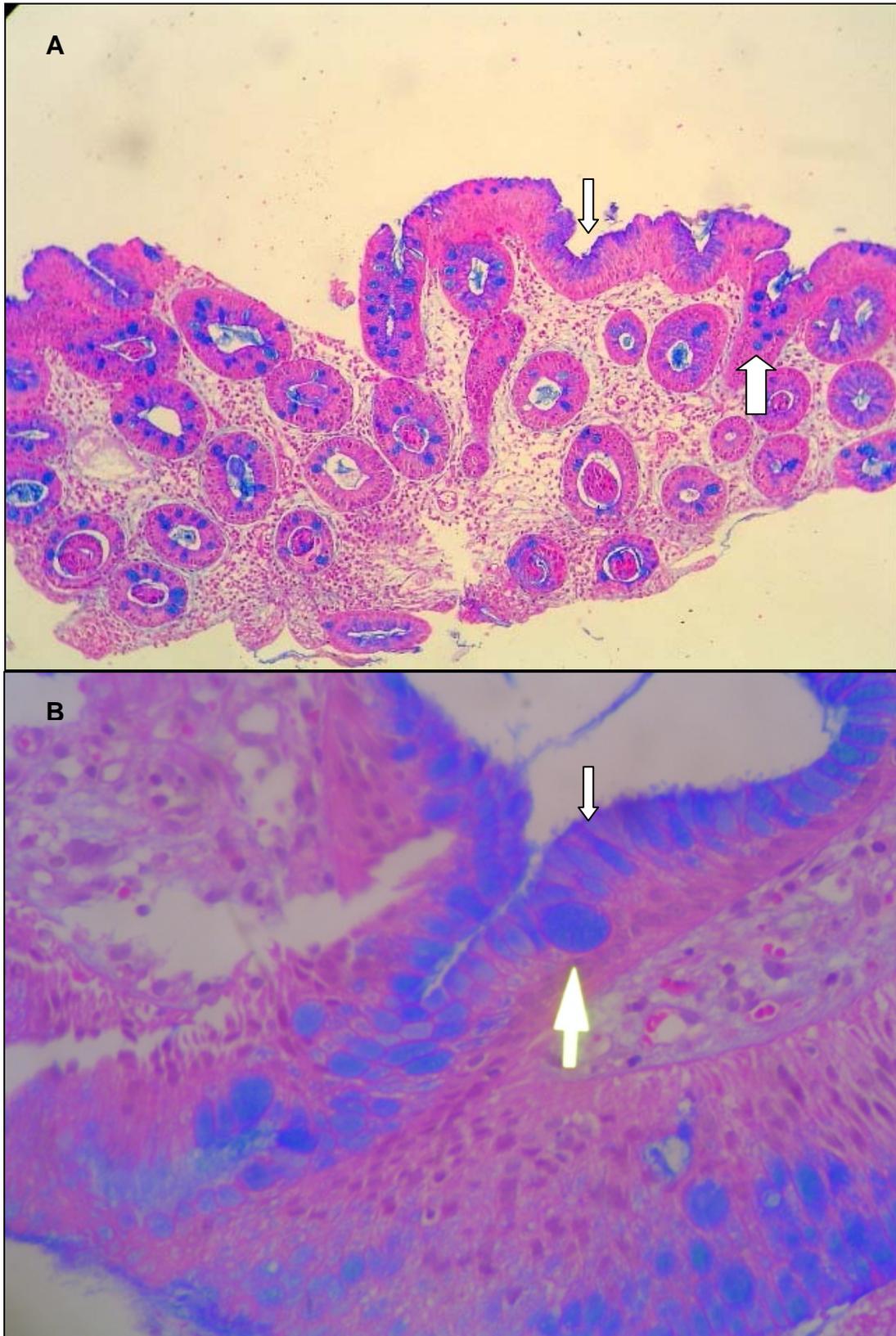


Figura 3. Biópsias em epitélio colunar do esôfago distal apresentando células calciformes (setas maiores) e células colunares azuis na superfície epitelial (setas menores). (A: 200x; B: 400x).

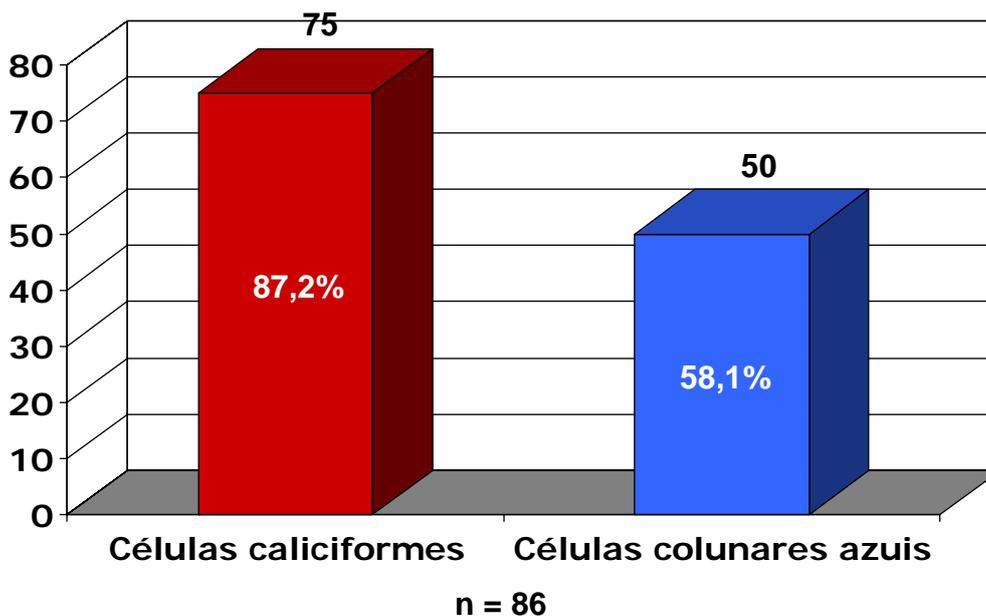


Gráfico 2. Total de biópsias com células caliciformes e células colunares azuis em pacientes com suspeita endoscópica de esôfago de Barrett.

Os resultados da avaliação das citoqueratinas no total de células caliciformes estão descritos no gráfico 3. A positividade superficial e profunda do epitélio foi o padrão predominante de reatividade para CK7, enquanto que para a CK20, o padrão mais freqüente foi o positivo superficial (Figura 4). O único caso de positividade na superfície e profundidade para CK20 ocorreu em uma biópsia com metaplasia intestinal do tipo completa.

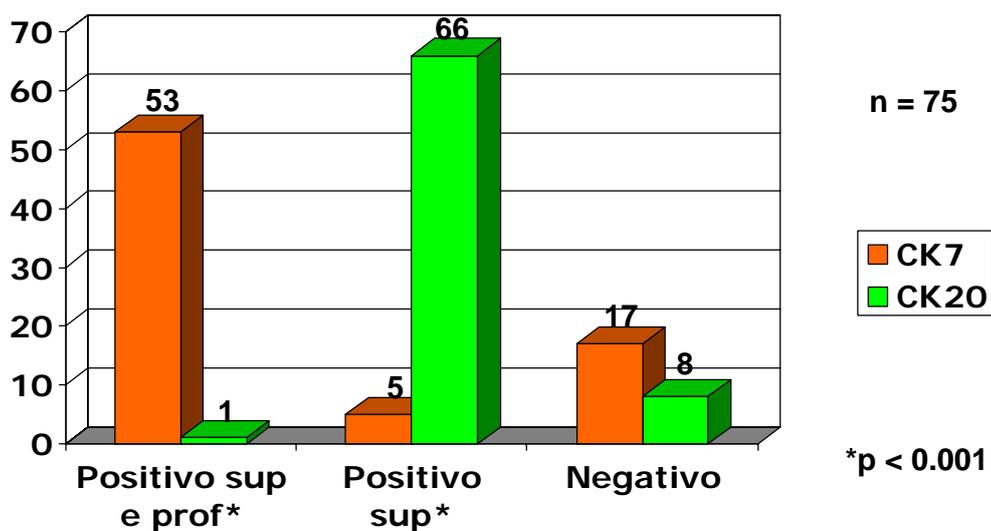


Gráfico 3. Expressões da citoqueratina 7 (CK7) e citoqueratina 20 (CK20) nas células caliciformes (sup = superficial; prof = profunda).

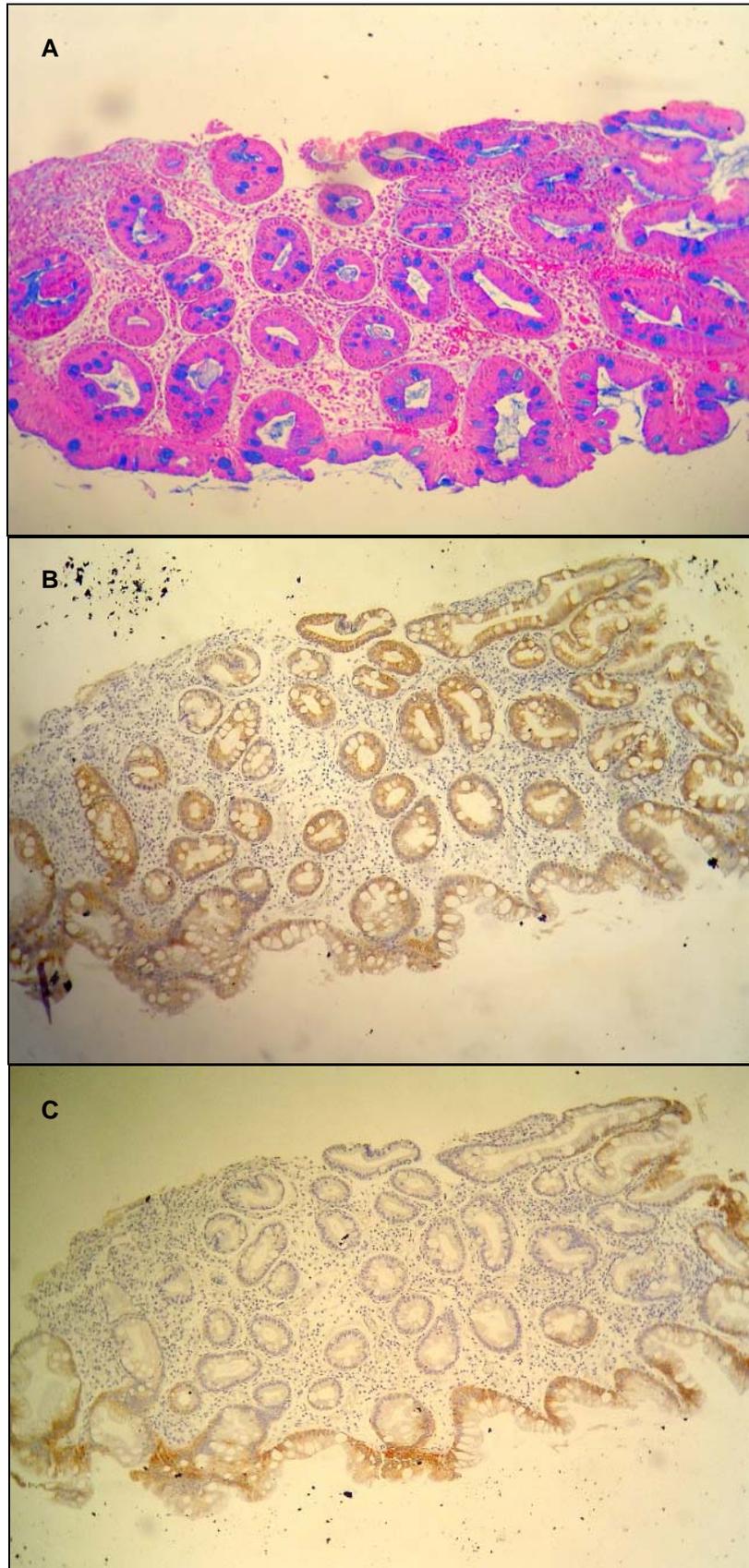


Figura 4. Aspectos comparativos da coloração do alcian blue (A), das reatividades positiva superficial e profunda da CK7 (B) e positiva superficial da CK20 (C), nas células caliciformes (200x).

Os achados imunohistoquímicos no total de células colunares azuis são visualizados no gráfico 4. O padrão positivo superficial foi mais freqüente que o negativo ($p=0,01$), tanto para CK7 quanto para CK20 (Figuras 5 e 6).

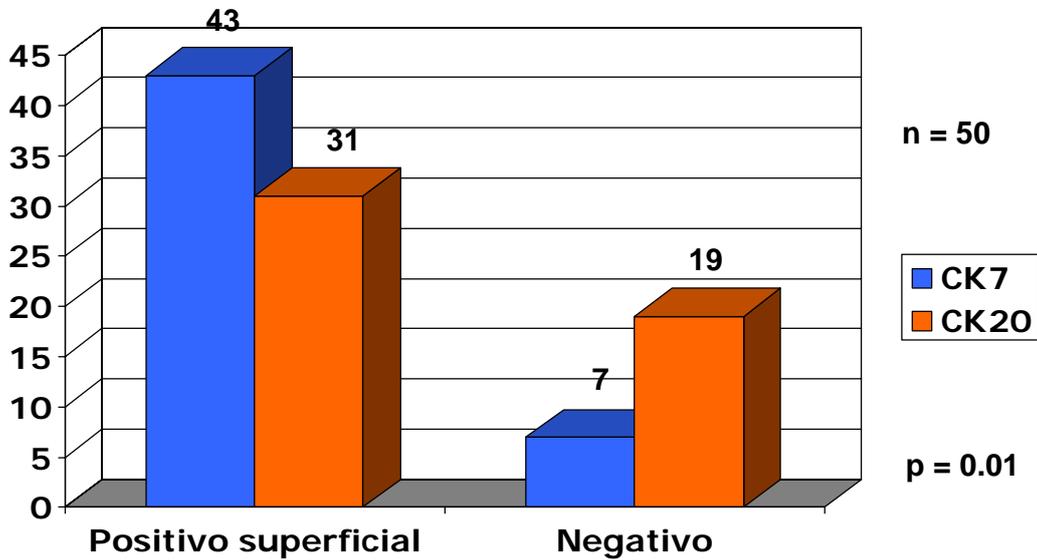


Gráfico 3. Expressões da citoqueratina 7 (CK7) e citoqueratina 20 (CK20) nas células colunares azuis.

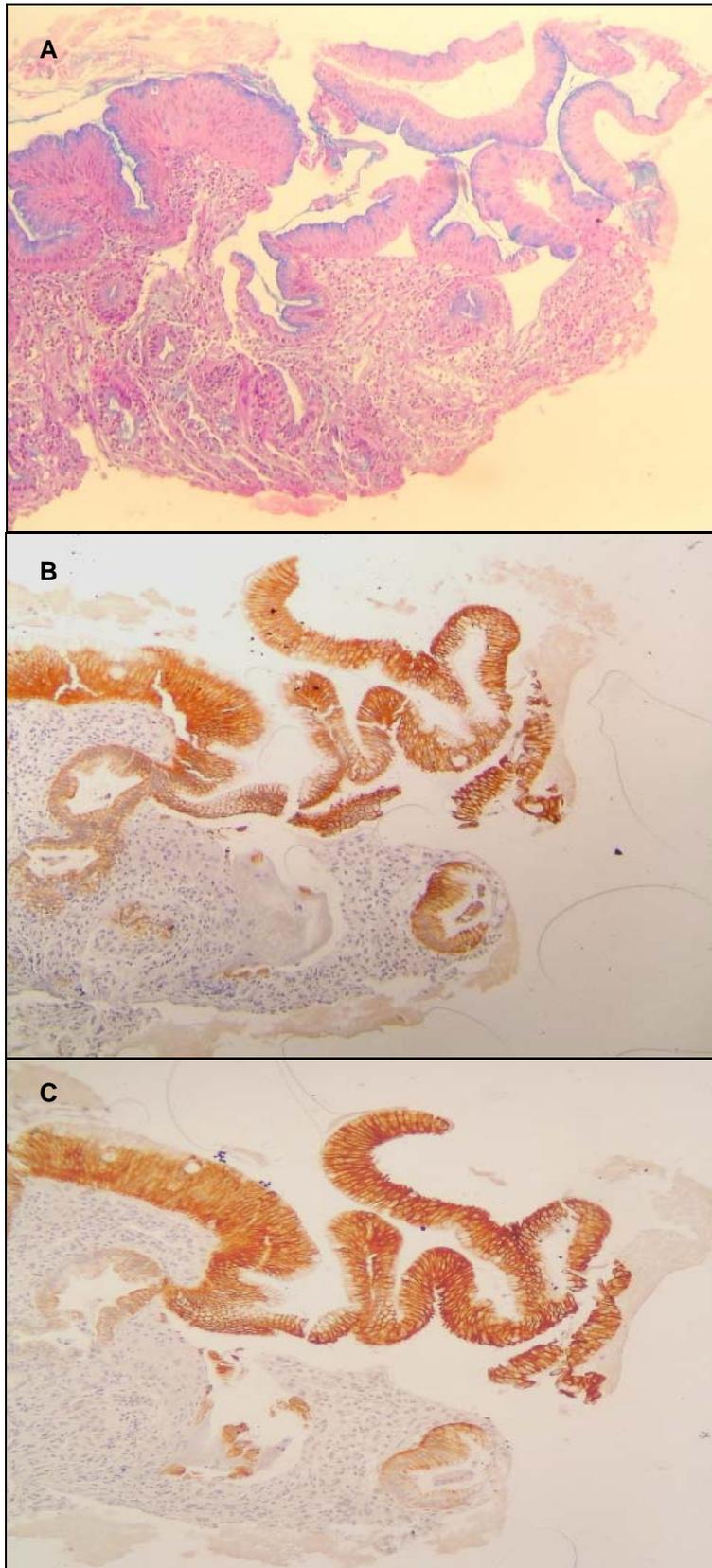


Figura 5. Alcian blue (A) e reatividade positiva superficial e profunda da CK7 (B) e positiva superficial da CK20 (C) nas células colunares azuis.

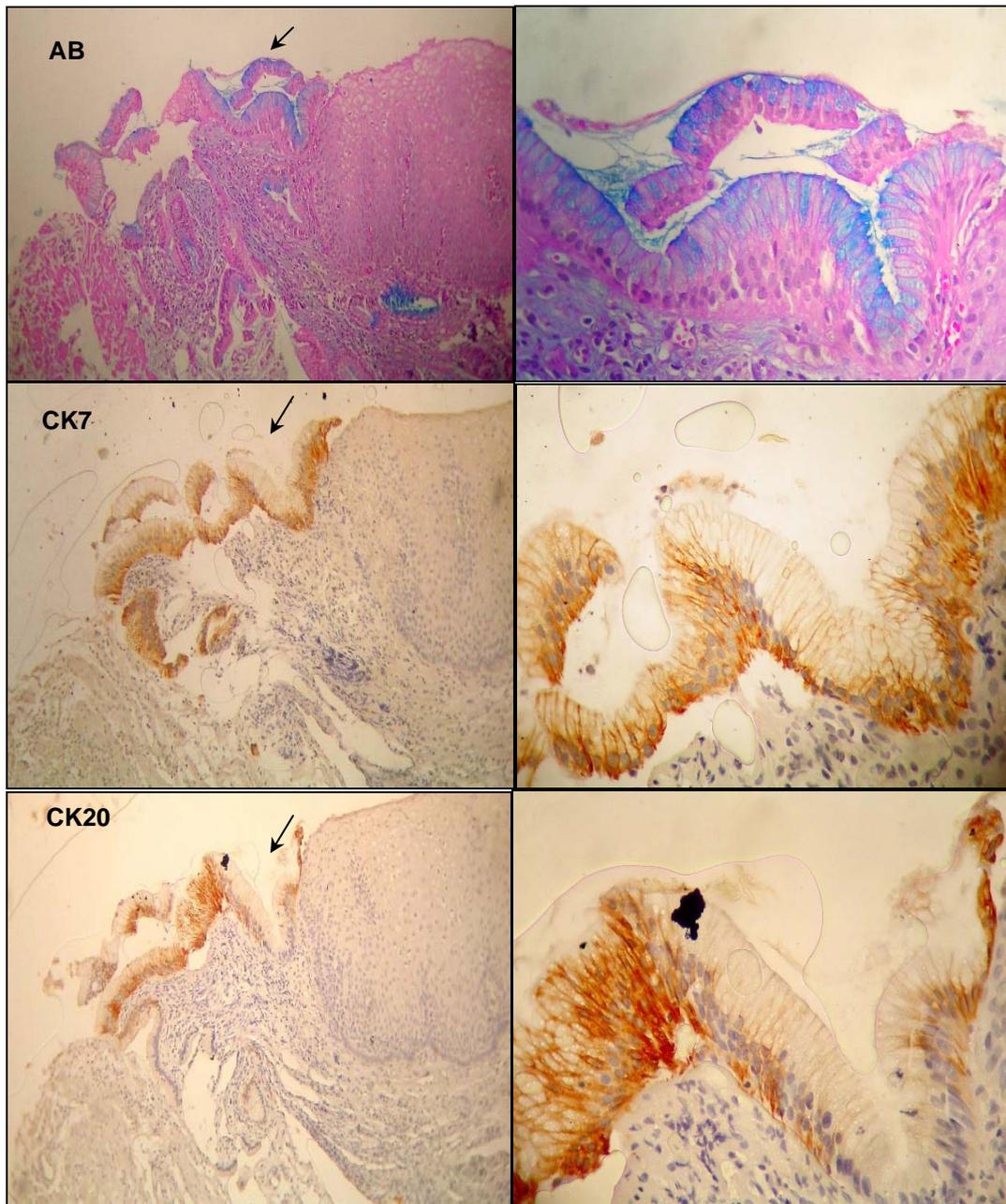


Figura 6. Biópsias demonstrando a coloração do alcian blue (AB) e a reatividade positiva superficial da CK7 e CK20 em epitélio com células colunares azuis. As áreas indicadas pelas setas nas imagens à esquerda (200x) são demonstradas à direita em maior detalhe (400x).

O coeficiente *kappa* resultante da análise independente da CK7 nas células caliciformes foi 0.85, e 0.90 nas células colunares azuis, enquanto que na interpretação da CK20, a concordância foi de 0.93 nas células caliciformes, e 0.74 nas células colunares azuis.

Na comparação das reatividades das citoqueratinas, os casos positivos “superficial” e “superficial e profundo” observados nas células caliciformes foram reunidos em um único grupo, e somente as reatividades do epitélio superficial em ambas as células foram usadas na análise. Os resultados finais desta redistribuição estão registrados na tabela 2 e no gráfico 5.

Tabela 4. Reatividade superficial das citoqueratinas 7 (CK7) e 20 (CK20) nos casos com células caliciformes (CC), células colunares azuis (CA) ou ambas as células (CC/CA).

| | n | CK7 | | CK20 | |
|---------------|----|---------------|---------------|-----------------|---------------|
| | | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |
| CC | 36 | 23 (63,9%) | 13 (36,1%) | 33* (91,7%) | 3 (8,3%) |
| CA | 11 | 10 (90,9%) | 1 (9,1%) | 6* (54,5%) | 5 (45,5%) |
| CC / CA | 39 | 35 (89,7%) | 4 (10,3%) | 34** (87,2%) | 5 (12,8%) |
| | | 33 (84,6%) | 6 (15,4%) | 25** (64,1%) | 14 (35,9%) |

*p=0.01

**p=0.03

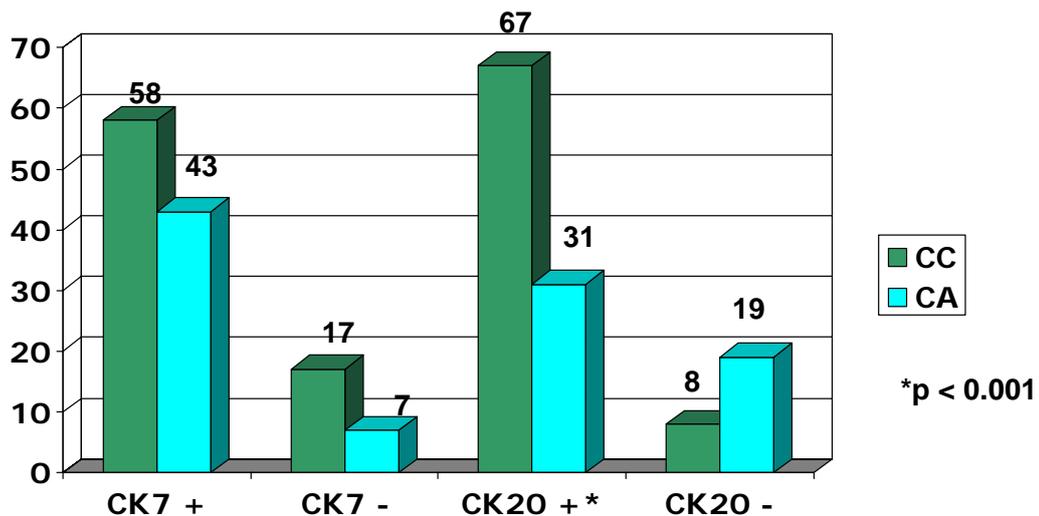


Gráfico 5. Resultado final das reatividades superficiais das citoqueratinas 7 (CK7) e 20 (CK20) nas células caliciformes e células colunares azuis.

Considerando as distribuições celulares evidenciadas na tabela 2, observamos que nas 36 biópsias com apenas células caliciformes, 23 (63,9%) apresentaram positividade para CK7, e 33 (91,7%) foram positivos para CK20. Nas 11 biópsias com somente células colunares azuis, 10 (90,9%) foram positivas para CK7 e 6 (54,5%) para CK20. Comparando as proporções resultantes nestes dois grupos, houve diferença estatística apenas para a CK20 ($p=0,01$). Em relação aos 39 casos com ambas as células em uma mesma biópsia, a positividade da CK7 e CK20 foi de 89,7% e 87,2% nas células caliciformes e de 84,6% e 64,1% nas células colunares azuis. Do mesmo modo que a comparação anterior, a diferença estatística ocorreu somente na positividade para CK20 ($p=0,03$). Na soma total dos casos com células caliciformes e células colunares azuis, não houve diferença estatística na reatividade para CK7 entre os dois tipos de células ($p=0,25$), enquanto que uma diferença significativa foi demonstrada na reatividade para CK20 ($p<0,001$).

Os padrões resultantes da associação das reatividades da CK7 e CK20 no epitélio superficial são demonstrados na tabela 3 e no gráfico 6. O cálculo do *kappa* durante a análise independente resultou em uma concordância de 0.83 nos padrões nas células caliciformes, e de 0.76 naqueles das células colunares azuis. Entre os casos com somente células caliciformes ou células colunares azuis, diferenças estatísticas ocorreram nos padrões CK7(+)/CK20(-) e CK7(-)/CK20(+) ($p=0.02$ e $p=0.04$), mas nenhuma diferença foi observada nos casos que apresentavam as duas células simultaneamente. Na soma final dos diferentes padrões em ambas as células, diferença estatística foi identificada somente quanto aos padrões CK7(+)/CK20(-) ($p= 0.003$) e CK7(-)/CK20(+) ($p= 0.02$).

Tabela 3. Co-expressão superficial das citoqueratinas 7 (CK7) e 20 (CK20) nos casos com células caliciformes (CC), células colunares azuis (CA) ou ambas as células (CC/CA).

| | n | CK7 (+) CK20 (+) | CK7 (+) CK20 (-) | CK7 (-) CK20 (+) | CK7 (-) CK20 (-) |
|------------------------|----|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| CC | 36 | 21 (58,3%) | 2* (5,6%) | 12** (33,3%) | 1 (2,8%) |
| CA | 11 | 6 (54,5%) | 4* (36,4%) | 0** (0%) | 1 (9,1%) |
| CC / CA | 39 | 30 (76,9%) | 5 (12,8%) | 4 (10,3%) | 0 (0%) |
| | | 22 (56,4%) | 11 (28,2%) | 3 (7,7%) | 3 (7,7%) |

*p=0.02

**p=0.04

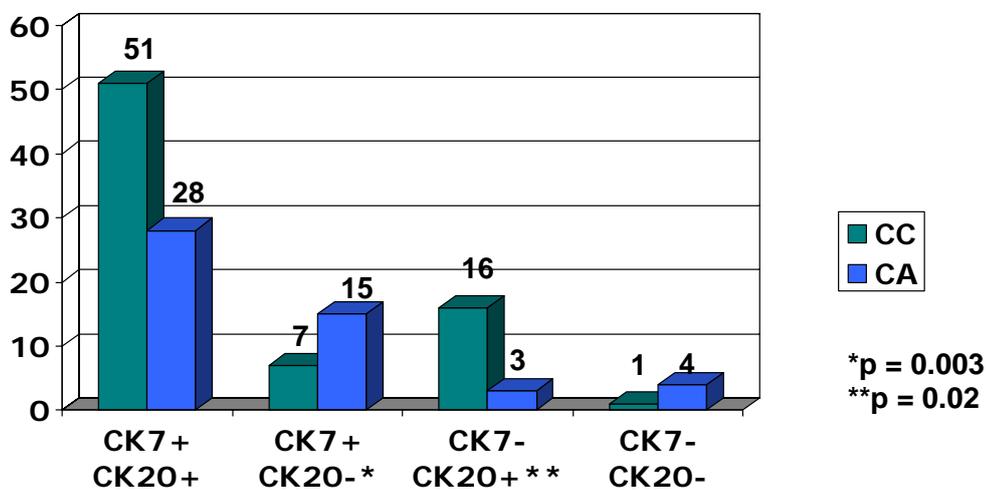


Gráfico 7. Resultado final da co-expressão superficial das citoqueratinas 7 (CK7) e 20 (CK20) nas células caliciformes e células colunares azuis.

Apesar de não ter sido objetivo deste estudo, foram observadas as reatividades da CK7/CK20 nas mucosas do tipo cárdica (constituída por células produtoras de muco) e do tipo oxíntica (constituída por células parietais) presentes nos casos submetidos à imunohistoquímica. Mucosa cárdica foi visualizada em 38 casos, mucosa oxíntico-cárdica em 8 casos e mucosa oxíntica em 4 casos. A reatividade da CK7 demonstrou que a mucosa cárdica apresentou positividade em 81,6% dos casos e a mucosa oxíntica em 41,7% ($p=0,02$). A reatividade para CK20 foi semelhante nos dois tipos de mucosa (89,5% e 91,7%, respectivamente). Na análise da expressão conjunta, o padrão CK7(+)/CK20(+) ocorreu na mucosa cárdica em 76% dos casos e na mucosa oxíntica em 33,7% ($p=0,01$), enquanto que o padrão CK7(-)/CK20(+) foi observado na mucosa cárdica em 13,2% dos casos e na mucosa oxíntica em 58,3% ($p=0,003$).

DISCUSSÃO

As citoqueratinas compreendem 20 proteínas estruturais encontradas no citoesqueleto das células epiteliais, cuja expressão imunohistoquímica depende do tipo, localização e diferenciação do epitélio. A CK7, por ser um marcador de diferenciação ductal, não é expressa no epitélio normal do trato digestivo, enquanto que a expressão da CK20, um marcador de diferenciação intestinal, está limitada ao epitélio intestinal e epitélio foveolar gástrico superficial.^{36,38} Estas citoqueratinas são amplamente usadas na identificação de vários carcinomas, e atualmente têm sido objeto de muita discussão na literatura médica em relação a suas expressões na MI da JEG. Ormsby et al³⁶ foram os primeiros autores a sugerir que padrões específicos de CK7/CK20 teriam a capacidade de fazer a diferenciação entre a MI do esôfago e a MI do estômago. Os resultados indicaram a existência de um padrão para MI esofágica (padrão tipo Barrett), o qual apresentou sensibilidade de 97% e especificidade de 100% para o diagnóstico de EB, e um outro padrão para MI gástrica (padrão tipo gástrico), o qual esteve presente em 100% dos espécimes de ressecção gástrica e em biópsias realizadas na topografia da cárdia. Os autores concluíram que estes padrões podem identificar, de maneira confiável, a localização esofágica ou gástrica da MI em materiais de biópsias obtidos por endoscopia digestiva e em espécimes de ressecção cirúrgica. Posteriormente, vários outros estudos avaliaram a reatividade de CK7/CK20 em pacientes com MI esofágica e gástrica, e os resultados obtidos foram bastante controversos, com alguns autores sustentando a hipótese de haver um padrão distinto para EB e MI gástrica,^{35-43,46} enquanto que outros não conseguiram reproduzir os mesmos achados e, conseqüentemente, não validaram o uso da CK7/C20 na diferenciação destas metaplasias.⁴⁷⁻⁵⁴

Apesar destas divergências, os autores destes estudos concordam que a distinção entre MI do esôfago e do estômago representa um ponto fundamental quando o assunto é a JEG. Algumas razões podem ser enumeradas para justificar esta importância. Primeiramente, quando segmentos curtos de epitélio colunar são visualizados durante a endoscopia, certos fatores podem ocasionar dificuldades no diagnóstico histológico do EB e da MI da cárdia. Dentre estes, pode-se destacar a definição inadequada dos pontos de referência endoscópicos, a falta de padronização quanto à extensão do epitélio colunar, o registro pouco acurado da localização das biópsias, a comunicação variável entre o endoscopista e o

patologista.²¹ A presença destes fatores podem levar a erros na interpretação dos achados histológicos, trazendo implicações no manejo adequado quanto à vigilância endoscópica para displasia e adenocarcinoma, a qual é recomendada atualmente para pacientes com diagnóstico de EB, e não está indicada para pacientes com MI da cárdia, devido ao seu baixo risco de malignização.^{5,7,12,26,28} Além disto, a MI do esôfago distal pode ser indistinguível histologicamente daquela do estômago proximal mesmo com a utilização de coloração específica para mucinas,^{5,12,18,36} tornando imprescindível a correlação dos achados endoscópicos com aqueles da histologia para se determinar o diagnóstico do EB e MI da cárdia.

Além das dificuldades na diferenciação entre EB e MI da cárdia, existe uma outra questão no diagnóstico do EB que pouco tem sido estudada. Conforme os critérios diagnósticos vigentes, o EB é sugerido através da observação de epitélio colunar na porção distal do esôfago durante o exame endoscópico, e confirmado quando células caliciformes são visualizadas em biópsias coradas com HE e AB.^{13,18} Porém, células colunares situadas na superfície do epitélio metaplásico também podem apresentar positividade ao AB e são um achado freqüente durante o exame histológico.^{22,24,25} Em um estudo topográfico de 9 espécimes de ressecção esofágica por displasia de alto grau ou carcinoma associados ao EB, Offner et al²⁴ demonstraram que estas células estavam presentes em 85,7% dos cortes histológicos e, em certas situações, foram mais prevalentes que as células caliciformes no epitélio superficial da junção esôfagogastrica e do esôfago distal. Não existe um nome de consenso para elas, mas as denominações mais comumente usadas são: células colunares azuis,^{22,25} células colunares não-caliciformes positivas para mucinas ácidas,²⁶ células colunares AB-positivas,^{23,24,27} células pré-caliciformes.²⁸ A presença destas células não é considerado critério suficiente para estabelecer o diagnóstico de EB quando células caliciformes estão ausentes, e conseqüentemente não são utilizadas para delinear uma população de risco para malignidade.^{23,27,28} Por outro lado, se for considerado que as células colunares azuis constituem um estágio pré-caliciforme, isto possivelmente motivará uma revisão dos critérios para o diagnóstico do EB.

Por essa razão, o uso de um marcador que reforce a hipótese de a célula colunar azul representar uma fase intermediária entre célula colunar e célula caliciforme pode ter uma

fundamental importância. Apesar das controvérsias verificadas nos estudos da reatividade da CK7/CK20 em MI localizada próxima à JEG, estes produziram alguns desfechos que merecem ser considerados. Shearer et al⁴⁶ mencionaram que padrões similares de CK7/CK20 foram frequentemente observados em áreas adjacentes onde não existiam células caliciformes, enquanto que no estudo de Ormsby et al,³⁶ somente áreas com células caliciformes foram avaliadas. Mohammed et al⁴⁸ identificaram o padrão tipo Barrett em 55% das biópsias em mucosa cárdica normal ou inflamada e sem evidência de metaplasia intestinal. Glickman et al⁴⁹ notaram que os imunofenótipos do epitélio mucinoso tipo cárdico, em pacientes com EB longo, EB curto e em junção esôfago-gástrica de aspecto normal, foram similares para Das-1 e CK7/CK20, porém distintos daqueles da mucosa do antro gástrico. DeMeester et al⁵⁰ observou que a mucosa cárdica apresentou o padrão tipo Barrett em 85% dos casos. Em outro estudo de Ormsby et al,⁴⁰ foi observado que áreas de mucosa colunar não-especializada apresentaram positividade para CK7 em 22% dos casos. Da mesma forma, Jovanovic et al³⁸ perceberam que o epitélio cárdico não-intestinalizado expressou forte positividade para CK7, enquanto que na mucosa do corpo e antro gástrico, a expressão foi totalmente negativa.

Estes dados tornam evidente que padrões similares de CK7/CK20 são comumente observados em mucosa colunar próxima à JEG quando células caliciformes estão ausentes. Uma explicação para isto é que possivelmente estas áreas estejam em transformação para um fenótipo intestinal.^{38,40,56} Além disto, histologicamente, o EB é constituído não somente por células caliciformes, mas também por células colunares azuis, as quais podem corresponder a células caliciformes imaturas (pré-caliciformes), e células colunares negativas para AB.⁵⁷ Da mesma forma que o EB, o epitélio superficial da cárdia também pode apresentar células colunares com positividade ao AB.^{24,26} Por isso, partindo do princípio que estas células AB-positivas possam representar um estágio pré-caliciforme, é presumível que elas possam apresentar expressões de CK7/CK20 semelhantes ao das células caliciformes. Até o momento, nenhum estudo caracterizou especificamente a reatividade da CK7/CK20 nas células colunares azuis em EB. Por isso, este estudo avaliou esta reatividade e a comparou com a expressão nas células caliciformes.

Ao avaliar separadamente as reatividades de cada citoqueratina, nós observamos que, nas células caliciformes, o padrão predominante de expressão para CK7 foi o positivo

superficial e profundo, enquanto que para a CK20 foi o padrão positivo superficial. Estes achados estão de acordo com Ormsby et al,³⁶ apesar de serem menores as proporções encontradas no nosso estudo. Nas células colunares azuis, nós avaliamos somente a reatividade do epitélio superficial, devido ao fato que é nesta área onde as células colunares azuis são mais abundantes.²⁴ Nestes casos, a positividade superficial ocorreu em 86% para CK7 e em 62% para CK20. Acreditamos que as proporções menores de casos positivos encontradas no nosso estudo podem ser justificadas pelas diferenças na técnica de imunohistoquímica, principalmente por termos utilizado as citoqueratinas em uma diluição maior quando comparada a outros estudos, o que pode determinar uma menor intensidade da coloração. Outra possível explicação para esta variabilidade é que, em alguns casos, o epitélio apresentou uma coloração fraca e irregular, sem uma adequada marcação do citoplasma e da membrana das células em questão, e por este critério foram consideradas negativas.

Quando foram comparadas as reatividades superficiais das citoqueratinas nas células caliciformes e células colunares azuis, não verificamos diferença estatística em relação à reatividade para CK7, mas sim na expressão para CK20, devido às células colunares azuis apresentarem uma menor reatividade. Por outro lado, no momento que analisamos a expressão conjunta destas citoqueratinas, foi observada diferença estatística somente nos padrões CK7(+)/CK20(-) e CK7(-)/CK20(+). O padrão CK7(+)/CK20(+), o qual seria um equivalente superficial do padrão tipo Barrett descrito por Ormsby et al,³⁶ não apresentou diferença estatística entre os dois tipos de células ($p=0,25$), mesmo com a menor reatividade da CK20 observada nas células colunares azuis. Este mesmo resultado foi verificado no padrão CK7(-)/CK20(-). Porém, devido à frequência deste padrão ter sido pouco comum (um caso com células caliciformes e 4 casos com células colunares azuis), não consideramos este achado relevante. Também é importante ressaltar que todas estas evidências ocorreram de maneira similar, tanto nos casos com somente células caliciformes ou somente células colunares azuis, quanto naqueles casos em que ambas as células estavam presentes na mesma lâmina. Por estas razões, é possível concluir que, quando CK7 e CK20 foram analisadas separadamente, as semelhanças imunohistoquímicas entre células caliciformes e células colunares azuis ocorreram na reatividade para CK7 e, quando considerada a expressão

conjunta de CK7/CK20, estas semelhanças foram observadas no padrão CK7(+)/CK20(+) e CK7(-)/CK20(-).

Outro achado interessante descrito por Offner et al²⁴ foi a localização das células caliciformes, células colunares AB-positivas e células colunares AB-negativas na mucosa de EB em espécimes de ressecção cirúrgica esofágica. Neste estudo, o limite do estômago (cárdia) foi definido histologicamente pela presença de glândulas mucosas contendo células parietais, e o epitélio colunar proximal a este ponto foi considerado como mucosa de EB. Na comparação entre as distribuições celulares nos segmentos proximais e distais do epitélio metaplásico não foi demonstrada diferença quanto às células caliciformes e células colunares AB-positivas, mas sim em relação às células colunares AB-negativas, as quais foram encontradas em maior quantidade nos segmentos distais. Uma comparação entre os resultados de Offner et al²⁴ e os do nosso estudo ficou bastante prejudicada, pois utilizamos biópsias ao invés de materiais de ressecção esofágica. Além disto, as biópsias faziam parte de exames endoscópicos da rotina hospitalar, e por isso a localização exata dos pontos de biópsias no epitélio colunar não pôde ser determinada. Porém, podemos fazer uma análise em relação às freqüências celulares e a extensão do EB. Nós observamos que, nos casos confirmados de EB longo e EB curto, não houve diferença estatística nas proporções daqueles que apresentaram somente células caliciformes e nos casos com células caliciformes e células colunares azuis. Já nos casos em que o EB não foi confirmado histologicamente (só havia células colunares azuis), foi observada diferença em relação à extensão do epitélio colunar visível à endoscopia digestiva, sendo a proporção de células colunares azuis maior naqueles casos suspeitos de EB curto. Através destes dados, dois aspectos podem ser considerados. O primeiro aspecto, o qual já está estabelecido na literatura médica e foi reproduzido no nosso estudo, refere-se ao fato de que quanto maior a extensão do epitélio colunar, maior o número de biópsias e, conseqüentemente, maior a probabilidade de as células caliciformes serem visualizadas.^{5,7,11,58} Nós observamos que 56 de 59 casos (95%) com suspeita de EB longo apresentaram células caliciformes na histologia, enquanto que isto ocorreu em 19 de 27 casos (70%) com suspeita de EB curto. O segundo aspecto é que, quanto maior a extensão do epitélio colunar, a probabilidade de se evidenciar células colunares azuis parece ser menor. Nos casos suspeitos de EB longo, 32 de 59 casos (54%) demonstraram células colunares

azuis, ao passo que isto foi observado em 18 de 27 casos (66%) suspeitos de EB curto. Diferença estatística só foi detectada no grupo de pacientes em que apenas células colunares azuis foram observadas no exame histológico (3 casos suspeitos de EB longo e 8 casos suspeitos de EB curto). Considerando-se a hipótese de a célula colunar azul representar um estágio pré-caliciforme, estes dados permitem deduzir que em extensões maiores de epitélio colunar, as células colunares azuis podem evoluir para células caliciformes. Por isso que, em alguns casos, a análise histológica demonstrou células caliciformes e células colunares azuis, e em outros, somente células caliciformes estavam presentes.

Um resultado adicional que não figurou nos objetivos deste estudo foi a observação da reatividade da CK7/CK20 nas mucosas cárdica e oxíntica, as quais foram visualizadas em alguns dos casos incluídos. Outros autores já haviam mencionado que o padrão tipo Barrett esteve presente na mucosa cárdica em uma proporção significativa de casos (55% no estudo de Mohammed et al⁴⁸ e 85% no de DeMeester et al⁵⁰). No nosso estudo, observamos o padrão CK7(+)/CK20(+) em 76,3% dos casos, o que corresponde aos achados destes autores. Quanto à mucosa oxíntica, verificamos que o padrão CK7(-)/CK20(+) foi o predominante (58,3%). Este resultado está de acordo com as observações de Oksanen et al,⁵⁹ o qual avaliou a expressão da CK7/CK20 na mucosa cárdica normal ou inflamada, em pacientes jovens com e sem infecção pelo *Helicobacter pylori*. Neste estudo foi encontrado que na mucosa cárdica pura (sem células parietais), a coloração para CK7/CK20 ocorreu de acordo com o padrão tipo Barrett, enquanto que na presença de mucosa oxíntico-cárdica, a CK7 teve uma tendência a não corar conforme o padrão tipo Barrett. Em um outro estudo realizado por De Hertogh et al,⁶⁰ espécimes de autópsias em fetos e neonatos foram examinadas histologicamente para verificar a presença de mucosa cárdica na JEG e após submetidas à técnica de imunohistoquímica para algumas citoqueratinas, incluindo CK7/CK20. As reatividades da mucosa cárdica foram então comparadas com a mucosa do estômago. Os autores não encontraram diferenças nas freqüências dos padrões CK7(+)/CK20(+) e CK7(-)/CK20(-) entre o epitélio colunar do esôfago e do estômago, e sim nos padrões CK7(+)/CK20(-) e CK7(-)/CK20(+). A prevalência do padrão CK7(+)/CK20(-) diminuiu significativamente a partir do esôfago distal em direção às porções mais distais do estômago (33% no epitélio colunar esofágico versus 0% no estômago), enquanto que o padrão CK7(-)/CK20(+) aumentou no mesmo sentido (0% no epitélio colunar

esofágico versus 40% no antro gástrico). Estes achados nos padrões de CK7/CK20 foram bastante intrigantes, porque o nosso estudo apresentou as mesmas diferenças, porém relacionadas às células caliciformes e células colunares azuis. Verificamos que o padrão CK7(+)/CK20(-) predominou nas células colunares azuis, e o padrão CK7(-)/CK20(+) nas células caliciformes. Entretanto, não é possível fazer a correlação destes achados com aqueles encontrados por De Hertogh et al,⁶⁰ já que os fatores em estudo e os métodos utilizados foram bastante diferentes. Independente deste fato, nossos resultados sugerem que a mucosa cárdica apresenta expressões imunohistoquímicas comuns com o epitélio metaplásico do EB, sustentando a proposição de alguns autores, que consideram a este tipo de mucosa como o processo inicial da transformação metaplásica do epitélio escamoso esofágico.^{38,49,50, 61-65}

Outros imunomarcadores têm sido estudados na metaplasia intestinal do EB, como a expressão de mucinas, Cdx2 e Das-1. Mucinas (MUC) são proteínas glicosiladas produzidas por células epiteliais e constituem o principal componente da camada de muco do trato gastrointestinal.⁵⁴ Em casos com EB, Flucke et al⁵⁵ detectaram forte reatividade superficial e profunda para MUC1, enquanto que MUC2 e MUC5AC apresentaram forte reatividade no epitélio superficial. Porém, Gulmann et al⁵³ mencionaram que MUC1 raramente teve expressão em EB, enquanto que a reatividade de MUC2 e MUC5AC ocorreu em 100% e 42,6% dos casos, respectivamente. Por sua vez, Glickman et al⁶⁶ demonstraram que expressões similares de MUC1, MUC2 e MUC5AC foram observadas nas células caliciformes e células colunares não-caliciformes no epitélio com EB. Este achado também foi descrito por Piazeulo et al.⁵⁴ Entretanto, nenhum destes estudos descreveu os resultados do AB no epitélio metaplásico, tornando difícil fazer qualquer inferência a respeito da reatividade destas mucinas nas células colunares azuis.

Cdx2 representa uma proteína essencial na diferenciação precoce e manutenção do epitélio intestinal, cuja expressão ocorre ao longo de todo o intestino delgado e intestino grosso, tendo como limite proximal a junção gastroduodenal.⁶⁷ Moons et al⁶⁸ analisaram a expressão de Cdx2 em 53 biópsias esofágicas com epitélio colunar especializado, e em 100% dos casos foi observada coloração nuclear positiva nas células caliciformes. De forma semelhante, Phillips et al⁶⁷ utilizaram técnica de imunohistoquímica para detectar Cdx2 no epitélio metaplásico do esôfago e compararam os resultados com a coloração por PAS-AB. Em

todos os casos de EB o Cdx2 foi positivo, e mucinas ácidas estiveram presentes nas células caliciformes e células colunares não-caliciformes. Nos casos de epitélio cárdico (juncional), mucinas ácidas estiveram presentes em 85% dos casos CDx2 positivos e em 74% dos casos Cdx2 negativos. Em outro estudo, Groisman et al⁶⁹ observaram que todos os casos com metaplasia intestinal foram positivos para Cdx2, tanto nas células caliciformes quanto nas células colunares. Porém, nos casos sem metaplasia intestinal, reatividade focal para Cdx2 foi vista em 38% das células colunares, e em 24% dos casos, faixas de células colunares azuis estavam presentes e foram Cdx2 negativas. Por sua vez, Steininger et al⁷⁰ também detectou positividade para Cdx2 em células caliciformes e células colunares nos casos inequívocos de EB. Porém, os achados do AB neste estudo foram inconsistentes para indicar confiavelmente uma diferenciação intestinal precoce. Alguns destes estudos sugerem que a expressão do Cdx2 nas células caliciformes e não-caliciformes é similar nos casos de EB, mas diferente naqueles casos que apresentam somente células colunares, e concluem que a positividade do AB em células colunares pode não ser indicativa de metaplasia intestinal.^{67,69,70}

Das-1 é um anticorpo monoclonal que reage contra as células caliciformes do cólon. Tem sido demonstrado que este anticorpo também reage positivamente na metaplasia intestinal do EB, mas nenhuma reatividade tem sido encontrada na mucosa normal do esôfago, estômago e intestino delgado.^{49,54} Em um estudo de Glickman et al,⁴⁹ foi observado que, em casos de EB longo, EB curto e MI da cárdia, as células caliciformes apresentaram positividade para Das-1 em 91%, 88% e 100%, respectivamente. Nas células colunares não-caliciformes, a coloração também foi positiva, porém estas estiveram presentes em menor quantidade. Outro achado deste estudo foi a reação positiva similar no epitélio cárdico não-metaplásico (35%) e no epitélio tipo cárdico em EB longo (29%) e EB curto (44%). DeMeester et al⁵⁰ encontraram reatividades semelhante para Das-1 entre EB e MI da cárdia, mas com diferença significativa em relação à MI gástrica. Piazuolo et al⁵⁴ também verificaram que, em casos de EB, as células caliciformes e células colunares coraram de forma equivalente para Das-1 (96% e 94%, respectivamente).

Analisando os resultados dos diferentes imunomarcadores nos estudos acima, as evidências parecem demonstrar que células do epitélio colunar possuem reatividades imunohistoquímicas semelhantes em casos com metaplasia intestinal ou em casos onde não

se observam células caliciformes. No nosso estudo, acrescentamos os achados do AB no epitélio colunar para realçar a presença das células colunares azuis, e os resultados parecem indicar que células caliciformes e células colunares azuis também apresentam algumas similaridades imunohistoquímicas de acordo com a expressão de CK7/CK20. Estes achados sugerem que a célula colunar azul pode representar uma forma imatura de célula caliciforme. Porém, para esclarecer esta questão, seria essencial a realização de um estudo comparando a reatividade destes vários imunomarcadores, tendo como base os resultados da coloração com AB.

CONCLUSÃO

De acordo com a reatividade imunohistoquímica da CK7 e CK20 nas células colunares azuis e células caliciformes em pacientes com suspeita endoscópica de EB, podemos concluir que:

1º) Células caliciformes e células colunares azuis apresentam reatividades similares para CK7, mas diferentes para CK20.

2º) Os padrões de expressão conjunta de CK7/CK20 nas células colunares azuis e células caliciformes são semelhantes quanto aos padrões CK(+)/CK20(+) e CK(-)/CK20(-), e diferentes para os padrões CK(+)/CK20(-) e CK(-)/CK20(+)

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A avaliação imunohistoquímica para CK7 e CK20 tem sido objeto de vários estudos, que procuram determinar padrões de expressão distintivos entre metaplasia intestinal do EB e metaplasia intestinal da cárdia. O presente estudo utilizou apenas casos suspeitos de EB à endoscopia digestiva alta, e procurou caracterizar a reatividade superficial das CK7 e CK20 nas células caliciformes e células colunares azuis de maneira individualizada. Não verificamos diferenças na expressão para CK7 e, embora os resultados na expressão para CK20 tivessem apresentado diferenças, isto parece não ter exercido influência no resultado da análise conjunta, onde o padrão superficial tipo Barrett CK7(+)/CK20(+) foi o mais freqüente em ambas as células. Estes dados sugerem que células caliciformes e células colunares azuis possuem algumas semelhanças na expressão destas citoqueratinas. Porém, ainda pode ser um tanto prematuro declarar que a célula colunar azul representa um estágio pré-caliciforme. Mucinas, Cdx2 e Das-1 são marcadores que parecem ter um futuro promissor na avaliação do epitélio metaplásico do EB. Uma comparação entre as reatividades de vários imunomarcadores, correlacionados com os achados do AB, pode acrescentar informações relevantes a respeito da relação entre estas células e, com isto, clarificar um dos assuntos controversos ainda existentes no diagnóstico histológico do EB.

REFERÊNCIAS

1. FASS R. Epidemiology and Pathophysiology of Symptomatic Gastroesophageal Reflux Disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98(suppl):S2-S7.
2. KAHRILAS PJ. Diagnosis of Symptomatic Gastroesophageal Reflux Disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98(suppl):S15-S23.
3. CAMERON A. J. Epidemiology of Columnar-Lined Esophagus and Adenocarcinoma. *Gastroentrol Clin* 1997; 6:487-494.
4. NADER F, DA COSTA JS, NADER GA, MOTTA GL. Prevalência de pirose em Pelotas, RS, Brasil: estudo de base populacional. *Arq Gastroenterol* 2003; 40(1)31-34.
5. FALK GW. Barrett's Esophagus. *Gastroenterology* 2002; 122:1569-1591.
6. SPECHLER SJ. Barrett's Esophagus. *N Engl J Medicine* 2002; 346: 836-842.
7. SAMPLINER RE and THE PRACTICE PARAMETERS COMMITTEE OF THE AMERICAN COLLEGE OF GASTROENTEROLOGY. Update Guidelines for the Diagnosis, Surveillance and Therapy of Barrett's Esophagus. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:1888-1895.
8. REYNOLDS JC, RAHIMI P, HIRSCHI D. Barrett's Esophagus: Clinical Characteristics. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:441-460
9. ERTAN A, YOUNES M. Barrett's Esophagus. *Dig Dis Sci* 2000;45:1670-1673
10. DEMEESTER SR, DEMEESTER TR. Columnar Mucosa and Intestinal Metaplasia of the Esophagus. Fifty Years of Controversy. *Ann Surg* 2000;231:303-321.
11. RAJAN E, BURGART LJ, GOSTOUT CJ. Endoscopic and Histologic Diagnosis of Barrett Esophagus. *Mayo Clin Proc* 2001;76:217-225.
12. SHARMA P. Short Segment Barrett Esophagus and Specialized Columnar Mucosa at Gastroesophageal Junction. *Mayo Clin Proc* 2001;76:331-334.

13. CARTON E, CALDWELL MTP, McDONALD G, RAMA D, TANNER WA, REYNOLDS JV. Specialized Intestinal Metaplasia in Patients with Gastro-oesophageal Reflux Disease. *Brit J Surg* 2000, 87:116-121.
14. DIETZ J, MEURER L, MAFFAZZONI DR, FURTADO AD, PROLLA JC. Intestinal Metaplasia in the Distal Esophagus and Correlation with Symptoms of Gastroesophageal Reflux Disease. *Dis Esophagus* 2003;16:29-32.
15. HIROTA WK, LOUGHNEY TM, LAZAS DJ, MAYDONOVITCH CL, RHOLL V, WONG RKH. Specialized Intestinal Metaplasia, Dysplasia, and Cancer of the Esophagus and Esophagogastric Junction: Prevalence and Clinical data. *Gastroenterology* 1999;116:277-285.
16. DIAS PEREIRA A, SUSPIRO A, CHAVES P, SARAIVA A, GLÓRIA L, MENDES DE ALMEIDA JC, LEITÃO CN, SOARES J, MIRA FC. Short Segment of Barrett's Epithelium and Intestinal Metaplasia in Normal Appearing Oesophagogastric Junctions: the Same or Two Different Entities? *Gut* 1998;42:659-662.
17. FAGUNDES RB, CANTARELLI JC, BASSI LA, MELO CR, OLIVEIRA VP, FENILI AC, DE CARLI D. Prevalência do Esôfago de Barrett na Unidade de Endoscopia Digestiva de Hospital de Referência para a Região Central do Rio Grande do Sul. *GED* 2003;22(6):213-8.
18. GOLDBLUM JR. The Significance and Etiology of Intestinal Metaplasia of Esophagogastric Junction. *Ann Diagn Pathol* 2002;6:67-73.
19. BOYCE HW. Endoscopic Definitions of Esophagogastric Junction Regional Anatomy. *Gastrointest Endosc* 2000;51:586-592
20. SCHMITZ RJ, SHARMA P, TOPALOVSKI M, WESTON AP. Detection of Barrett's Esophagus after Endoscopic Healing for Erosive Esophagitis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2433 (abstract).
21. ARMSTRONG D. Review article: Towards Consistency in the Endoscopic Diagnosis of Barrett's Oesophagus and Columnar Metaplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;(Suppl 5):40-47.

22. GUINDI M, RIDDELL RH. Histology of Barrett's esophagus and dysplasia. *Gastrointest Endoscopy Clin N Am* 2003; 13:349-368.
23. HAGGITT RC. Pathology of Barrett's esophagus. *J Gastrointest Surg* 2000;4:117-8.
24. OFFNER FA, LEWIN KJ, WEINSTEIN WM. Metaplastic Columnar Cells in Barrett's Esophagus: A Common and Neglected Cell Type. *Hum Pathol* 1996; 27:885-889.
25. WEINSTEIN WM., IPPOLITI AF. The Diagnosis of Barrett's Esophagus: Goblets, Goblets, Goblets. *Gastrointest Endosc* 1996; 44:91-5.
26. CHEN YY, WANG HH, ANTONIOLI DA., SPECHLER SJ, ZEROOGIAN JM, GOYAL R, SHAHSAFAEI A, ODZE RD. Significance of Acid-Mucin-Positive Nongoblet Columnar Cells in the Distal Esophagus and Gastroesophageal Junction. *Hum Pathol* 1999; 30:1488-1495.
27. FLÉJOU JF. Barrett's Esophagus: from Metaplasia to Dysplasia and Cancer. *Gut* 2005;54(Suppl I):i6-i12.
28. FALLER G, BORSCHARD F, ELL C, SEITZ G, STOLTE M, WALCH A, RÜSCHOFF J. Histopathological Diagnosis of Barrett's Mucosa and Associated Neoplasias: Results of a Consensus Conference of the Working Group for Gastroenterological Pathology of the German Society for Pathology on 22 September 2001 in Erlangen. *Virchows Arch* 2003; 443:597-601.
29. CHU PG, WEISS LM. Keratin Expression in Human Tissues and Neoplasms. *Histopathology* 2002;40:403-439.
30. CHU P, WU E, WEISS LM. Cytokeratin 7 and Cytokeratin 20 Expression in Epithelial Neoplasms: A Survey of 435 Cases. *Mod Pathol* 2000;13:962-972.
31. MOLL R, LÖWE A, LAUFER J, FRANKE WW. Cytokeratin 20 in Human Carcinomas. A New Histodiagnostic Marker Detected by Monoclonal Antibodies. *Am J Pathol* 1992;140:427-447.
32. ORMSBY AH, GOLDBLUM JR, RICE TW, RICHTER JE, GRAMLICH TL. The Utility of Cytokeratins Subsets in Distinguishing Barrett-related Oesophageal Adenocarcinoma from Gastric Adenocarcinoma. *Histopathology* 2001;38:307-311

33. TANIÈRE P, BORGHESI-SCOAZEC G, SAURIN J-C, LOMBARD-BOHAS C, BOULEZ J, BERGER F, HAINAUT P, SCOAZEC J-Y. Cytokeratin Expression in Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction. *Am J Surg Pathol* 2002;26(9):1213-1221.
34. SHEN B, ORMSBY AH, SHEN C, DUMOT JA, SHAO YW, BEVINS CL, GRAMLICH TL. Cytokeratin Expression Patterns in Noncardia, Intestinal Metaplasia-associated Gastric Adenocarcinoma: Implication for the Evaluation of Intestinal Metaplasia and Tumors at the Esophagogastric Junction. *Cancer* 2002;94:820-831.
35. FLUCKE U, STEINBORN E, DRIES V, MÖNIG SP, SCHNEIDER PM, THIELE J, HÖLSCHER AH, DIENES HP, BALDUS SE. Immunoreactivity of Cytokeratins (CK7, CK20) and Mucin Peptide Core Antigens (MUC1, MUC2, MUC5AC) in Adenocarcinomas, Normal and Metaplastic Tissues of Distal Esophagus, Oesophago-gastric Junction and Proximal Stomach. *Histopathology* 2003;43:127-134.
36. ORMSBY AH, GOLDBLUM JR, RICE TW, RICHTER JE, FALK GW, VAEZI MF, GRAMLICH TL. Cytokeratin Subsets can Reliably Distinguish Barrett's Esophagus from Intestinal Metaplasia of the Stomach. *Hum Pathol* 1999;30:288-294.
37. WALLNER B, SYLVAN A, JANUNGER KG, BOZOKY B, STENLING R. Immunohistochemical Markers for Barrett's Esophagus and Association to Esophageal Z-Line Appearance. *Scand J Gastroenterology* 2001;36:910-915.
38. JOVANOVIĆ I, TZARDI M, MOUZAS IA, MICEV M, PESKO P, MILOSAVLJEVIĆ T, ZOIS M, SGANZOS M, DELIDES G, KANAVAROS P. Changing Patterns of Cytokeratins 7 and 20 Expression from Normal Epithelium to Intestinal Metaplasia of the Gastric Mucosa and Gastroesophageal Junction. *Histol Histopathol* 2002;17:445-454.
39. SARBIA M, DONNER A, FRANKE C, GABBERT HE. Distinction Between Intestinal Metaplasia in the Cardia and Barrett's Esophagus: The Role of Histology and Immunohistochemistry. *Hum Pathol* 2004;35(3):371-376.
40. ORMSBY AH, VAEZI MF, RICHTER JE, GOLDBLUM JR, RICE TW, FALK GW, GRAMLICH TL. Cytokeratin Immunoreactivity Patterns in the Diagnosis of Short-segment Barrett's Esophagus. *Gastroenterology* 2000;119:683-690.

41. YIM HJ, LEE SW, CHOUNG RS, KIM YS, KIM JY, LEE HS, SONG CW, CHOI JH, BAK YT, RYU HS, HYUN JH, KIM DS, KIM CH. Is Cytokeratin immunoreactivity Useful in the Diagnosis of Short-segment Barrett's Esophagus in Korea? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17(6):611-6 (abstract).
42. YAGI K, NAKAMURA A, SEKINE A. Cytokeratin Immunoreactivity Patterns in Short-segment Barrett's Esophagus in Japanese Patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20(6):929-34 (abstract).
43. LIU GS, GONG J, CHENG P, ZHANG J, CHANG Y, QIANG L. Distinction between Short-segment Barrett's Esophageal and Cardiac Intestinal Metaplasia. *World J Gastroenterol* 2005;11(40):6360-6365
44. COULEVARD A, CAUVIN J-M, GOLDFAIN D, ROTENBERG A, ROBASZKIEWICZ M, FLÉJOU J-F. Cytokeratin Immunoreactivity of Intestinal Metaplasia at Normal Oesophagogastric Junction Indicates its Aetiology. *Gut* 2001;49:761-766.
45. BALAJI NS, DEMEESTER SR, WICKRAMASINGHE KS, HAGEN JA, PETERS JH, DEMEESTER TR. Etiology of Intestinal Metaplasia at the Gastroesophageal Junction. Reflux, H. pylori Infection, or both? *Surg Endosc* 2003;17:43-48.
46. SHEARER C, GOING J, NELLSON L, MACKAY C, STUART RC. Cytokeratin 7 and 20 Expression in Intestinal Metaplasia of the Distal Oesophagus: Relationship to Gastroesophageal Reflux Disease. *Histopathology* 2005; 47:268-275.
47. EL-ZIMAIT HMT, GRAHAM DY. Cytokeratin Subsets for Distinguishing Barrett's Esophagus from Intestinal Metaplasia in the Cardia Using Endoscopic Biopsy Specimens. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1378-1382.
48. MOHAMMED IA, STREUTKER CJ, RIDDELL RH. Utilization of Cytoqueratins 7 and 20 does not Differentiate Between Barrett's Esophagus and Gastric Cardiac Intestinal Metaplasia. *Mod Pathol* 2002;15:611-616.
49. GLICKMAN JN, WANG H, DAS K, GOYAL RK, SPECHLER SJ, ANTONIOLI D, ODZE RD. Phenotype of Barrett's Esophagus and Intestinal Metaplasia of the Distal Esophagus and

Gastroesophageal Junction: An Immunohistochemical Study of Cytokeratins 7 and 20, Das-1 and 45MI. *Am J Surg Pathol* 2001;25(1):87-94.

50. DEMEESTER SR, WICKRAMASINGHE KS, LORD RV, FRIEDMAN A, BALAJI NS, CHANDRASOMA PT, HAGEN JA, PETERS JH, DEMEESTER TR. Cytokeratin and DAS-1 Immunostaining Reveal Similarities Among Cardiac Mucosa, CIM, and Barrett's Esophagus. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2514-2523.

51. KURTKAYA-YAPICIER O, GENCOSMANOGLU R, AVSAR E, BAKIRCI N, TOZUN N, SAV A. The Utility of Cytokeratins 7 and 20 (CK7/CK20) Immunohistochemistry in the Distinction of Short-segment Barrett Esophagus from Gastric Intestinal Metaplasia: Is it Reliable? *BMC Clin Pathol* 2003;3:5.

52. SCHILLING D, SPIETHOFF A, ROSENBAUM A, HARTMANN D, EICKHOFF A, JAKOBS R, WEICKERT U, REBE M, BOHRER MH, RIEMANN JF. Does Cytokeratins 7/20 Immunoreactivity Help to Distinguish Barrett's Esophagus from Gastric Intestinal Metaplasia? Results of a Prospective Study of 75 Patients. *Pathol Res Pract* 2005;200(11-12):801-805 (Abstract).

53. GULMANN C, AL SHAQAQI O, GRACE A, LEADER M, PATCHETT S, BUTLER D, KAY E. Cytokeratins 7/20 and MUC1, 2, 5AC, and 6 Expression Patterns in Barrett's Esophagus and Intestinal Metaplasia of the Stomach. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004;12:142-147.

54. PIAZUELO MB, HAQUE S, DELGADO A, DU JX, RODRIGUEZ F, CORREA P. Phenotypic Differences between Esophageal and Gastric Intestinal Metaplasia. *Mod Pathol* 2004;17:62-74

55. GLICKMAN JN, ORMSBY AH, GRAMLICH TL, GOLDBLUM JR, ODZE RD. Interinstitutional variability and effect of tissue fixative on the interpretation of a Barrett cytokeratin 7/20 immunoreactivity pattern in Barrett esophagus. *Hum Pathol* 2005;36:58-65.

56. CHAVES P, CARDOSO P, DE ALMEIDA JCM, PEREIRA AD, LEITÃO CN, SOARES J. Non-goblet cell population of Barrett's esophagus: an immunohistochemical demonstration of intestinal differentiation. *Hum Pathol* 1999;30:1291-5.

57. MUELLER J, WERNER M, STOLTE M. Barrett's esophagus: histopathologic definitions and diagnostic criteria. *World J Surg* 2004;28:148-54.
58. SHARMA P, McQUAID K, DENT J, FENNERTY MB, SAMPLINER R, SPECHLER S, CAMERON A, CORLEY D, FALK G, GOLDBLUM J, HUNTER J, JANKOWSKI J, LUNDELL L, REID B, SHAHEEN NJ, SONNENBERG A, WANG K, WEINSTEIN W. A critical review of the diagnosis and management of Barrett's esophagus: the AGA Chicago Workshop. *Gastroenterology* 2004;127:310-30.
59. OKSANEN A, SANKILA A, VON BOGUSLAWSKI K, SIPPONEN P, RAUTELIN H. Inflammation and cytokeratin 7/20 staining of cardiac mucosa in young patients with and without *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Pathol* 2005;58:376-81
60. DE HERTOOGH G, VAN EYKEN P, ECTORS N, GEBOES K. On the origin of cardiac mucosa: A histological and immunohistochemical study of cytokeratin expression patterns in the developing esophagogastric junction region and stomach. *World J Gastroenterol* 2005;11(29):4490-6
61. CHANDRASOMA P. Controversies of the cardiac mucosa and Barrett's oesophagus. *Histopathology* 2005;46:361-73
62. ODZE RD. Unraveling the mystery of the gastroesophageal junction: a pathologist's perspective. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1853-67
63. CHANDRASOMA PT, DER R, MA Y, PETERS J, DEMEESTER T. Histologic classification of patients based on mapping biopsies of the gastroesophageal junction. *Am J Surg Pathol* 2003;27(7):929-36.
64. CHANDRASOMA PT, DER R, MA Y, DALTON P, TAIRA M. Histology of the gastroesophageal junction: an autopsy study. *Am J Surg Pathol* 2000;24(3):402-9.
65. CHANDRASOMA PT, LOKUHETTY DM, DEMEESTER TR, BREMNER CG, PETERS JH, OBERG S, GROSHEN S. Definitions of histopathologic changes in gastroesophageal reflux disease. *Am J Surg Pathol* 2000; 24(3):344-51.

66. GLICKMAN JN, SHAHSAFAEI A, ODZE RD. Mucin core peptide expression can help differentiate Barrett's esophagus from intestinal metaplasia of the stomach. *Am J Surg Pathol* 2003;27(10):1357-65.
67. PHILLIPS RW, FRIERSON HF, MOSKALUK CA. Cdx2 as a marker of epithelial intestinal differentiation in the esophagus. *Am J Surg Pathol* 2003;27(11):1442-7.
68. MOONS LMG, BAX DA, KUIPERS EJ, VAN DEKKEN H, HARINGSMA J, VAN VLIET AHM, SIERSEMA PD, KUSTERS JG. The homeodomain protein Cdx2 is a early marker of Barrett's oesophagus. *J Clin Pathol* 2004;57:1063-68.
69. GROISMAN GM, AMAR M, MEIR A. Expression of the intestinal marker Cdx2 in the columnar-lined esophagus with and without intestinal (Barrett's) metaplasia. *Mod Pathol* 2004;17(10):1282-8 (Abstract).
70. STEININGER H, PFOFE DA, MULLER H, HAAG-SUNJIC G, FRATIANU V. Expression of CDX2 and MUC2 in Barrett's mucosa. *Pathol Res Pract* 2005;201(8-9):573-7 (Abstract).

ARTIGO CIENTÍFICO (VERSÃO EM PORTUGUÊS)

Imunoreatividade das Citoqueratinas 7 e 20 nas Células Caliciformes e Células Colunares Azuis em Pacientes com Suspeita Endoscópica de Esôfago de Barrett

J C Cantarelli Jr,^{1,3} R B Fagundes,^{1,3} L Meurer,^{1,2} M P Rocha,⁴ A Nicola² & C D Kruei¹

¹Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e ²Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

³Serviço de Gastroenterologia e ⁴Serviço de Patologia do Hospital Universitário. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Fonte financiadora: Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) – Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Endereço para correspondência: L Meurer, Serviço de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Bairro Rio Branco, Porto Alegre, RS, CEP: 97105-900.
e-mail: lmeurer@hcpa.ufrgs.br

Palavras-chave: esôfago de Barrett, citoqueratinas, metaplasia intestinal, alcian blue.

Abreviaturas: EB, esôfago de Barrett; CK, citoqueratinas; HE, hematoxilina/eosina; AB, alcian blue;

ABSTRACT

Objetivos: O diagnóstico histológico do esôfago de Barrett (EB) é estabelecido na presença das células caliciformes à coloração de hematoxilina/eosina (HE) e alcian-blue pH 2,5 (AB). Entretanto, um outro tipo de células frequentemente apresenta positividade ao AB e são denominadas células colunares azuis. Alguns autores acreditam que estas células são intermediárias entre células colunares e células caliciformes, porém não são consideradas como diagnósticas de esôfago de Barrett. As citoqueratinas 7 (CK7) e 20 (CK20) têm sido estudadas na metaplasia intestinal da junção esôfago-gástrica. Porém, até onde é do nosso conhecimento, as suas expressões nas células colunares azuis ainda não foram caracterizadas. Portanto, o objetivo deste estudo é investigar a expressão imunohistoquímica da CK7 e CK20 nas células caliciformes e células colunares azuis.

Métodos e Resultados: Foram incluídas 86 biópsias de pacientes com suspeita de Esôfago de Barrett à endoscopia. Células caliciformes estavam presentes em 76 casos e células colunares azuis em 50 casos. Estes materiais foram submetidos à técnica de imunohistoquímica para CK7 e CK20. O resultado da reatividade de cada citoqueratina demonstrou que a CK7 é expressa de forma semelhante nos dois tipos de células ($p=0,25$), enquanto que a CK20 apresentou expressão variada ($p<0,001$). Porém, na expressão conjunta, o padrão CK7(+)/CK20(+) foi o mais freqüente em ambas células ($p=0,19$).

Conclusões: De acordo com a reatividade da CK7 e CK20, células colunares azuis e células caliciformes apresentam algumas características imunohistoquímicas semelhantes, sugerindo que a célula colunar azul pode representar um estágio de transição para célula caliciforme. Porém, são necessários estudos comparativos com outros marcadores relacionados à diferenciação celular do epitélio metaplásico do EB para validar esta hipótese.

INTRODUÇÃO

O Esôfago de Barrett (EB) é considerado um fator de risco para adenocarcinoma esofágico, cuja incidência no mundo ocidental tem aumentado rapidamente nas últimas décadas.¹⁻⁵ Histologicamente, o EB representa uma forma incompleta de metaplasia intestinal, caracterizada pela presença de células caliciformes (*goblet cells*) à coloração com hematoxilina/eosina (HE) e que contém mucinas ácidas, as quais são facilmente detectadas com a utilização de alcian blue pH 2,5 (AB).^{6,7} Uma vez confirmado o diagnóstico, os pacientes com EB devem ser arrolados em um programa de vigilância endoscópica para displasia e adenocarcinoma.^{1-3,8}

Entretanto, o diagnóstico histológico da metaplasia intestinal é bastante complexo, porque existem células na superfície do epitélio metaplásico que são tão comuns quanto as células caliciformes e apresentam um aspecto semelhante às células colunares gástricas quando coradas pela HE, mas, ao contrário destas, coram-se positivamente com AB.⁹⁻¹¹ Estas células são denominadas células colunares azuis (*columnar blue cells*) e podem representar um tipo transicional de células metaplásicas, intermediárias entre células colunares gástricas e células caliciformes.^{9,12} Devido a este pressuposto, as células colunares azuis têm gerado controvérsias no diagnóstico histológico do EB.^{7,13-15}

Estas controvérsias reforçam a importância de se definir a relação existente entre as células caliciformes e as células colunares azuis. É fundamental identificar se as células colunares azuis representam ou não um estágio “pré-caliciforme”, visto que a presença destas células AB-positivas pode superestimar ou subestimar o diagnóstico do EB, ocasionando inclusão desnecessária ou exclusão de pacientes em programas de vigilância endoscópica. O uso de um marcador que possa resolver estas incertezas seria extremamente importante. A expressão imunohistoquímica das citoqueratinas 7 (CK7) e 20 (CK20) tem sido estudada na metaplasia intestinal da junção esôfago-gástrica, porém sua reatividade nas células colunares azuis ainda não foi caracterizada.

As citoqueratinas constituem as subunidades I e II dos filamentos intermediários, que são um dos principais componentes do esqueleto celular. Todos os epitélios (simples e

complexos) podem ser classificados de acordo com a sua expressão de citoqueratinas. A CK7 normalmente não é expressa no epitélio do trato gastrointestinal, enquanto que a CK20 apresenta expressão no epitélio foveolar gástrico e no epitélio intestinal.¹⁶ Em relação à metaplasia intestinal da junção esôfago-gástrica, um estudo prévio de Ormsby et al¹⁷ sugeriu que padrões específicos de reatividade para CK7/CK20 apresentam valor discriminativo entre esôfago de Barrett e metaplasia intestinal da cárdia. Outros autores tentaram reproduzir estes padrões, obtendo resultados diversos.¹⁸⁻³¹ Nestes estudos, somente as células caliciformes foram levadas em consideração para a análise dos padrões de CK7/CK20. Porém, até o momento, a expressão destas citoqueratinas nas células colunares azuis ainda não foi caracterizada, assim como a possibilidade de que esta expressão seja similar a das células caliciformes. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a imunoreatividade da CK7 e CK20 nas células azuis e nas células caliciformes em pacientes com suspeita endoscópica de esôfago de Barrett.

MATERIAIS E MÉTODOS

SELEÇÃO DOS CASOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Uma revisão nos arquivos de laudos endoscópicos e anátomo-patológicos foi realizada, compreendendo os anos de 2002 e 2003. Lâminas coradas pela HE e AB, obtidas de pacientes com exame endoscópico sugestivo de esôfago de Barrett, foram selecionadas e revisadas para a identificação das células caliciformes e das células colunares azuis. A suspeita endoscópica do esôfago de Barrett foi definida pela visualização de epitélio colunar acima da junção esôfago-gástrica, com extensão maior ou menor que 3cm (esôfago de Barrett longo e curto, respectivamente). Células caliciformes foram definidas como células com bordos laterais distendidos e núcleo comprimido em sua base, localizadas na superfície epitelial, região foveolar e glândulas. As células colunares azuis foram definidas como células colunares semelhantes às células superficiais gástricas, cujo citoplasma cora-se positivamente ao AB, e localizadas apenas na superfície do epitélio.¹¹ Materiais adequados que apresentaram pelo menos dois segmentos de epitélio com no mínimo 5 células caliciformes, ou células

colunares azuis, ou ambas simultaneamente em uma mesma lâmina, mas em segmentos separados, foram incluídas no estudo e submetidas à técnica de imunohistoquímica para CK7 e CK20.

TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUIMICA

Em cada caso, um bloco de inclusão em parafina representativo foi selecionado e cortes foram feitos com espessura média de 4 micrômetros. As lâminas foram desparafinizadas e re-hidratadas. A inibição da peroxidase endógena foi feita com peróxido de hidrogênio a 5% em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em forno de microondas, com tampão citrato pH 6,0, em potência máxima, durante 21 minutos. Para o bloqueio das reações inespecíficas, foi utilizada solução de leite em pó desnatado a 5% com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Foram aplicados os anticorpos anti-citoqueratina 7 (clone OV-TL 12/30, Biogenex) e anti-citoqueratina 20 (clone K_s 20.8, Biogenex), ambos na diluição 1:100. A detecção dos anticorpos primários foi feita usando o complexo estreptavidina-biotina, tendo como cromógeno 3-3-diaminobenzidina-tetrahydrochloride (DAB). As lâminas foram contracoradas com hematoxilina. Controles positivos foram usados para cada um dos anticorpos (tecidos de mama para CK7 e de cólon para CK20), enquanto que os controles negativos foram obtidos substituindo o anticorpo primário por solução tampão.

AVALIAÇÃO DA IMUNOREATIVIDADE PARA CITOQUERATINAS

A avaliação da CK7 e CK20 foi realizada através da imunoreatividade (positiva ou negativa) da membrana e do citoplasma das células em estudo. A presença de coloração tipo inespecífica ou de fundo foi referida como negativa. Foram considerados positivos os casos que apresentaram mais de 10% de células coradas por campo microscópico de alta magnificação (400 aumentos). Nas áreas com células caliciformes, a reatividade foi registrada na superfície epitelial, região foveolar e glândulas, enquanto que nas áreas com células colunares azuis foi registrada apenas a reatividade do epitélio superficial. Em todos os casos, a reatividade das citoqueratinas nos diferentes segmentos celulares foi comparada simultaneamente com os achados do AB. Para comparar os padrões resultantes nas duas células, somente as respectivas reatividades do epitélio superficial foram utilizadas. Estes

padrões superficiais foram denominados como tipo Barrett [CK7(+)/CK20(+)] e os demais padrões como tipo não-Barrett [CK7(+)/CK20(-), CK7(-)/CK20(+), CK7(-)/CK20(-)]. As lâminas foram examinadas por dois patologistas de forma independente (LM e MPR). Os casos discordantes ou duvidosos foram solucionados através de uma avaliação de consenso entre os dois observadores. Nenhum dos observadores teve conhecimento dos laudos endoscópicos e dos diagnósticos anatomo-patológicos dos casos selecionados.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística kappa (κ) foi calculada para avaliar a concordância interobservador na identificação histológica das células estudadas e na interpretação da imunohistoquímica. A concordância interobservador foi classificada conforme os seguintes parâmetros: fraca (<0.20), regular (0.21 – 0.40), moderada (0.41 – 0.60), boa (0.61 – 0.80) e muito boa (>0.80).³² O teste exato de Fischer, a um nível de significância de 5%, foi utilizado para comparar as proporções de células caliciformes e células colunares azuis coradas pela CK7 e CK20.

RESULTADOS

Foram incluídas no estudo um total de 86 biópsias. 59 biópsias (68.6%) foram derivadas de pacientes com suspeita endoscópica de EB longo e 27 biópsias (31.4%) de EB curto. As freqüências das células identificadas na análise histológica e sua relação com os achados endoscópicos estão sumarizadas na tabela 1. A avaliação independente demonstrou uma concordância interobservador (*kappa*) de 0.75. Este valor foi ocasionado pela discordância entre os observadores na identificação das células colunares azuis em 13 casos. Não houve discordância quanto ao reconhecimento das células caliciformes. Onze casos apresentaram apenas células colunares azuis, predominando naqueles com suspeita de EB curto ($p=0,003$). Em 36 casos, somente células caliciformes foram observadas. Nos 39 casos restantes, havia áreas com células colunares azuis e áreas com células caliciformes simultaneamente. No total, células caliciformes estavam presentes em 75 biópsias (87.2%), enquanto que as células colunares azuis foram evidenciadas em 50 biópsias (58.1%).

Os resultados da avaliação da CK7 no total de células calciformes mostraram que o padrão positivo superficial e profundo ocorreu em 53 casos (70,6%), enquanto que 5 casos (6,7%) apresentaram o padrão positivo superficial, e outros 17 casos (22,7%) foram negativos. Na expressão para CK20, o padrão positivo superficial ocorreu em 66 casos (88%), 1 caso (1,3%) apresentou o padrão positivo superficial e profundo (devido à presença de metaplasia intestinal completa) e 8 casos (10,7%) foram negativos (Figura 1).

Os achados imunohistoquímicos para CK7 no total de células colunares azuis mostraram que padrão positivo superficial ocorreu em 43 casos (86%) e 7 (14%) foram negativos. Na reatividade para CK20, 31 casos (62%) apresentaram o padrão positivo superficial e 19 (38%) foram negativos (Figuras 1 e 2).

O *kappa* resultante da análise independente da CK7 nas células calciformes foi 0.85, e 0.90 nas células colunares azuis, enquanto que na interpretação da CK20, a concordância foi de 0.93 nas células calciformes, e 0.74 nas células colunares azuis.

Na comparação das reatividades das citoqueratinas, os casos positivos “superficial” e “superficial e profundo” observados nas células calciformes foram reunidos em um único grupo, e somente as reatividades superficiais em ambas as células foram usadas na análise. Os resultados finais desta redistribuição estão registrados na tabela 2. Nós observamos que nas 36 biópsias com apenas células calciformes, 23 (63,9%) apresentaram positividade para CK7, e 33 (91,7%) foram positivos para CK20. Nas 11 biópsias com somente células colunares azuis, 10 (90,9%) foram positivas para CK7 e 6 (54,5%) para CK20. Comparando as proporções resultantes nos casos com somente células calciformes ou células colunares azuis, houve diferença estatística apenas para a CK20 ($p=0,01$). Em relação aos 39 casos com ambas as células em uma mesma biópsia, a positividade da CK7 e CK20 foi de 89,7% e 87,2% nas células calciformes e de 84,6% e 64,1% nas células colunares azuis. Do mesmo modo que a comparação anterior, a diferença estatística entre as células calciformes e células colunares azuis ocorreu somente na positividade para CK20 ($p=0,03$). Na soma total dos casos com células calciformes e células colunares azuis, não houve diferença estatística na reatividade para CK7 entre os dois tipos de células ($p=0,25$), enquanto que uma diferença muito significativa foi demonstrada na reatividade para CK20 ($p<0,001$).

Os padrões resultantes da associação das reatividades da CK7 e CK20 no epitélio superficial são demonstrados na tabela 3. O cálculo do *kappa* durante a análise independente resultou em uma concordância de 0.83 nos padrões das células caliciformes, e de 0.76 naqueles das células colunares azuis. Entre os casos com somente células caliciformes ou células colunares azuis, diferenças estatísticas ocorreram nos padrões CK7(+)/CK20(-) e CK7(-)/CK20(+) ($p=0.02$ e $p=0.04$), mas nenhuma diferença foi observada nos casos que apresentavam as duas células simultaneamente. Na soma final dos diferentes padrões em ambas as células, diferença estatística foi identificada somente quanto aos padrões CK7(+)/CK20(-) e CK7(-)/CK20(+) ($p= 0.003$ e $p= 0.02$, respectivamente).

DISCUSSÃO

O diagnóstico do EB é sugerido através da identificação de epitélio colunar na porção distal do esôfago durante o exame endoscópico, e confirmado quando células caliciformes são visualizadas em biópsias coradas com HE e AB.^{6,7} Porém, células colunares situadas na superfície epitelial também podem apresentar positividade ao AB (células colunares azuis) e são um achado freqüente durante o exame histológico.^{9,11,12} Em um estudo topográfico de 9 espécimes de ressecção esofágica por displasia de alto grau ou carcinoma associados ao EB, Offner et al¹¹ demonstraram que estas células estavam presentes em 85,7% dos cortes histológicos e, em certas situações, foram mais prevalentes que as células caliciformes no epitélio superficial da junção esôfago-gástrica e do esôfago distal. Apesar disto, a presença destas células não é critério suficiente nem para estabelecer o diagnóstico de EB quando células caliciformes estão ausentes, nem para delinear uma população de risco para malignidade.^{10,14,15} Por outro lado, se for considerado que as células colunares azuis constituem um estágio pré-caliciforme, isto poderá trazer implicações no diagnóstico e manejo do EB. Por essa razão, o uso de marcadores que reforcem esta hipótese pode ter uma fundamental importância.

As citoqueratinas compreendem 20 proteínas estruturais encontradas no citoesqueleto das células epiteliais. A expressão destas citoqueratinas depende do tipo, localização e diferenciação do epitélio. A CK7, sendo um marcador de diferenciação ductal, não é expressa

no epitélio normal do trato digestivo, enquanto que a expressão da CK20, um marcador de diferenciação intestinal, está limitada ao epitélio intestinal e epitélio foveolar gástrico superficial.^{17,28} Estas citoqueratinas têm sido objeto de vários estudos em pacientes com EB. A imunoreatividade da CK7/CK20 em metaplasia intestinal da junção esôfago-gástrica foi inicialmente descrita por Ormsby et al,¹⁷ o qual definiu padrões de expressão distintos para EB (padrão tipo Barrett) e metaplasia intestinal da cárdia (padrão tipo gástrico). O padrão designado como tipo Barrett apresentou CK7 com reatividade na superfície epitelial e glândulas superficiais e profundas, enquanto que a expressão da CK20 ficou restrita à superfície epitelial e glândulas superficiais. O padrão tipo gástrico demonstrou reatividade ausente ou irregular para CK7 e expressão da CK20 ocorreu no epitélio superficial e glândulas superficiais e profundas. Neste estudo, o padrão tipo Barrett esteve presente em 94% dos espécimes de ressecção esofágica e em 100% dos espécimes de biópsias originados de pacientes com EB longo. O padrão tipo gástrico foi demonstrado em todos os espécimes de biópsias da cárdia e de ressecção gástrica. Alguns estudos subseqüentes conseguiram reproduzir estes achados.^{18,19,29,30} Entretanto, outros autores apresentaram resultados discordantes e concluíram que estes padrões não são úteis para diferenciar EB de metaplasia intestinal da cárdia.²⁰⁻²⁸ Apesar das controvérsias, estes estudos produziram alguns desfechos que merecem ser considerados. Shearer et al³⁰ mencionou que padrões similares de CK7/CK20 foram frequentemente observados em áreas adjacentes onde células caliciformes estavam ausentes, enquanto que no estudo de Ormsby et al,¹⁷ somente áreas com células caliciformes foram avaliadas. Mohammed et al²¹ identificaram o padrão tipo Barrett em 55% das biópsias em mucosa cárdica normal ou inflamada e sem evidência de metaplasia intestinal. Glickman et al²² notaram que os imunofenótipos do epitélio mucinoso tipo cárdico, em pacientes com EB longo, EB curto e em junção esôfago-gástrica de aspecto normal, são similares para Das-1 e CK7/CK20, porém distintos daqueles da mucosa do antro gástrico. DeMeester et al²³ observaram que a mucosa da cárdia apresentou o padrão tipo Barrett em 85% dos casos. Em outro estudo de Ormsby et al,²⁹ foi observado que áreas de mucosa colunar não-especializada apresentaram positividade para CK7 em 22% dos casos. Da mesma forma, Jovanovic et al¹⁸ perceberam que o epitélio cárdico não-intestinalizado expressou forte positividade para CK7, enquanto que na mucosa do corpo e antro gástrico, a expressão foi totalmente negativa.

Estes dados tornam evidente que padrões similares de CK7/CK20 são comumente observados na mucosa colunar da junção esôfago-gástrica quando células caliciformes estão ausentes. Uma explicação para isto é que possivelmente estas áreas estejam em transformação para um fenótipo intestinal.^{18,30,33} Além disto, histologicamente, o EB é constituído não somente por células caliciformes, mas também por células colunares azuis, as quais podem corresponder a células caliciformes imaturas (pré-caliciformes) e células colunares AB-negativas.³⁴ Da mesma forma que o EB, o epitélio superficial da cárdia também pode apresentar células colunares com positividade ao AB.^{11,13} Partindo deste princípio, é presumível que as células colunares azuis possuam uma reatividade positiva para citoqueratinas em áreas sem células caliciformes. Até o momento, nenhum estudo caracterizou especificamente a reatividade da CK7/CK20 nas células colunares azuis em EB. Por isso, este estudo avaliou esta reatividade e comparou com a expressão nas células caliciformes.

Ao avaliar separadamente as reatividades de cada citoqueratina, nós observamos que, nas células caliciformes, o padrão predominante de expressão para CK7 foi o positivo superficial e profundo, enquanto que para a CK20 foi o padrão positivo superficial. Estes achados estão de acordo com Ormsby et al,¹⁷ apesar de serem menores as proporções encontradas no nosso estudo (Figura 1). Nas células colunares azuis, nós avaliamos somente a reatividade do epitélio superficial, devido ao fato que é nesta área onde as células colunares azuis são mais abundantes.¹¹ Nestes casos, a positividade superficial ocorreu em 86% para CK7 e em 62% para CK20 (Figura 2). Acreditamos que as proporções menores nos casos positivos do nosso estudo podem ser justificadas pelas diferenças na técnica de imunohistoquímica, principalmente por termos utilizado as citoqueratinas em uma diluição maior em comparação a outros estudos, o que determina uma menor intensidade da coloração. Outra possível explicação para esta variabilidade é que, em alguns casos, o epitélio apresentou uma coloração fraca e irregular, sem uma adequada marcação do citoplasma e da membrana das células em questão, e por isso foram consideradas negativas.

Quando foram comparadas as reatividades superficiais das citoqueratinas nas células caliciformes e células colunares azuis, não verificamos diferença estatística em relação à reatividade para CK7, mas sim na expressão para CK20. Porém, no momento que analisamos a expressão conjunta das citoqueratinas, foi observada diferença estatística nos padrões

CK7(+)/CK20(-) e CK7(-)/CK20(+). O padrão CK7(+)/CK20(+), o qual seria um equivalente superficial do padrão tipo Barrett descrito por Ormsby et al,¹⁷ não apresentou diferença estatística entre os dois tipos de células ($p=0,25$), mesmo com a menor reatividade da CK20 observada nas células colunares azuis (Figura 1). Estes achados ocorreram de maneira similar tanto nos casos com somente células caliciformes ou somente células colunares azuis, quanto naqueles casos em que ambas células estavam presentes na mesma lâmina.

Outros imunomarcadores têm sido estudados na metaplasia intestinal do EB, como a expressão de mucinas e de Cdx2. Mucinas são proteínas glicosiladas produzidas por células epiteliais e constituem o principal componente da camada de muco do trato gastrointestinal.²⁷ Em casos com EB, Glickman et al³⁵ demonstrou que expressões similares de MUC1, MUC2 e MUC5AC foram observadas nas células caliciformes e células colunares não-caliciformes, achado também descrito por Piazuolo et al.²⁷ Porém, em ambos os estudos, nenhuma referência foi feita quanto aos resultados do AB nestas células colunares, tornando difícil avaliar a reatividade das mucinas nas células colunares azuis. Cdx2 representa uma proteína essencial na diferenciação precoce e manutenção do epitélio intestinal, cuja expressão ocorre ao longo de todo o intestino delgado e intestino grosso, tendo como limite proximal a junção gastroduodenal. Phillips et al³⁶ utilizou técnica de imunohistoquímica para detectar Cdx2 no epitélio metaplásico do esôfago e comparou os resultados com a coloração por PAS-AB. Em todos os casos de EB o Cdx2 foi positivo, e mucinas ácidas estavam presentes nas células caliciformes e células colunares não-caliciformes. Nos casos com epitélio tipo juncional (cárdico), mucinas ácidas estavam presentes nas células colunares não-caliciformes em 85% dos casos Cdx2 positivos e em 74% dos casos Cdx2 negativos. Em outro estudo, Groismann et al³⁷ observou que todos os casos com metaplasia intestinal foram positivos para Cdx2, tanto nas células caliciformes quanto nas células colunares adjacentes. Porém, nos casos sem metaplasia intestinal, reatividade focal para Cdx2 foi vista em 38% das células colunares, e em 24% dos casos, faixas de células colunares azuis estavam presentes e foram Cdx2 negativas. Por sua vez, Steininger et al³⁸ também detectou positividade para Cdx2 em células caliciformes e células colunares nos casos inequívocos de EB. Porém, os autores mencionaram que achados do AB foram inconsistentes para indicar uma diferenciação intestinal precoce de maneira confiável.

Estes estudos sugerem que a expressão do Cdx2 nas células caliciformes e não-caliciformes é similar nos casos de EB, mas diferente naqueles casos que apresentam somente células colunares, e concluem que a positividade do AB em células colunares pode não ser indicativa de metaplasia intestinal. Entretanto, o nosso estudo parece indicar que as duas células apresentam algumas características imunohistoquímicas que são semelhantes, seja em casos de EB ou casos sem células caliciformes, e fornecem apoio à hipótese de que a célula colunar azul pode representar um estágio intermediário entre célula colunar e célula caliciforme.

A avaliação imunohistoquímica para CK7 e CK20 tem sido objeto de vários estudos, que procuram determinar padrões de expressão distintivos entre metaplasia intestinal do EB e metaplasia intestinal da cárdia. O presente estudo utilizou apenas casos suspeitos de EB à endoscopia digestiva alta, e tentou caracterizar a reatividade superficial das CK7 e CK20 nas células caliciformes e células colunares azuis de maneira individualizada. Não verificamos diferenças na expressão para CK7 e, embora os resultados na expressão para CK20 tivessem apresentado diferenças, isto parece não ter exercido influência no resultado da análise conjunta, onde o padrão superficial tipo Barrett CK7(+)/CK20(+) foi o mais freqüente nas duas células. Estes dados sugerem que células caliciformes e células colunares azuis possuem algumas semelhanças na expressão destas citoqueratinas. Mucinas e Cdx2 são marcadores que parecem ter um futuro promissor na avaliação do epitélio metaplásico do EB. Uma comparação entre as reatividades de vários imunomarcadores, correlacionadas com os achados do AB, pode acrescentar informações relevantes a respeito das controvérsias ainda existentes no diagnóstico histológico do EB.

Em resumo, este estudo demonstra que as células caliciformes e células colunares azuis apresentam algumas características imunohistoquímicas semelhantes para CK7/CK20 em pacientes com suspeita endoscópica de EB. Este dado sugere a idéia de que a célula colunar azul pode ser um estágio de transição para célula caliciforme. Porém, mais estudos comparativos são necessários para avaliar a aplicabilidade dos seus resultados quanto à diferenciação celular do epitélio metaplásico do EB.

REFERÊNCIAS

1. Falk GW. Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002; 122:1569-1591.
2. Spechler SJ. Barrett's esophagus. *N Engl J Medicine* 2002; 346: 836-842.
3. Sampliner RE and The Practice Parameters Committee Of The American College Of Gastroenterology. Update guidelines for the diagnosis, surveillance and therapy of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:1888-1895.
4. Reynolds JC, Rahimi P, Hirschi D. Barrett's esophagus: clinical characteristics. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:441-460
5. Ertan A, Younes M. Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci* 2000;45:1670-1673
6. Carton E, Caldwell MTP, McDonald G, Rama D, Tanner WA, Reynolds JV. Specialized intestinal metaplasia in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *Brit J Surg* 2000, 87:116-121.
7. Goldblum JR. The significance and etiology of intestinal metaplasia of esophagogastric junction. *Ann Diagn Pathol* 2002;6:67-73.
8. DeMeester SR, DeMeester TR. Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus. Fifty years of controversy. *Ann Surg* 2000;231:303-321.
9. Guindi M, Riddell RH. Histology of Barrett's esophagus and dysplasia. *Gastrointest Endoscopy Clin N Am* 2003; 13:349-368.
10. Haggitt RC. Pathology of Barrett's esophagus. *J Gastrointest Surg* 2000;4:117-8.
11. Offner FA, Lewin KJ, Weinstein WM. Metaplastic columnar cells in Barrett's esophagus: a common and neglected cell type. *Hum Pathol* 1996; 27:885-889.
12. Weinstein WM, Ippoliti AF. The diagnosis of Barrett's esophagus: goblets, goblets, goblets. *Gastrointest Endosc* 1996; 44:91-5.
13. Chen YY, Wang HH, Antonioli DA *et al.* Significance of acid-mucin-positive nongoblet columnar cells in the distal esophagus and gastroesophageal junction. *Hum Pathol* 1999;

30:1488-1495.

14. Fléjou JF. Barrett's esophagus: from metaplasia to dysplasia and cancer. *Gut* 2005;54 (Suppl I):i6-i12.

15. Faller G, Borschard F, Ell C *et al.* Histopathological diagnosis of Barrett's mucosa and associated neoplasias: results of a consensus conference of the Working Group for Gastroenterological Pathology of the German Society for Pathology on 22 september 2001 in Erlangen. *Virchows Arch* 2003; 443:597-601.

16. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002;40:403-439.

17. Ormsby AH, Goldblum JR, Rice TW *et al.* Cytokeratin subsets can reliably distinguish Barrett's esophagus from intestinal metaplasia of the stomach. *Hum Pathol* 1999;30:288-294.

18. Jovanovic I, Tzardi M, Mouzas IA *et al.* Changing patterns of cytokeratins 7 and 20 expression from normal epithelium to intestinal metaplasia of the gastric mucosa and gastroesophageal junction. *Histol Histopathol* 2002;17:445-454.

19. Sarbia M, Donner A, Franke C, Gabbert HE. Distinction between intestinal metaplasia in the cardia and Barrett's esophagus: the role of histology and immunohistochemistry. *Hum Pathol* 2004;35(3):371-376.

20. EL-Zimaity HMT, Graham DY. Cytokeratin subsets for distinguishing Barrett's esophagus from intestinal metaplasia in the cardia using endoscopic biopsy specimens. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1378-1382.

21. Mohammed IA, Streutker CJ, Riddell RH. Utilization of cytokeratins 7 and 20 does not differentiate between Barrett's esophagus and gastric cardiac intestinal metaplasia. *Mod Pathol* 2002;15:611-616.

22. Glickman JN, Wang H, Das K *et al.* Phenotype of Barrett's esophagus and intestinal metaplasia of the distal esophagus and gastroesophageal junction: an immunohistochemical study of cytokeratins 7 and 20, Das-1 and 45MI. *Am J Surg Pathol* 2001;25(1):87-94.

23. DeMeester SR, Wickramasinghe KS, Lord RV *et al.* Cytokeratin and DAS-1 immunostaining reveal similarities among cardiac mucosa, CIM, and Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2514-2523.
24. Kurtkaya-Yapicier O, Gencosmanoglu R, Avsar E, Bakirci N, Tozun N, Sav A. The utility of cytokeratins 7 and 20 (CK7/CK20) immunohistochemistry in the distinction of short-segment Barrett esophagus from gastric intestinal metaplasia: is it reliable? *BMC Clin Pathol* 2003;3:5.
25. Schilling D, Spiethoff A, Rosenbaum A *et al.* Does cytokeratins 7/20 immunoreactivity help to distinguish Barrett's esophagus from gastric intestinal metaplasia? Results of a prospective study of 75 patients. *Pathol Res Pract* 2005;200(11-12):801-805 (Abstract).
26. Gulmann C, Al Shaqqaqi O, Grace A *et al.* Cytokeratins 7/20 and MUC1, 2, 5AC, and 6 Expression patterns in Barrett's esophagus and intestinal metaplasia of the stomach. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004;12:142-147.
27. Piazuolo MB, Haque S, Delgado A, Du JX, Rodriguez F, Correa P. Phenotypic differences between esophageal and gastric intestinal metaplasia. *Mod Pathol* 2004;17:62-74
28. Liu GS, Gong J, Cheng P, Zhang J, Chang Y, Qiang L. Distinction between short-segment Barrett's esophageal and cardiac intestinal metaplasia. *World J Gastroenterol* 2005;11(40):6360-6365
29. Ormsby AH, Vaezi MF, Richter JE, Goldblum JR, Rice TW, Falk GW, Gramlich TL. Cytokeratin immunoreactivity patterns in the diagnosis of short-segment Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2000;119:683-690.
30. Shearer C, Going J, Nellson L, Mackay C, Stuart RC. Cytokeratin 7 and 20 expression in intestinal metaplasia of the distal oesophagus: relationship to gastroesophageal reflux disease. *Histopathology* 2005; 47:268-275.
31. Flucke U, Steinborn E, Dries V *et al.* E. Immunoreactivity of cytokeratins (CK7, CK20) and mucin peptide core antigens (MUC1, MUC2, MUC5AC) in adenocarcinomas, normal and metaplastic tissues of distal esophagus, oesophago-gastric junction and proximal stomach. *Histopathology* 2003;43:127-134.

32. Glickman JN, Ormsby AH, Gramlich TL, Goldblum JR, Odze RD. Interinstitutional variability and effect of tissue fixative on the interpretation of a Barrett cytokeratin 7/20 immunoreactivity pattern in Barrett esophagus. *Hum Pathol* 2005;36:58-65.
33. Chaves P, Cardoso P, De Almeida JCM, Pereira AD, Leitão CN, Soares J. Non-goblet cell population of Barrett's esophagus: an immunohistochemical demonstration of intestinal differentiation. *Hum Pathol* 1999;30:1291-5.
34. Mueller J, Werner M, Stolte M. Barrett's esophagus: histopathologic definitions and diagnostic criteria. *World J Surg* 2004;28:148-154.
35. Glickman JN, Shahsafaie A, Odze RD. Mucin core peptide expression can help differentiate Barrett's esophagus from intestinal metaplasia of the stomach. *Am J Surg Pathol* 2003;27(10):1357-65.
36. Phillips RW, Frierson HF, Moskaluk CA. Cdx2 as a marker of epithelial intestinal differentiation in the esophagus. *Am J Surg Pathol* 2003;27(11):1442-7.
37. Groisman GM, Amar M, Meir A. Expression of the intestinal marker Cdx2 in the columnar-lined esophagus with and without intestinal (Barrett's) metaplasia. *Mod Pathol* 2004;17(10):1282-8 (Abstract).
38. Steininger H, Pfofe DA, Muller H, Haag-Sunjic G, Fratianu V. Expression of CDX2 and MUC2 in Barrett's mucosa. *Pathol Res Pract* 2005;201(8-9):573-7 (Abstract).

FIGURAS

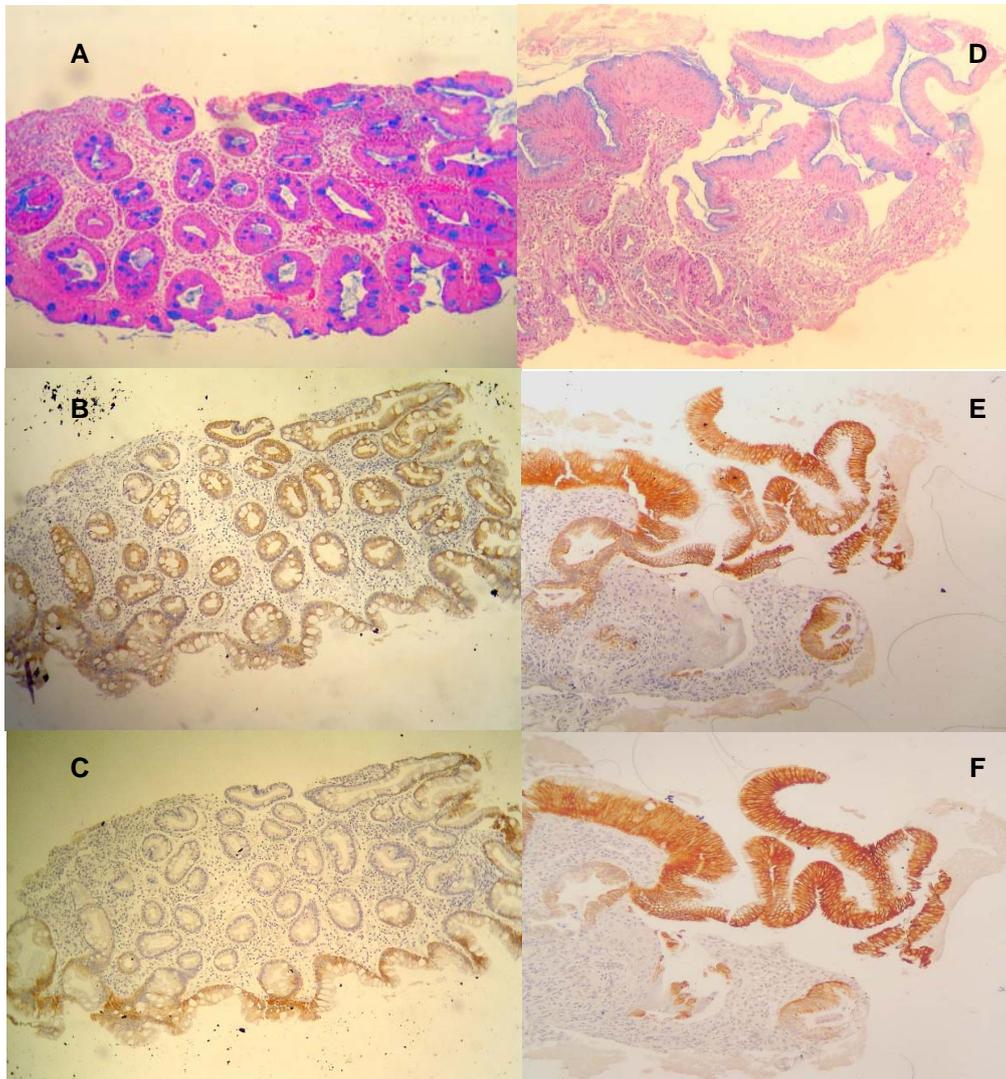


Figura 1. A,B,C: Alcian blue e reatividades positivas da CK7 (superficial e profunda) e da CK20 (superficial) nas células caliciformes. D,E,F: Alcian blue e reatividade positiva superficial nas células colunares azuis.

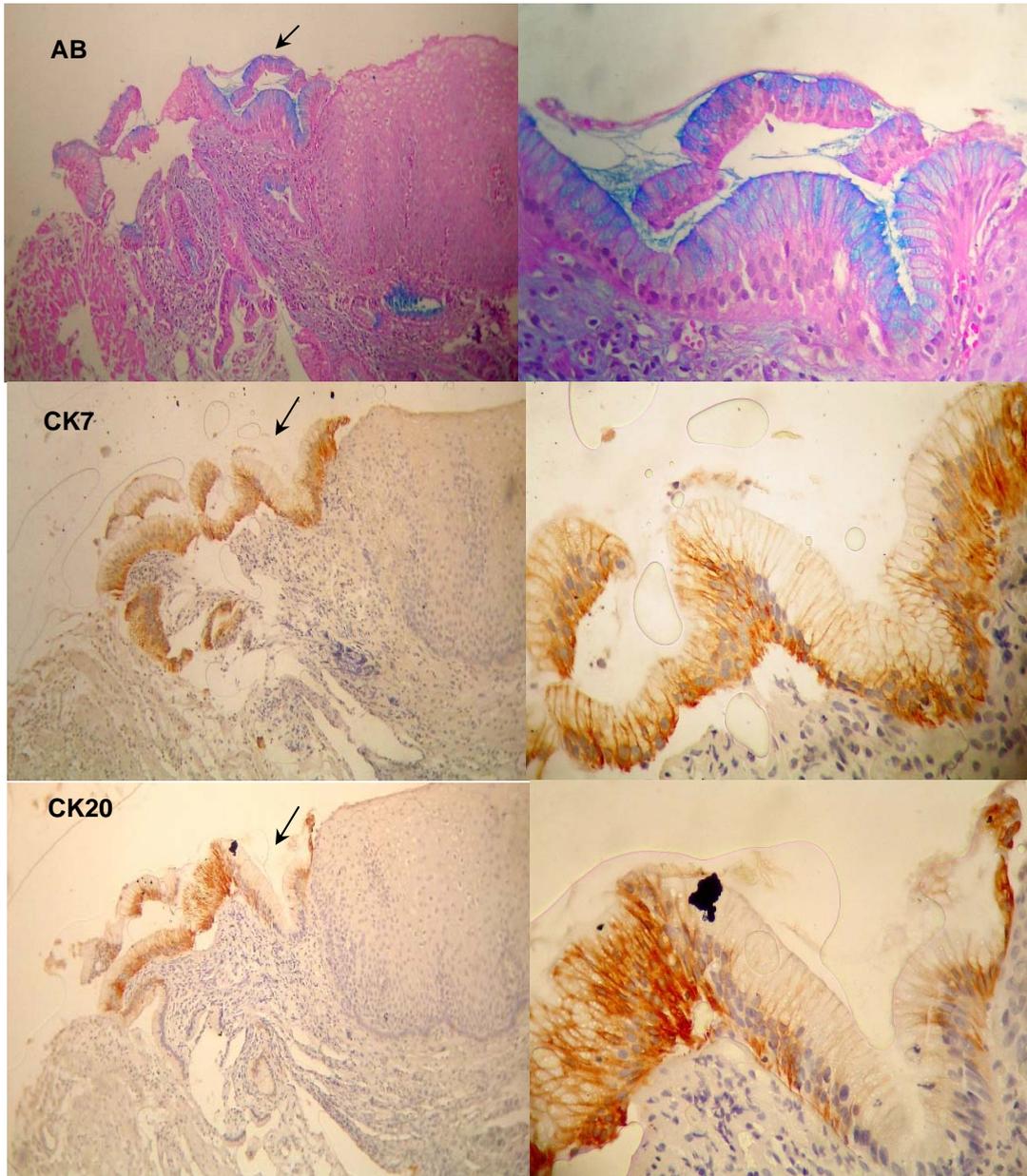


Figura 2. Alcian blue (AB) e reatividade positiva superficial da CK7 e CK20 em epitélio com células colunares azuis. As áreas indicadas pelas setas nas imagens à esquerda são demonstradas à direita em maior aumento (400x).

TABELAS

| | CC | CA | CC/CA | TOTAL |
|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| EBL | 27 (31,4%) | 3* (3,5%) | 29 (33,7%) | 59 (68,6%) |
| EBC | 9 (10,5%) | 8* (9,3%) | 10 (11,6%) | 27 (31,4%) |
| TOTAL | 36 (41,9%) | 11 (12,8%) | 39 (45,3%) | 86 |

Tabela 1. Frequências das células calciformes (CC), células colunares azuis (CA), ou ambas as células (CC/CA) em biópsias de pacientes com endoscopia sugestiva de esôfago de Barrett longo (EBL) e esôfago de Barrett curto (EBC). *p=0,003

| | n | CK7 | | CK20 | |
|-----------------|----|---------------|---------------|------------------|---------------|
| | | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |
| CC | 36 | 23 (63,9%) | 13 (36,1%) | 33* (91,7%) | 3 (8,3%) |
| CA | 11 | 10 (90,9%) | 1 (9,1%) | 6* (54,5%) | 5 (45,5%) |
| CC / CA | 39 | 35 (89,7%) | 4 (10,3%) | 34** (87,2%) | 5 (12,8%) |
| | | 33 (84,6%) | 6 (15,4%) | 25** (64,1%) | 14 (35,9%) |
| CC TOTAL | 75 | 58 (77,3%) | 17 (22,7%) | 67*** (89,3%) | 8 (10,7%) |
| CA TOTAL | 50 | 43 (86%) | 7 (14%) | 31*** (62%) | 19 (38%) |

Tabela 2. Reatividade das citoqueratinas 7 (CK7) e 20 (CK20) nos casos com células calciformes (CC), células colunares azuis (CA) ou ambas as células (CC/CA). *p=0.01; **p=0.03; ***p<0.001.

| | <i>n</i> | CK7 (+) CK20 (+) | CK7 (+) CK20 (-) | CK7 (-) CK20 (+) | CK7 (-) CK20 (-) |
|------------------------|----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| CC | 36 | 21 (58,3%) | 2* (5,6%) | 12** (33,3%) | 1 (2,8%) |
| CA | 11 | 6 (54,5%) | 4* (36,4%) | 0** (0%) | 1 (9,1%) |
| CC / CA | 39 | 30 (76,9%) | 5 (12,8%) | 4 (10,3%) | 0 (0%) |
| | | 22 (56,4%) | 11 (28,2%) | 3 (7,7%) | 3 (7,7%) |
| TOTAL CC | 75 | 51 (68,1%) | 7 [†] (9,3%) | 16 [‡] (21,3%) | 1 (1,3%) |
| TOTAL CA | 50 | 28 (56%) | 15 [†] (30%) | 3 [‡] (6%) | 4 (8%) |

Tabela 3. Co-expressão das citoqueratinas 7 (CK7) e 20 (CK20) nos casos com células caliciformes (CC), células colunares azuis (CA) ou ambas as células (CC/CA). *p=0.02; **p=0.04, [†]p=0.003; [‡]p=0,02.

ARTIGO CIENTÍFICO (VERSÃO EM INGLÊS)

Immunoreactivity of cytokeratins 7 and 20 in goblet cells and columnar blue cells in patients with endoscopic suspicion of Barrett's esophagus

J C Cantarelli Jr,^{1,3} R B Fagundes,^{1,3} L Meurer,^{1,2} M P Rocha,⁴ A Nicola² & C D Kruehl¹

¹Postgraduate program: Sciences in Gastroenterology and ²Department of Pathology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³Department of Gastroenterology and ⁴Department of Pathology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

Financial source: Fund of Incentive to the Research (FIPE) - Hospital of Clinics of Porto Alegre.

Address for correspondence: L Meurer, Serviço de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, rua Ramiro Barcelos, 2350, bairro Rio Branco, Porto Alegre, RS, CEP: 97105-900.
e-mail: lmeurer@hcpa.ufrgs.br

Keywords: Barrett's esophagus, cytokeratins, intestinal metaplasia, alcian blue.

Abbreviations: BE, Barrett's esophagus; CK, cytokeratins; HE, hematoxylin/eosin; AB, alcian blue.

ABSTRACT

Aims: The histological diagnosis of the Barrett's esophagus (BE) is established in the presence of the goblet cells to the hematoxylin/eosin(HE) and alcian-blue pH 2,5 (AB) staining. However, another type of cells frequently presents positivity to AB and they are denominated columnar blue cells. Some authors believe that these cells are intermediate between columnar cells and goblet cells, however, their presence is not considered as a diagnostic criterion for Barrett's esophagus. The cytokeratins 7 (CK7) and 20 (CK20) have been studied in the intestinal metaplasia of the esophagogastric junction. However, to the best of our knowledge, their expressions in the columnar blue cells have not been characterized yet. Therefore, the aim of this study is to investigate the immunohistochemical expression of CK7 and CK20 in the goblet cells and columnar blue cells.

Methods and Results: 86 biopsies of patients with suspicion of Barrett's esophagus at the endoscopy were included. Goblet cells were present in 76 cases and columnar blue cells in 50 cases. These materials were submitted to the immunohistochemical technique for CK7 and CK20. The result of the reactivity of each cytokeratin demonstrated that CK7 is expressed in a similar form in the two types of cells ($p=0.25$), while CK20 presented varied expression ($p < 0.001$). However, in the coordinated expression, the pattern CK7(+)/CK20(+) was the most frequent in both cells ($p=0.19$).

Conclusions: In agreement with the reactivity of CK7 and CK20, the columnar blue cells and goblet cells present some similar immunohistochemical characteristics, suggesting that columnar blue cells may represent a transitional stage to goblet cells. However, comparative studies with other markers related to the cellular differentiation of the metaplastic epithelium of BE are necessary to validate this hypothesis.

INTRODUCTION

Barrett's esophagus (BE) is considered a risk factor for esophageal adenocarcinoma, whose incidence in the Western world has been increasing rapidly in the last decades.¹⁻⁵ Histologically, BE represents an incomplete form of intestinal metaplasia, characterized by the presence of goblet cells at the coloration with hematoxylin/eosin (HE) and that it contains acid mucins, which are detected easily with the use of alcian blue pH 2,5 (AB).^{6,7} Once confirmed the diagnosis, the patients with BE should be enrolled in a program of endoscopic surveillance for dysplasia and adenocarcinoma.^{1-3,8}

However, the histological diagnosis of the intestinal metaplasia is very complex, since there are cells in the surface of the metaplastic epithelium that are as common as the goblet cells and they present an aspect similar to the gastric columnar cells when stained for HE, but, unlike these, they stain positively with AB.⁹⁻¹¹ These cells are denominated columnar blue cells and they can represent a transitional type of metaplastic cells, intermediate between gastric columnar cells and goblet cells.^{9,12} Due to this presupposition, the columnar blue cells have been generating controversies in the histological diagnosis of BE.^{7,13-15}

These controversies reinforce the importance of defining the existent relationship between goblet cells and columnar blue cells. It is fundamental to identify whether the columnar blue cells represent or not a "pre-goblet" stage, because the presence of these AB-positive cells can underestimate or overestimate the diagnosis of BE, causing exclusion of patients or unnecessary inclusion in programs of endoscopic surveillance. The use of a marker that can resolve these uncertainties would be important. The immunohistochemical expression of the cytokeratins 7 (CK7) and 20 (CK20) has been studied in the intestinal metaplasia of the esophagogastric junction, however, its reactivity in the columnar blue cells has not been characterized yet.

Cytokeratins constitute the subunits I and II of the intermediate filaments, which are one of the main components of the cellular skeleton. All of the epithelia (simple and complex) can be classified according to cytokeratins expression. CK7 is not usually expressed in the epithelium of the gastrointestinal tract, while CK20 presents expression in the gastric foveolar

epithelium and in the intestinal epithelium.¹⁶ Related to the intestinal metaplasia of the esophagogastric junction, a previous study of Ormsby et al¹⁷ suggested that specific patterns of reactivity for CK7/CK20 present discriminatory value between Barrett's esophagus and intestinal metaplasia of the cardia. Other authors tried to reproduce these patterns, obtaining diverse results.¹⁸⁻³¹ In these studies, only goblet cells were taken into account for the analysis of the patterns of CK7/CK20. However, up to this moment, the expression of these cytokeratins in the columnar blue cells was not yet characterized, as well as the possibility that this expression could be similar to that of the goblet cells. Therefore, the aim of this study was to evaluate the immunoreactivity of CK7 and CK20 in the columnar blue cells and goblet cells in patients with endoscopic suspicion of Barrett's esophagus.

MATERIALS AND METHODS

SELECTION OF THE CASES

The study was approved by the Ethics in Research Committee of the Hospital of Clinics of Porto Alegre. A revision in the endoscopic and pathologic files was accomplished, comprising the years of 2002 and 2003. Slides stained for HE and AB, obtained from patients with upper gastrointestinal endoscopy suggestive for Barrett's esophagus, were selected and reviewed for the identification of the goblet cells and columnar blue cells. The endoscopic suspicion of Barrett's esophagus was defined by the visualization of columnar epithelium above the esophagogastric junction, with extension > 3 cm or < 3 cm (long-segment and short-segment Barrett's esophagus, respectively). Goblet cells were defined as cells with distended lateral borders and compressed basal nuclei, located in the surface, foveolar and glandular epithelium. Columnar blue cells were defined as columnar cells similar to the gastric superficial cells, whose cytoplasm stain positively AB, and just located in the surface epithelium.¹¹ Appropriate materials that presented at least two epithelial segments with in the minimum 5 goblet cells, or columnar blue cells, or both simultaneously in a same slide, but in separate segments, were included in the study and submitted to the immunohistochemical technique for CK7 and CK20.

IMMUNOHISTOCHEMICAL TECHNIQUE

In each case, a representative paraffin-embedded block was selected and sections were made with medium thickness of 4 micrometers. The slides were deparaffinized and rehydrated. The inhibition of the endogenous peroxidase was done with hydrogen peroxide at 5% in distilled water. The antigen retrieval was performed in microwave oven at full power with citrate buffer pH 6.0 for 21 minutes. For the blockade of the unspecific reactions, solution of skimmed powdered milk at 5% was used with saline solution buffered with phosphate (PBS). The antibodies anti-cytokeratin 7 (clone OV-TL 12/30, Biogenex) and anti-cytokeratin 20 (clone Ks 20.8, Biogenex) were applied, both in the dilution 1:100. The detection of the primary antibodies was done using the streptavidin-biotin complex and 3-3-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB) was used as chromogen. The slides were counterstained with hematoxylin. Positive controls were used for each one of the antibodies (breast tissues for CK7 and colon tissues for CK20), while the negative controls were obtained substituting the primary antibody for buffer solution.

EVALUATION OF IMMUNOREACTIVITY FOR CYTOKERATINS

The evaluation of CK7 and CK20 was accomplished through the immunoreactivity (positive or negative) of the membrane and cytoplasm of the cells in study. Unspecific or background staining was referred as negative. Cases presenting more than 10% of stained cells for microscopic field of high magnification (400x) were considered positive. In the areas with goblet cells, the reactivity was registered in the surface, foveolar and glandular epithelium, while in the areas with columnar blue cells only the reactivity of the surface epithelium was registered. In all cases, the reactivity of the cytokeratins in the different cellular segments was compared simultaneously to the findings of AB. To compare the resulting patterns of both cells, only the respective reactivities of the superficial epithelium were used. These superficial patterns were denominated as Barrett-type [CK7(+)/CK20(+)] and the other patterns as no Barrett-type [CK7(+)/CK20 (-), CK7 (-) / CK20(+), CK7 (-) / CK20 (-)]. The slides were examined by two pathologists in an independent way (LM and MPR). The discordant or doubtful cases were

resolved through a consensus among the two observers after independent review. None of the observers had knowledge of the endoscopic and pathologic records of the selected cases.

STATISTICAL ANALYSIS

The kappa (k) statistics was calculated to evaluate the interobserver concordance in the histological identification of the studied cells and in the interpretation of the immunohistochemical results. The interobserver concordance was classified according to the following parameters: poor (<0.20), fair ($0.21 - 0.40$), moderate ($0.41 - 0.60$), good ($0.61 - 0.80$) e very good (>0.80).³²

Fischer's exact test, at a significance level of 5%, was used to compare the proportions of goblet cells and columnar blue cells stained by CK7 and CK20.

RESULTS

A total of 86 biopsies were included in this study. Fifty-nine biopsies (68.6%) were derived of patients with endoscopic suspicion of long-segment BE and 27 biopsies (31.4%) of short-segment BE. The frequencies of the identified cells in the histological analysis and its relationship with the endoscopic findings are summarized in table 1. The independent evaluation demonstrated an interobserver concordance (kappa) of 0.75. This value was caused by the disagreement among the observers in the identification of the columnar blue cells in 13 cases. There was not disagreement as for the recognition of the goblet cells. Eleven cases just presented columnar blue cells, predominating in those with suspicion of short-segment BE ($p=0.003$). In 36 cases, only goblet cells were observed. In the 39 remaining cases, there were areas with columnar blue cells and areas with goblet cells simultaneously. In the total, goblet cells were present in 75 biopsies (87.2%), while the columnar blue cells were evidenced in 50 biopsies (58.1%).

The results of the evaluation of CK7 in the total of goblet cells showed that the superficial and deep positive pattern occurred in 53 cases (70.6%), while 5 cases (6.7%) presented the superficial positive pattern, and other 17 cases (22.7%) were negative. In the expression for CK20, the superficial positive pattern occurred in 66 cases (88%), 1 case (1.3%)

presented the superficial and deep positive pattern (due to the presence of complete intestinal metaplasia) and 8 cases (10.7%) were negative (Figure 1).

The immunohistochemical findings for CK7 in all columnar blue cells showed that superficial positive pattern happened in 43 cases (86%) and 7 (14%) were negative. In the reactivity for CK20, 31 cases (62%) presented the superficial positive pattern and 19 (38%) were negative (Figures 1 and 2).

The resulting kappa from the independent analysis of CK7 in the goblet cells was 0.85, and 0.90 in the columnar blue cells, while in the interpretation of CK20, the concordance was of 0.93 in the goblet cells, and 0.74 in the columnar blue cells.

In the comparison for reactivity of the cytokeratins, the "superficial" and "superficial and deep" positive cases observed in the goblet cells were gathered in a single group, and only the superficial reactivity in both cells were used in the analysis. The final results of this redistribution are registered in table 2. We observed that in the 36 biopsies with just goblet cells, 23 (63.9%) presented positivity for CK7, and 33 (91.7%) were positive for CK20. In the 11 biopsies with only columnar blue cells, 10 (90.9%) were positive for CK7 and 6 (54.5%) for CK20. Comparing the resulting proportions in the cases with only goblet cells or columnar blue cells, there was statistically significant differences just for CK20 ($p=0.01$). In relation to the 39 cases with both cells in the same biopsy, the positivity of CK7 and CK20 was of 89.7% and 87.2% in the goblet cells and of 84.6% and 64.1% in the columnar blue cells. Similarly to the previous comparison, the statistical difference between the goblet cells and columnar blue cells only occurred in the positivity for CK20 ($p=0.03$). In the total sum of the cases with goblet cells and columnar blue cells, there was not statistical difference in the reactivity for CK7 between the two types of cells ($p=0.25$), while a very significant difference was demonstrated in the reactivity for CK20 ($p<0.001$).

The resulting patterns of the association of the reactivity of CK7 and CK20 in the surface epithelium are demonstrated in table 3. The Kappa calculation during the independent analysis resulted in a concordance of 0.83 in the patterns of the goblet cells, and of 0.76 in those of the columnar blue cells. Among the cases with only goblet cells or columnar blue cells, statistical differences occurred in the patterns CK7(+)/CK20 (-) and CK7 (-) / CK20(+) ($p=0.02$

and $p=0.04$), but no difference was observed in the cases that presented the two cells simultaneously. In the final sum of the different patterns in both cells, statistical differences were identified only for the patterns CK7(+)/CK20 (-) and CK7 (-) / CK20(+) ($p = 0.003$ and $p = 0.02$, respectively).

DISCUSSION

The diagnosis of BE is suggested through the identification of columnar epithelium in the distal portion of the esophagus during the upper gastrointestinal endoscopy, and confirmed when goblet cells are visualized in biopsies stained with HE and AB.^{6,7} However, columnar cells located in the surface epithelium can also present positivity to AB (columnar blue cells) and they are a frequent finding during the histological exam.^{9,11,12} In a topographic study of 9 specimens of esophageal resections for BE-associated high degree dysplasia or carcinoma, Offner et al¹¹ demonstrated that these cells were present in 85.7% of the histological sections and, in certain situations, they were more prevalent than the goblet cells in the surface epithelium of the esophagogastric junction and distal esophagus. In spite of this, the presence of these cells is not sufficient to establish the diagnosis of BE when goblet cells are absent, nor to delineate a risk population for malignancy.^{10,14,15} On the other hand, considering that the columnar blue cells constitute a pre-goblet stage, this can have implications in the diagnosis and management of BE. Therefore, the use of markers that reinforce this hypothesis may have a fundamental importance.

Cytokeratins comprise 20 structural proteins found in cytoskeleton of epithelial cells. The expression of these cytokeratins depends on the type, location and differentiation of the epithelium. CK7, being a marker of ductal differentiation, is not expressed in the normal epithelium of the digestive tract, while the expression of CK20, a marker of intestinal differentiation, is limited to the intestinal epithelium and superficial gastric foveolar epithelium.^{17,28} These cytokeratins have been object of several studies in patients with BE. The immunoreactivity of CK7/CK20 in intestinal metaplasia of the esophagogastric junction was described initially by Ormsby et al,¹⁷ which defined different patterns of expression for BE (Barrett pattern) and intestinal metaplasia of the cardia (gastric pattern). The pattern designated

as Barrett-type presented CK7 with reactivity in the surface epithelium and superficial and deep glands, while the expression of CK20 was restricted to the surface epithelium and superficial glands. The pattern gastric-type demonstrated reactivity absent or irregular for CK7 and expression of CK20 occurred in the surface epithelium and superficial and deep glands. In this study, the Barrett pattern was present in 94% of the specimens of esophageal resections and in 100% of the specimens of biopsies originated from patients with long-segment EB. The gastric pattern was demonstrated in all of the specimens of biopsies from cardia and of the gastric resections. Some subsequent studies achieved to reproduce these findings.^{18,19,29,30} However, other authors presented discordant results and they concluded that these patterns are not useful to differentiate BE from intestinal metaplasia of cardia.²⁰⁻²⁸ In spite of the controversies, these studies produced some outcomes that deserve to be considered. Shearer et al³⁰ mentioned that similar patterns of CK7/CK20 were frequently observed in adjacent areas where goblet cells were absent, while in the study of Ormsby et al,¹⁷ only areas with goblet cells were evaluated. Mohammed et al²¹ identified the Barrett pattern in 55% of the biopsies in inflamed or normal cardiac mucosa and without evidence of intestinal metaplasia. Glickman et al²² noted that the immunophenotypes of the cardiac mucinous epithelium, in patients with long-segment BE, short-segment BE and normal esophagogastric junction, are similar for Das-1 and CK7/CK20, however different from those of the gastric antral mucosa. DeMeester et al²³ observed that the cardiac mucosa presented Barrett pattern in 85% of the cases. In another study of Ormsby et al,²⁹ it was observed that areas of non-specialized columnar mucosa presented positivity for CK7 in 22% of the cases. In the same way, Jovanovic et al¹⁸ perceived that the non-intestinalized cardiac epithelium expressed strong positivity for CK7, while in the mucosa of the body and gastric antrum, the expression was totally negative.

These data make evident that similar patterns of CK7/CK20 are observed commonly in the columnar mucosa of the esophagogastric junction when goblet cells are absent. An possible explanation is that these areas are in transformation for an intestinal phenotype.^{18,30,33} Besides, histologically, BE is constituted not only for goblet cells, but also for columnar blue cells, which may correspond to immature goblet cells (pre-goblet) and AB-negative columnar cells.³⁴ In the same way as BE, the surface epithelium of the cardia can also present columnar cells with positivity to AB.^{11,13} Taking these findings into consideration, it is presumably that the columnar

blue cells have a positive reactivity for cytokeratins in areas without goblet cells. Up to this moment, no study specifically characterized the reactivity of CK7/CK20 in the columnar blue cells in BE. Therefore, this study evaluated this reactivity and compared it to the expression in the goblet cells.

When evaluating the reactivity of each cytokeratin separately, we observed that, in the goblet cells, the predominant pattern of expression for CK7 was the superficial and deep positive pattern, while for CK20 it was the superficial positive pattern. These findings are in agreement with Ormsby et al,¹⁷ in spite of the smaller proportions found in our study (Figure 1). In the columnar blue cells, we evaluated only the reactivity of the surface epithelium, due to the fact that in this area the columnar blue cells are more abundant.¹¹ In these cases, the superficial positivity occurred in 86% for CK7 and in 62% for CK20 (Figure 2). We believe that the smaller proportions in the positive cases in our study can be justified by the differences in the immunohistochemical technique, mainly because we used the cytokeratins in a larger dilution in comparison to other studies, what determines a smaller intensity of the coloration. Another possible explanation for this variability is that, in some cases, the epithelium presented a weak and irregular coloration, without an appropriate demarcation of the cytoplasm and the membrane of the cells studied, and for that reason the findings were considered negative.

When the superficial reactivity of the cytokeratins was compared in the goblet cells and columnar blue cells, we verify no statistical difference in relation to the reactivity for CK7, but we found statistical difference in the expression for CK20. However, when we analyzed the coordinated expression of the cytokeratins, a statistical difference was observed in the patterns CK7(+)/CK20 (-) and CK7 (-) / CK20(+). The pattern CK7(+)/CK20(+), which would be a superficial pattern equivalent to Barrett pattern described by Ormsby et al,¹⁷ presented no statistical difference between the two types of cells ($p=0.25$), even with smaller reactivity of CK20 observed in the columnar blue cells (Figure 1). These findings occurred in a similar way in the cases with only goblet cells as well as in the cases with only columnar blue cells, and also in those cases with both cells present in the same slide.

Other immunomarkers have been studied in the intestinal metaplasia of BE, such as the mucins and Cdx2 expression. Mucins are glycosylated proteins produced by epithelial cells and constitute the main component of the layer of mucus of the gastrointestinal tract.²⁷ In cases with

BE, Glickman et al³⁵ demonstrated that similar expressions of MUC1, MUC2 and MUC5AC were observed in the goblet cells and non-goblet columnar cells, finding described also by Piazuolo et al.²⁷ However, in both studies, no reference was made for AB staining in these columnar cells, which made it difficult to evaluate the mucins reactivity in columnar blue cells. Cdx2 represents an essential protein in the early differentiation and maintenance of the intestinal epithelium, whose expression occurs along the whole small and large intestine, its limit being the proximal portion of the gastro-duodenal junction. Phillips et al³⁶ used immunohistochemical technique to detect Cdx2 in the metaplastic epithelium of the esophagus and compared the results with the coloration for PAS-AB. Cdx2 was positive in all cases of BE, and acid mucins were present in the goblet cells and non-goblet columnar cells. In the cases with junctional-type (cardiac) epithelium, acid mucins were present in the non-goblet columnar cells in 85% of the positive cases and in 74% of the negative cases for Cdx2. In another study, Groismann et al³⁷ observed that all cases with intestinal metaplasia were positive for Cdx2, either in the goblet cells or in the adjacent columnar cells. However, in the cases without intestinal metaplasia, focal reactivity for Cdx2 was seen in 38% of the columnar cells, and in 24% of the cases, strips of columnar blue cells were present and they were negative for Cdx2. Steininger et al³⁸ also detected positivity for Cdx2 in goblet cells and columnar blue cells in the unequivocal cases of BE. However, the authors mentioned that the outcomes of AB were inconsistent to indicate reliably an early intestinal differentiation.

These studies suggest that the expression of Cdx2 in goblet and non-goblet cells is similar in cases of BE, but different in those cases that present only columnar cells, and they conclude that the positivity of AB in columnar cells cannot be indicative of intestinal metaplasia. However, our study seems to indicate that the two cells present some similar immunohistochemical characteristics, either in cases of BE or cases without goblet cells, and they provide support to the hypothesis that the columnar blue cell may represent an intermediate stage between columnar cell and goblet cell.

The immunohistochemical evaluation for CK7 and CK20 has been object of several studies, that tried to determine distinctive expression patterns between intestinal metaplasia of BE and intestinal metaplasia of the cardia. The present study just used suspicious cases of BE at the upper digestive endoscopy, and tried to characterize the superficial reactivity of CK7 and

CK20 in the goblet cells and columnar blue cells in an individualized form. We verify no differences in the expression for CK7 and, although the results in the expression for CK20 presented differences, this does not seem to have any influence in the result of the coordinated analysis, where the Barrett-type superficial pattern CK7(+)/CK20(+) was the most frequent in both cells. These data suggest that goblet cells and columnar blue cells have some similarities in the expression of these cytokeratins. Mucins and Cdx2 are markers that seem to have a promising future in the evaluation of the metaplastic epithelium of EB. A comparison among the reactivities of several immunomarkers correlated with the outcomes of AB can add relevant information regarding the controversies still existent in the histological diagnosis of BE.

In conclusion, this study demonstrates that the goblet cells and columnar blue cells present some similar immunohistochemical characteristics for CK7/CK20 in patients with endoscopic suspicion of BE. This fact suggests that the columnar blue cell may be a transition stage for goblet cell. However, further comparative studies are necessary to valuate the applicability of their results as for the cellular differentiation of the metaplastic epithelium of BE.

REFERENCES

1. Falk GW. Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002; 122:1569-1591.
2. Spechler SJ. Barrett's esophagus. *N Engl J Medicine* 2002; 346: 836-842.
3. Sampliner RE and The Practice Parameters Committee Of The American College Of Gastroenterology. Update guidelines for the diagnosis, surveillance and therapy of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:1888-1895.
4. Reynolds JC, Rahimi P, Hirschi D. Barrett's esophagus: clinical characteristics. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:441-460
5. Ertan A, Younes M. Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci* 2000;45:1670-1673

6. Carton E, Caldwell MTP, McDonald G, Rama D, Tanner WA, Reynolds JV. Specialized intestinal metaplasia in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *Brit J Surg* 2000; 87:116-121.
7. Goldblum JR. The significance and etiology of intestinal metaplasia of esophagogastric junction. *Ann Diagn Pathol* 2002;6:67-73.
8. DeMeester SR, DeMeester TR. Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus. Fifty years of controversy. *Ann Surg* 2000;231:303-321.
9. Guindi M, Riddell RH. Histology of Barrett's esophagus and dysplasia. *Gastrointest Endoscopy Clin N Am* 2003; 13:349-368.
10. Haggitt RC. Pathology of Barrett's esophagus. *J Gastrointest Surg* 2000;4:117-8.
11. Offner FA, Lewin KJ, Weinstein WM. Metaplastic columnar cells in Barrett's esophagus: a common and neglected cell type. *Hum Pathol* 1996; 27:885-889.
12. Weinstein WM, Ippoliti AF. The diagnosis of Barrett's esophagus: goblets, goblets, goblets. *Gastrointest Endosc* 1996; 44:91-5.
13. Chen YY, Wang HH, Antonioli DA *et al.* Significance of acid-mucin-positive nongoblet columnar cells in the distal esophagus and gastroesophageal junction. *Hum Pathol* 1999; 30:1488-1495.
14. Fléjou JF. Barrett's esophagus: from metaplasia to dysplasia and cancer. *Gut* 2005;54 (Suppl I):i6-i12.
15. Faller G, Borschard F, Ell C *et al.* Histopathological diagnosis of Barrett's mucosa and associated neoplasias: results of a consensus conference of the Working Group for Gastroenterological Pathology of the German Society for Pathology on 22 September 2001 in Erlangen. *Virchows Arch* 2003; 443:597-601.
16. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002;40:403-439.

17. Ormsby AH, Goldblum JR, Rice TW *et al.* Cytokeratin subsets can reliably distinguish Barrett's esophagus from intestinal metaplasia of the stomach. *Hum Pathol* 1999;30:288-294.
18. Jovanovic I, Tzardi M, Mouzas IA *et al.* Changing patterns of cytokeratins 7 and 20 expression from normal epithelium to intestinal metaplasia of the gastric mucosa and gastroesophageal junction. *Histol Histopathol* 2002;17:445-454.
19. Sarbia M, Donner A, Franke C, Gabbert HE. Distinction between intestinal metaplasia in the cardia and Barrett's esophagus: the role of histology and immunohistochemistry. *Hum Pathol* 2004;35(3):371-376.
20. EL-Zimaity HMT, Graham DY. Cytokeratin subsets for distinguishing Barrett's esophagus from intestinal metaplasia in the cardia using endoscopic biopsy specimens. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1378-1382.
21. Mohammed IA, Streutker CJ, Riddell RH. Utilization of cytokeratins 7 and 20 does not differentiate between Barrett's esophagus and gastric cardiac intestinal metaplasia. *Mod Pathol* 2002;15:611-616.
22. Glickman JN, Wang H, Das K *et al.* Phenotype of Barrett's esophagus and intestinal metaplasia of the distal esophagus and gastroesophageal junction: an immunohistochemical study of cytokeratins 7 and 20, Das-1 and 45MI. *Am J Surg Pathol* 2001;25(1):87-94.
23. DeMeester SR, Wickramasinghe KS, Lord RV *et al.* Cytokeratin and DAS-1 immunostaining reveal similarities among cardiac mucosa, CIM, and Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2514-2523.
24. Kurtkaya-Yapicier O, Gencosmanoglu R, Avsar E, Bakirci N, Tozun N, Sav A. The utility of cytokeratins 7 and 20 (CK7/CK20) immunohistochemistry in the distinction of short-segment Barrett esophagus from gastric intestinal metaplasia: is it reliable? *BMC Clin Pathol* 2003;3:5.
25. Schilling D, Spiethoff A, Rosenbaum A *et al.* Does cytokeratins 7/20 immunoreactivity help to distinguish Barrett's esophagus from gastric intestinal metaplasia? Results of a prospective study of 75 patients. *Pathol Res Pract* 2005;200(11-12):801-805 (Abstract).

26. Gulmann C, Al Shaqqi O, Grace A *et al.* Cytokeratins 7/20 and MUC1, 2, 5AC, and 6 Expression patterns in Barrett's esophagus and intestinal metaplasia of the stomach. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004;12:142-147.
27. Piazeulo MB, Haque S, Delgado A, Du JX, Rodriguez F, Correa P. Phenotypic differences between esophageal and gastric intestinal metaplasia. *Mod Pathol* 2004;17:62-74
28. Liu GS, Gong J, Cheng P, Zhang J, Chang Y, Qiang L. Distinction between short-segment Barrett's esophageal and cardiac intestinal metaplasia. *World J Gastroenterol* 2005;11(40):6360-6365
29. Ormsby AH, Vaezi MF, Richter JE, Goldblum JR, Rice TW, Falk GW, Gramlich TL. Cytokeratin immunoreactivity patterns in the diagnosis of short-segment Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2000;119:683-690.
30. Shearer C, Going J, Nellson L, Mackay C, Stuart RC. Cytokeratin 7 and 20 expression in intestinal metaplasia of the distal oesophagus: relationship to gastroesophageal reflux disease. *Histopathology* 2005; 47:268-275.
31. Flucke U, Steinborn E, Dries V *et al.* E. Immunoreactivity of cytokeratins (CK7, CK20) and mucin peptide core antigens (MUC1, MUC2, MUC5AC) in adenocarcinomas, normal and metaplastic tissues of distal esophagus, oesophago-gastric junction and proximal stomach. *Histopathology* 2003;43:127-134.
32. GLICKMAN JN, ORMSBY AH, GRAMLICH TL, GOLDBLUM JR, ODZE RD. Interinstitutional variability and effect of tissue fixative on the interpretation of a Barrett cytokeratin 7/20 immunoreactivity pattern in Barrett esophagus. *Hum Pathol* 2005;36:58-65.
33. Chaves P, Cardoso P, De Almeida JCM, Pereira AD, Leitão CN, Soares J. Non-goblet cell population of Barrett's esophagus: an immunohistochemical demonstration of intestinal differentiation. *Hum Pathol* 1999;30:1291-5.
34. Mueller J, Werner M, Stolte M. Barrett's esophagus: histopathologic definitions and diagnostic criteria. *World J Surg* 2004;28:148-154.

35. Glickman JN, Shamsafaei A, Odze RD. Mucin core peptide expression can help differentiate Barrett's esophagus from intestinal metaplasia of the stomach. *Am J Surg Pathol* 2003;27(10):1357-65.
36. Phillips RW, Frierson HF, Moskaluk CA. Cdx2 as a marker of epithelial intestinal differentiation in the esophagus. *Am J Surg Pathol* 2003;27(11):1442-7.
37. Groisman GM, Amar M, Meir A. Expression of the intestinal marker Cdx2 in the columnar-lined esophagus with and without intestinal (Barrett's) metaplasia. *Mod Pathol* 2004;17(10):1282-8 (Abstract).
38. Steininger H, Pfofe DA, Muller H, Haag-Sunjic G, Fratianu V. Expression of CDX2 and MUC2 in Barrett's mucosa. *Pathol Res Pract* 2005;201(8-9):573-7 (Abstract).

FIGURES

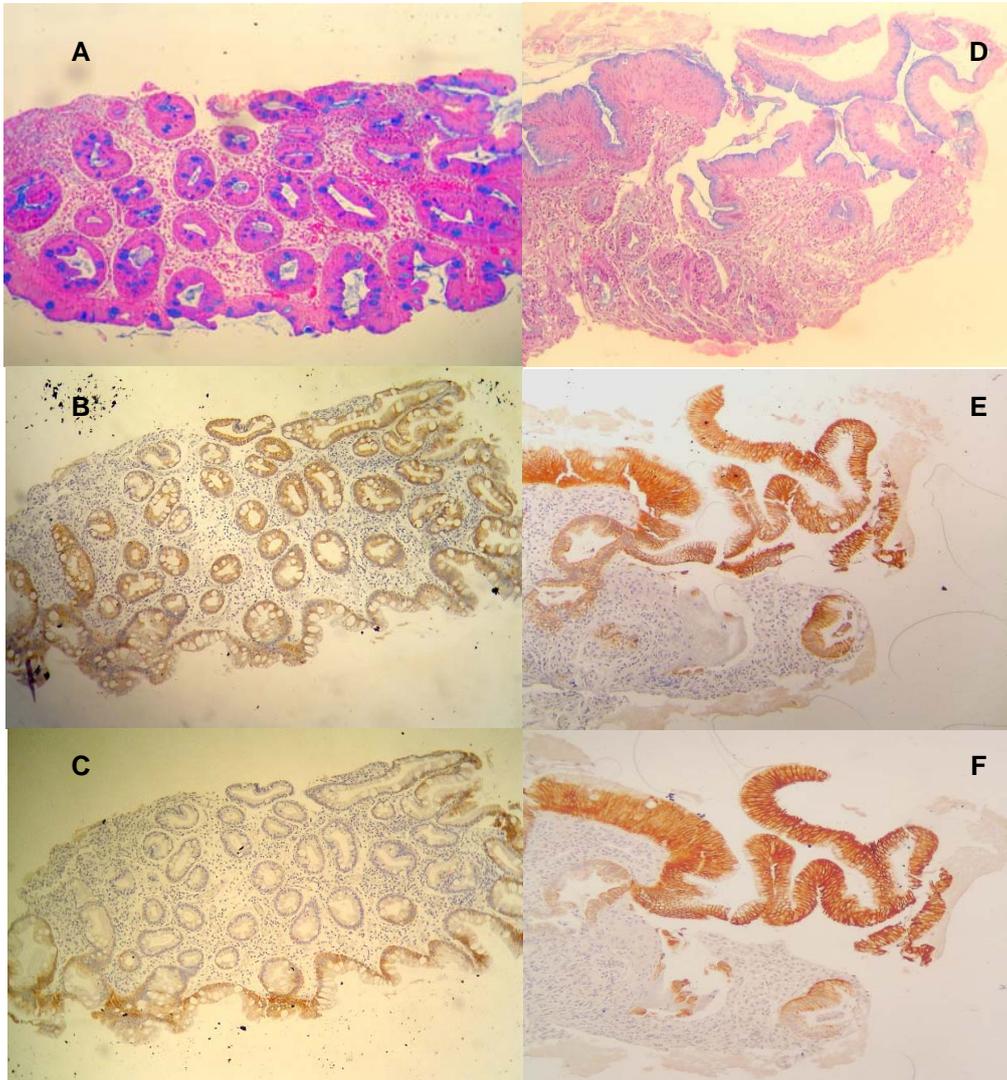


Figure 1. A,B,C: Alcian blue and positive reactivity for CK7 (superficial and deep) and for CK20 (superficial) in goblet cells. D,E,F: Alcian blue and positive superficial reactivity for CK7 and CK20 in columnar blue cells.

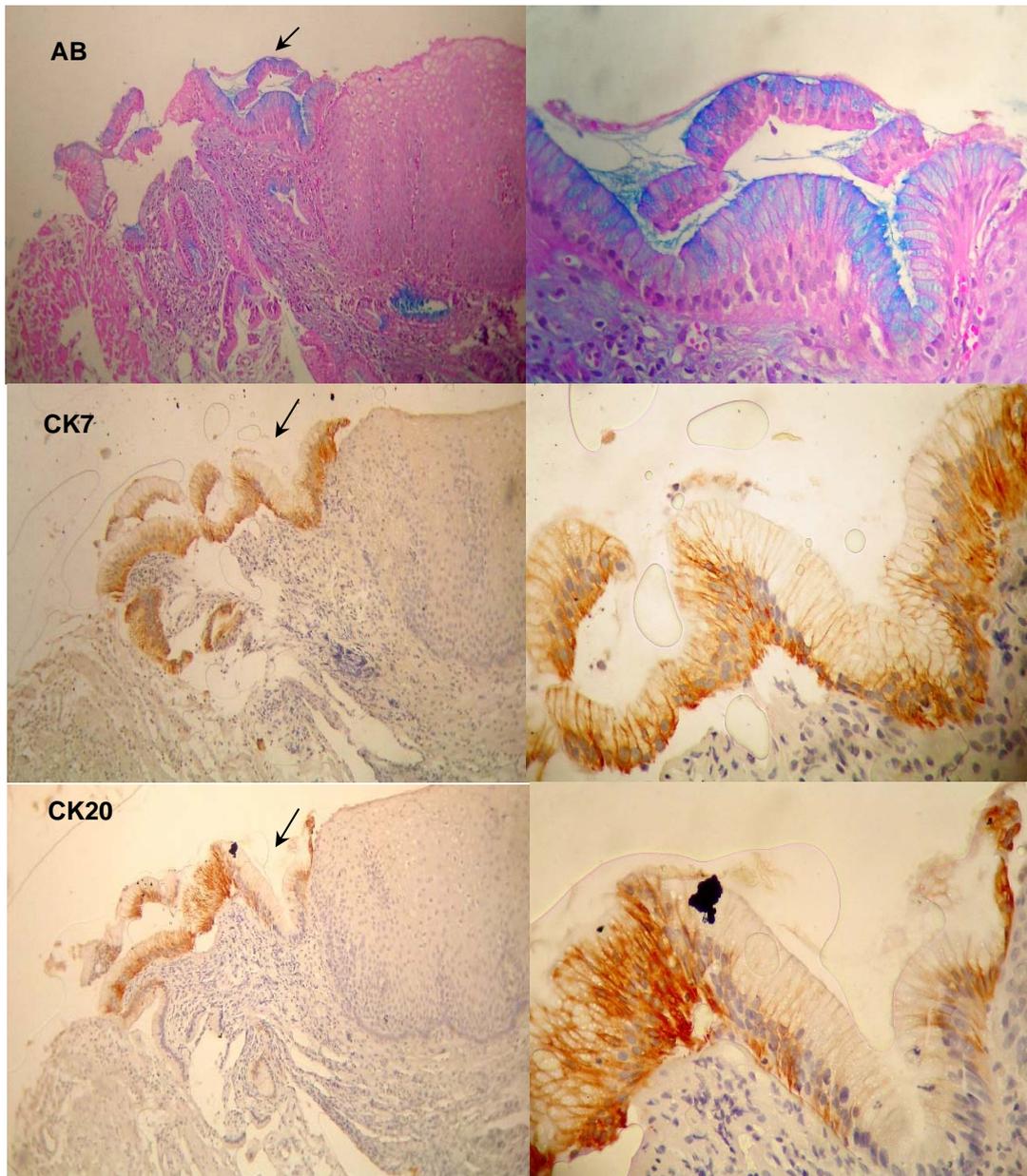


Figure 2. Alcian blue (AB) and positive superficial reactivity for CK7 and CK20 in columnar blue cells. The areas indicated by arrows in the images to the left are demonstrated to the right in increased size (400x).

TABLES

| | GC | CB | GC/CB | TOTAL |
|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| LSBE | 27 (31.4%) | 3* (3.5%) | 29 (33.7%) | 59 (68.6%) |
| SSBE | 9 (10.5%) | 8* (9.3%) | 10 (11.6%) | 27 (31.4%) |
| TOTAL | 36 (41.9%) | 11 (12.8%) | 39 (45.3%) | 86 |

Table 1. Frequencies of the goblet cells (GC), columnar blue cells (CB), or both cells (GC/CB) in biopsies from patients with suggestive endoscopy of long-segment Barrett's esophagus (LSBE) and short-segment Barrett's esophagus (SSBE). * p=0.003

| | n | CK7 | | CK20 | |
|-----------------|----------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | | Positive | Negative | Positive | Negative |
| GC | 36 | 23 (63.9%) | 13 (36.1%) | 33* (91.7%) | 3 (8.3%) |
| CB | 11 | 10 (90.9%) | 1 (9.1%) | 6* (54.5%) | 5 (45.5%) |
| GC / CB | 39 | 35 (89.7%) | 4 (10.3%) | 34** (87.2%) | 5 (12.8%) |
| | | 33 (84.6%) | 6 (15.4%) | 25** (64.1%) | 14 (35.9%) |
| GC TOTAL | 75 | 58 (77.3%) | 17 (22.7%) | 67*** (89.3%) | 8 (10.7%) |
| CB TOTAL | 50 | 43 (86%) | 7 (14%) | 31*** (62%) | 19 (38%) |

Table 2. Reactivity of CK7 and CK20 in the cases with goblet cells (GC), columnar blue cells (CB) or both cells (GC/CB). *p=0.01; **p=0.03; ***p<0.001.

| | <i>n</i> | CK7 (+) CK20 (+) | CK7 (+) CK20 (-) | CK7 (-) CK20 (+) | CK7 (-) CK20 (-) |
|------------------------|----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| CC | 36 | 21 (58.3%) | 2* (5.6%) | 12** (33.3%) | 1 (2.8%) |
| CA | 11 | 6 (54.5%) | 4* (36.4%) | 0** (0%) | 1 (9.1%) |
| CC / CA | 39 | 30 (76.9%) | 5 (12.8%) | 4 (10.3%) | 0 (0%) |
| | | 22 (56.4%) | 11 (28.2%) | 3 (7.7%) | 3 (7.7%) |
| TOTAL CC | 75 | 51 (68.1%) | 7 [†] (9.3%) | 16 [‡] (21.3%) | 1 (1.3%) |
| TOTAL CA | 50 | 28 (56%) | 15 [†] (30%) | 3 [‡] (6%) | 4 (8%) |

Table 3. Co-expression of CK7/CK20 in the cases with goblet cells (GC), columnar blue cells (CB) or both cells (GC/CB). *p=0.02; **p=0.04, [†]p=0.003; [‡]p=0,02.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1. Co-autor do trabalho: “IDENTIFICAÇÃO E PREVALÊNCIA DO ESÔFAGO DE BARRETT NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA”, apresentado na sessão de posters de Endoscopia durante o XVI Seminário Brasileiro de Endoscopia Digestiva e Congresso Sul-Brasileiro de Gastroenterologia, realizado em Florianópolis – SC, no período de 23 a 26 de novembro de 2003.

2. Autor do trabalho: “CITOQUERATINAS 7 E 20 NA DIFERENCIAÇÃO DA METAPLASIA INTESTINAL EM PACIENTES COM SINTOMAS DE REFLUXO GASTROESOFÁGICO”, apresentado na sessão de temas livres de Gastroenterologia durante o XVI Seminário Brasileiro de Endoscopia Digestiva e Congresso Sul-Brasileiro de Gastroenterologia, realizado em Florianópolis – SC, no período de 23 a 26 de novembro de 2003.

3. Co-autor do trabalho: “PREVALÊNCIA DO ESÔFAGO DE BARRETT NA UNIDADE DE ENDOSCOPIA DIGESTIVA DE HOSPITAL DE REFERÊNCIA PARA A REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL”, publicado na revista GED, volume 22, nº 6 – Nov/Dez, 2003, páginas 213-218.

ANEXO

DADOS ENDOSCÓPICOS E HISTOLÓGICOS

| Caso | Endoscopia | Nº AP | Diagnóstico histológico | Células observadas |
|-------------|-------------------|----------------------|--|---------------------------|
| 1 | EB curto | 2098/02 | Inflamação crônica com MI em mucosa da TEG, compatível com EB. | CC |
| 2 | EB longo | 2223/02 – fração 1/2 | Inflamação crônica e MI em mucosa da TEG. | CC CA |
| 3 | EB longo | 2223/02 – fração 2/2 | Inflamação crônica e MI em mucosa da TEG. | CC |
| 4 | EB longo | 2381/02 – fração 1/2 | Esofagite crônica ulcerada, com mucosas tipo gástrica e intestinal, compatível com EB. | CC |
| 5 | EB longo | 2381/02 – fração 2/2 | Esofagite crônica ulcerada, com mucosas tipo gástrica e intestinal, compatível com EB. | CC |
| 6 | EB longo | 3699/02 | TEG com inflamação discreta e MI focal | CC |
| 7 | EB longo | 3797/02 – fração 1/2 | MI - EB | CC |
| 8 | EB longo | 3797/02 – fração 2/2 | MI - EB | CC |
| 9 | EB longo | 3863/02 – fração 1/2 | EB com displasia leve focal | CC CA |
| 10 | EB longo | 3863/02 – fração 2/2 | EB com displasia leve focal | CC |
| 11 | EB curto | 4221/02 | Mucosa glandular com MI | CC |
| 12 | EB curto | 4245/02 | Inflamação crônica em mucosa gástrica de TEG com MI | CC |
| 13 | EB longo | 6121/02 | EB | CC CA |
| 14 | EB longo | 6346/02 | Inflamação crônica discreta em mucosa esofágica em continuidade com mucosa glandular tipo cardica com células caliciformes | CC CA |
| 15 | EB longo | 6399/02 – fração 1/2 | Inflamação crônica leve com MI em mucosa gástrica tipo antral | CC |
| 16 | EB longo | 6399/02 – fração 2/2 | Inflamação crônica leve com MI em mucosa gástrica tipo antral | CC |
| 17 | EB longo | 6805/02 – fração 2/8 | EB com inflamação crônica discreta e sem displasia | CC CA |
| 18 | EB longo | 6805/02 – fração 3/8 | EB com inflamação crônica discreta e sem displasia | CC |
| 19 | EB longo | 6805/02 – fração 4/8 | EB com inflamação crônica discreta e sem displasia | CC CA |
| 20 | EB longo | 6805/02 – fração 5/8 | EB com inflamação crônica discreta e sem displasia | CC |
| 21 | EB longo | 6805/02 – fração 6/8 | EB com inflamação crônica discreta e sem displasia | CC CA |
| 22 | EB longo | 6805/02 – fração 7/8 | EB com inflamação crônica discreta e sem displasia | CC CA |

| | | | | |
|----|----------|----------------------|---|----------|
| 23 | EB curto | 6875/02 – fração 1/2 | Inflamação crônica discreta em mucosa escamosa e MI | CC |
| 24 | EB curto | 6875/02 – fração 2/2 | Inflamação crônica discreta em mucosa escamosa e MI | CC CA |
| 25 | EB curto | 6997/02 | Mucosa de TEG com MI e discreto infiltrado inflamatório reacional | CC CA |
| 26 | EB curto | 7343/02 | EB sem atipias | CC |
| 27 | EB curto | 7853/02 | Inflamação crônica discreta em mucosa glandular com MI | CA |
| 28 | EB curto | 8766/02 | Inflamação crônica em mucosa escamosa em continuidade com mucosa glandular tipo cardica | CA |
| 29 | EB longo | 8820/02 – fração 1/4 | Inflamação crônica discreta em mucosa escamosa e glandular com MI | CC CA |
| 30 | EB longo | 8820/02 – fração 2/4 | Inflamação crônica discreta em mucosa escamosa e glandular com MI | CC CA |
| 31 | EB longo | 8820/02 – fração 3/4 | Inflamação crônica discreta em mucosa escamosa e glandular com MI | CC CA |
| 32 | EB longo | 8820/02 – fração 4/4 | Inflamação crônica discreta em mucosa escamosa e glandular com MI | CC |
| 33 | EB curto | 8895/02 | Esofagite crônica com MI incompleta | CC |
| 34 | EB longo | 8957/02 | Inflamação crônica em mucosa gástrica tipo antral com MI | CC CA |
| 35 | EB longo | 9311/02 | EB, negativo para displasia | CC CA |
| 36 | EB longo | 9603/02 – fração 1/2 | Esofagite crônica em mucosa de TEG com focos de MI | CC |
| 37 | EB longo | 9603/02 – fração 2/2 | Esofagite crônica em mucosa de TEG com focos de MI | CC |
| 38 | EB longo | 9620/02 | Inflamação crônica com hiperplasia foveolar e focos MI em mucosa tipo gástrico | CC CA |
| 39 | EB curto | 9692/02 | EB sem displasia | CC |
| 40 | EB curto | 10171/02 | Inflamação crônica moderada em mucosa escamosa em continuidade com mucosa oxinto-cardica | CA |
| 41 | EB longo | 10517/02 | Inflamação crônica ulcerada em mucosa escamosa em continuidade com mucosa glandular tipo cardica com células caliciformes | CC CA |
| 42 | EB longo | 10610/02 | EB sem displasia | CC CA |
| 43 | EB longo | 11937/02 fração 1/4 | Mucosa cardica com inflamação crônica discreta a moderada e extensa MI compatível com EB | CC |

| | | | | |
|----|----------|------------------------|---|----------|
| 44 | EB longo | 11937/02 fração 2/4 | Mucosa cardica com inflamação crônica discreta a moderada e extensa MI compatível com EB | CC |
| 45 | EB curto | 12156/02 | Inflamação crônica em mucosa de TEG com MI, compatível com EB | CA |
| 46 | EB longo | 12262/02 fração 1/4 | Inflamação crônica e MI em mucosa gástrica compatível com EB | CC |
| 47 | EB longo | 12262/02 fração 2/4 | Inflamação crônica e MI em mucosa gástrica compatível com EB | CC CA |
| 48 | EB curto | 12268/02 | Inflamação crônica em mucosa cardica | CA |
| 49 | EB curto | 12338/02 | Inflamação crônica em mucosa glandular tipo cardica com MI | CC CA |
| 50 | EB longo | 13155/02 Fração 1/2 | EB com displasia leve | CC CA |
| 51 | EB longo | 13155/02 Fração 2/2 | EB com displasia leve | CC CA |
| 52 | EB curto | 13697/02 | Inflamação crônica com hiperplasia linfóide focal e focos de MI em mucosa de TEG | CC |
| 53 | EB curto | 13734/02 | Inflamação crônica com extensa MI em mucosa do TEG | CC CA |
| 54 | EB longo | 14330/02 | Inflamação crônica discreta em mucosa tipo gástrica | CC |
| 55 | EB curto | 15044/02 | Inflamação crônica e MI em mucosa de JEG | CC CA |
| 56 | EB longo | 15134/02 | Mucosa glandular com MI | CC CA |
| 57 | EB longo | 15718/02 fração 1/3 | Inflamação crônica em mucosa gástrica do tipo cardica com MI focal em um fragmento. MI em mucosa gástrica compatível com EB | CC CA |
| 58 | EB longo | 15718/02 fração 2/3 | Inflamação crônica em mucosa gástrica do tipo cardica com MI focal em um fragmento. MI em mucosa gástrica compatível com EB | CC CA |
| 59 | EB curto | 1129/03 | Mucosa de TEG com MI compatível com EB | CC CA |
| 60 | EB longo | 1200/03 | Mucosa oxinto-cardica com inflamação crônica discreta, edema e foco de MI incompleta compatível com EB | CA |
| 61 | EB longo | 1462/03 | EB, negativo para displasia | CC CA |
| 62 | EB longo | 1537/03 | EB | CC CA |
| 63 | EB longo | 2498/03 | Inflamação crônica erosada em mucosa escamosa e glandular tipo cardica com MI | CC |

| | | | | |
|----|----------|----------------------|--|----------|
| 64 | EB longo | 2610/03 | Inflamação crônica ulcerada em mucosa de JEG com MI | CC CA |
| 65 | EB longo | 2927/03 – fração 1/2 | Inflamação crônica discreta a moderada em mucosa escamosa em continuidade com mucosa glandular tipo cardica com MI | CC |
| 66 | EB longo | 2927/03 – fração 2/2 | Inflamação crônica discreta a moderada em mucosa escamosa em continuidade com mucosa glandular tipo cardica com MI | CC CA |
| 67 | EB longo | 3710/03 – fração 1/3 | EB sem displasia | CC |
| 68 | EB longo | 3710/03 – fração 2/3 | EB sem displasia | CC CA |
| 69 | EB longo | 3710/03 – fração 3/3 | EB sem displasia | CC |
| 70 | EB curto | 3832/03 | Inflamação crônica discreta em mucosa glandular tipo cardica com congestão vascular | CA |
| 71 | EB longo | 4133/03 – fração 1/2 | Inflamação crônica moderada em mucosa glandular tipo cardica com MI | CA |
| 72 | EB longo | 4133/03 – fração 2/2 | Inflamação crônica moderada em mucosa glandular tipo cardica com MI | CA |
| 73 | EB longo | 4147/03 | Inflamação crônica discreta em mucosa do tipo cardica com extensa MI | CC CA |
| 74 | EB longo | 4310/03 – fração 1/3 | EB sem displasia | CC |
| 75 | EB longo | 4310/03 – fração 2/3 | EB sem displasia | CC |
| 76 | EB longo | 4310/03 – fração 3/3 | EB sem displasia | CC |
| 77 | EB curto | 5597/03 | Inflamação crônica discreta em mucosa escamosa em continuidade com mucosa glandular tipo cardica | CA |
| 78 | EB curto | 6001/03 | Inflamação crônica discreta em mucosa escamosa em continuidade com mucosa glandular tipo cardica com MI | CC CA |
| 79 | EB longo | 6497/03 | Inflamação crônica discreta em mucosa cardica com MI | CC |
| 80 | EB curto | 6484/03 – fração 1/2 | Inflamação crônica em mucosa escamosa em continuidade com mucosa glandular tipo cardica com MI | CC |
| 81 | EB curto | 6484/03 – fração 2/2 | Inflamação crônica em mucosa escamosa em continuidade com mucosa glandular tipo cardica com MI | CC CA |
| 82 | EB curto | 6506/03 | Inflamação crônica discreta em mucosa escamosa e glandular tipo cardica com extensa MI | CC CA |
| 83 | EB curto | 7134/03 | Inflamação crônica discreta em mucosa escamosa em continuidade com mucosa glandular tipo cardica | CA |

| | | | | |
|----|----------|---------|--|----------|
| 84 | EB longo | 7225/03 | Inflamação crônica moderada em mucosa glandular tipo oxínto-cardíaca, com MI e metaplasia pancreática | CC CA |
| 85 | EB longo | 7229/03 | Inflamação crônica discreta em mucosa escamosa em continuidade com mucosa glandular tipo cardíaca com MI | CC |
| 86 | EB longo | 7354/03 | Inflamação crônica discreta em mucosa escamosa em continuidade com mucosa glandular tipo cardíaca com MI | CC CA |

EB: esôfago de Barrett; MI: metaplasia intestinal; TEG: transição esofagogástrica; CC: células caliciformes; CA: células colunares azuis