

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EGFR NA SEQUÊNCIA DRGE, BARRETT E ADENOCARCINOMA DE
ESÔFAGO**

GUILHERME PRETTO

PORTO ALEGRE

2011

GUILHERME PRETTO

**EGFR NA SEQUÊNCIA DRGE, BARRETT E ADENOCARCINOMA DE
ESÔFAGO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas: Cirurgia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

**TÍTULO ALTERNATIVO: EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO RECEPTOR
DO FATOR DE CRESCIMENTO EPITELIAL NA SEQUÊNCIA DRGE, BARRETT E
ADENOCARCINOMA DE ESÔFAGO**

Orientador: Prof. Dr. Richard Ricachenevsky Gurski

PORTO ALEGRE

2011

Aos meus pais Arthur Alexandre Pretto e Neuza Gonçalves Pretto,
pelo amor incondicional e pelos cuidados dedicados a mim e meus irmãos,
sempre preocupados com nossa felicidade,
e ainda pelo exemplo de pessoas com princípios e caráter irretocáveis.

**A ciência é um instrumento pelo qual tentamos
entender e controlar o imprevisível e o acaso.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Richard Ricachenevsky Gurski, Professor da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela paciência e cooperação não só na formulação deste trabalho, mas também no dia a dia.

Ao Prof. Dr. Marcelo Binato, Professor da Universidade Federal de Santa Maria, por disponibilizar o resultado de tanto esforço pessoal na confecção de seu doutorado, o que propiciou a realização deste trabalho.

A Professora Doutora em Patologia Luise Meurer, que colaborou na realização deste trabalho com simplicidade e avidez, principalmente, pela sabedoria no conhecimento da patologia gastrointestinal.

Ao Dr. Daniel Navarini, Cirurgião do Aparelho Digestivo, colega e amigo, cuja iniciativa foi indispensável nos primeiros passos deste estudo e apoio imprescindível na realização desta pesquisa.

Ao Laboratório de Patológica do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, especialmente a técnica Flávia, pela presteza e competência com que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Wolfgang William Schmidt Aguiar, colega cirurgião que compartilhou seus conhecimentos em bioestatística sendo fundamental na confecção e entendimento dos resultados.

Ao programa de Pós-graduação em Medicina - Cirurgia, pela oportunidade, pela paciência e pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela oportunidade e toda infra-estrutura disponibilizada para a realização de pesquisa no nosso meio.

Aos professores do Departamento de Cirurgia e aos cirurgiões contratados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela constante dedicação a formação médica. Certamente um pouco dos ensinamentos de cada um formou a minha conduta como cirurgião.

Aos meus colegas cirurgiões formados pela residência médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela convivência e tolerância e por dividirem seus ensinamentos.

Aos meus amigos que no dia a dia compartilharam a minha companhia cooperando e incentivando a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 - Esofagite Grau A. (Los Angeles).....	12
Figura 2 - Esofagite Grau B (Los Angeles).....	12
Figura 3 - Esofagite Grau C (Los Angeles).....	13
Figura 4 - Esofagite Grau D (Los Angeles).....	13
Figura 5 - Esquema da cascata de reações após a estimulação do EGFR demonstrando as conseqüências celulares.....	17

Artigo Científico

Tabela 1: Características dos pacientes.....	33
Figura 1: Biópsia esofágica de paciente com DRGE com esofagite grau A na endoscopia e esofagite leve no achado anatomopatológico com expressão negativa do EGFR.....	33
Figura 2: Biópsia esofágica de paciente com DRGE com esofagite grau A na endoscopia e esofagite leve no achado anatomopatológico com expressão positiva do EGFR.....	34
Figura 3: Biópsia esofágica de paciente com doença de Barrett com expressão positiva do EGFR.....	34
Figura 4: Biópsia esofágica de paciente com doença de Barrett com expressão negativa do EGFR.....	35
Figura 5: Análise Imuno-histoquímica do EGFR conforme Classificação Anatomopatológica..	35
Figura 6: Análise Imuno-histoquímica do EGFR conforme Classificação Endoscópica.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

DRGE	Doença do Refluxo Gastroesofágico
RTEEI	Relaxamento Transitório do Esfíncter Esofágico Inferior
E EI	Esfíncter Esofágico Inferior
HH	Hérnia Hiatal
EGF	Fator de Crescimento Epitelial
TGFa	Fator de Crescimento a
NERD	Doença do Refluxo Não Erosiva
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
GCEEID	Grupo de Cirurgia de Esôfago, Estômago e Intestino Delgado
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
PBS	Phosphate-buffered Saline

SUMÁRIO

Revisão da Literatura	09
Introdução	09
Manifestações Clínicas	09
Etiopatogenia da DRGE	10
Classificação	12
Alterações histológicas	14
Progressão da DRGE	14
Esôfago de Barrett	14
Neoplasia de esôfago	15
Receptor do Fator de Crescimento Epitelial.....	16
Referências Bibliográficas	19
Objetivo	24
Artigo Científico Redigido em Português	25
Resumo	27
Introdução	28
Material e métodos	29
Resultados	32
Discussão	37
Conclusão	41
Referências Bibliográficas	42
Artigo Científico Redigido em Inglês	45
Abstract	47
Introduction	48
Material and Methods	50
Results	52
Discussion	57
Conclusions	61
References	62

REVISÃO DA LITERATURA

Introdução

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é uma das doenças mais frequentes no consultório do gastroenterologista e sua prevalência nas últimas décadas vem aumentando significativamente.¹ Estudos populacionais demonstram que aproximadamente 20% das pessoas apresentam sintomas de refluxo ao menos uma vez por semana e até 60% apresentam sintomas ocasionais.^{2,3} Estudo avaliando a população brasileira identificou uma prevalência de um ou dois episódios semanais de refluxo em 12% das pessoas.⁴

Segundo definição ocorrida no Consenso de Montreal, a DRGE caracteriza-se como a condição na qual o refluxo do conteúdo gástrico causa sintomas incomodativos e/ou complicações.⁵ Um aspecto positivo desta classificação é a falta de necessidade de exames complementares para a caracterização da DRGE o que facilita sua aplicação no atendimento primário à saúde.⁶ Um conjunto de especialistas brasileiros definiu a DRGE como uma afecção crônica decorrente do fluxo retrógrado de parte do conteúdo gastroduodenal para o esôfago e/ou órgãos adjacentes, acarretando variável espectro de sintomas (esofágicos ou extra-esofágicos), associados ou não a lesões teciduais.¹

Manifestações Clínicas

Apesar de ser uma doença, a princípio, benigna a DRGE produz impacto negativo na qualidade de vida das pessoas acometidas.⁷ Estima-se que a DRGE seja responsável por até 75% das queixas referentes a doenças do esôfago.⁸ Podemos distinguir duas formas de apresentação clínica da DRGE: aquela com os sintomas esofágicos ou típicos e/ou aquela com sintomas extra-esofágicos ou atípicos.^{9, 10} A principal manifestação clínica da DRGE é a sensação de queimação retroesternal ou pirose, presente em mais de 60% dos casos.¹¹ É um sintoma caracterizado como um desconforto ou sensação de queimação que ocorre atrás do esterno, iniciando-se no epigástrico e com irradiação para a região cervical.¹² A regurgitação é a percepção do retorno do conteúdo gástrico ou esofágico na boca ou orofaringe, sendo o segundo sintoma mais comum. Deve ser diferenciada de vômito pela ausência de náuseas ou contração abdominal.¹² Outras manifestações são a disfagia e salivação excessiva.^{13, 14}

Outra forma de apresentação da DRGE são os sintomas extra-esofágicos. A DRGE tem sido associada a sintomas pulmonares e de doenças de vias aéreas inferiores como asma, tosse crônica, bronquite, pneumonia aspirativa e fibrose pulmonar idiopática; sinais e sintomas otorrinolaringológicos incluindo rouquidão, laringite, estenose subglótica, granuloma de prega

vocal e carcinoma de laringe, além de outras manifestações extra-esofágicas como dor torácica não cardíaca, erosão dentária, sinusite, faringite e apnéia do sono.¹⁵⁻¹⁷ A maioria dos pacientes com os sintomas extra-esofágicos da DRGE não apresentam os sintomas típicos. Isto confere dificuldade em se fazer o diagnóstico da DRGE com sintomas atípicos. Sem os sintomas clássicos da DRGE a monitorização do pH esofágico de 24 horas (pHmetria-24h), torna-se uma ferramenta útil para se documentar o refluxo patológico.^{15, 18} Dor torácica indistinguível clinicamente da angina cardíaca também é uma forma de apresentação da DRGE, sendo que a DRGE é a principal causa de dor torácica de origem não cardíaca.^{9, 19, 20}

Etiopatogenia da DRGE

A DRGE é multifatorial na sua etiologia, sendo o resultado da conseqüência prejudicial do conteúdo refluído do estômago, dos mecanismos de *clearence* esofágico e da resistência da mucosa esofágica.²¹ A gravidade da DRGE depende da quantidade de conteúdo refluído para dentro do esôfago, do tempo de permanência da secreção em contato com a mucosa esofágica, da suscetibilidade desta ao refluxo e da capacidade do esôfago de impulsionar o suco gástrico de volta para o estômago.^{22, 23}

Sabe-se que relaxamentos transitórios do Esfíncter Esofágico Inferior (RTEEI) ocorrem com freqüência muito alta nos pacientes com DRGE e que a maioria dos eventos de refluxo registrados pela pHmetria de 24 hs são precedidos por este tipo de evento.²⁴ Cerca de 70% dos episódios de refluxo nos pacientes com DRGE ocorrem relacionados aos RTEEIs. Através dos RTEEIs explica-se porque pacientes que possuem EEI com pressão de repouso normal desenvolvem DRGE. Repetidos RTEEIs levam a freqüentes exposições da mucosa esofágica ao conteúdo gástrico causando dano ao esôfago. Com o tempo, o EEI vai perdendo seu tônus de repouso e evoluindo para uma fase mais avançada da DRGE. O EEI passa a apresentar baixos valores pressóricos do tônus de repouso com piora das características do refluxo e o agravamento da doença.²⁴⁻²⁹

Outro fator que facilita o retorno do conteúdo gástrico para o esôfago é a presença de hérnia de hiato (HH).³⁰ Estima que as HHs ocorrem em cerca de 50 - 94% dos pacientes com DRGE e são mais freqüentes nos que apresentam esofagite do que entre os que não apresentam.^{27, 28, 31} A presença da HH predispõem o refluxo gastroesofágico em parte pelo fato da perda do pinçamento diafragmático na constituição da barreira gastroesofágica antirefluxo. A presença de HH também facilita o refluxo gastroesofágico por promover uma disfunção do esfíncter esofágico inferior (EEI) decorrente de seu deslocamento cranial e a mudança das características de pressão ao qual está submetido. Por esta alteração anatômica, o EEI tem uma

diminuição do seu comprimento total, perde ou diminui sua porção abdominal e reduz sua pressão de repouso. A mudança na posição do EEI devido a presença de HH também está associado a disfunção motora peristáltica de esôfago.^{24, 27, 28, 31-36}

Uma vez havendo material refluído no esôfago a capacidade de *clearance* ou esvaziamento esofágico vai influenciar na presença de DRGE. O *clearance* depende do bom funcionamento motor através da função peristáltica do corpo esofágico.²⁸ Uma diminuição desta capacidade resulta em um aumento no tempo de exposição ácida anormal sobre a mucosa, aumentando o dano esofágico.^{28, 35, 37} Acredita-se que aproximadamente 40 - 60% dos pacientes com DRGE apresentam algum tipo de alteração de motilidade.^{38, 39} Pacientes com motilidade esofágica ineficaz apresentam episódios mais intensos de refluxo, maior dificuldade no *clearance* esofágico e maior incidência de sintomas respiratórios. Em geral, quanto pior a função peristáltica do esôfago, mais grave a DRGE.⁴⁰ Acredita-se que o mal funcionamento peristáltico do esôfago pode ser recuperado com o início precoce do tratamento.^{18, 38, 41, 42}

Além do esvaziamento esofágico existem mecanismos de defesa presentes na saliva e no próprio epitélio do esôfago. A resistência do epitélio esofágico pode ser subdividido em fatores pré-epiteliais, epiteliais e pós epiteliais.⁴³ Uma vez que os fatores agressivos da DRGE estão agindo no lúmen esofágico, os fatores de defesa pré-epiteliais são a primeira barreira. Os elementos que constituem a defesa pré-epitelial são: bicarbonato, mucinas, fator de crescimento epitelial (EGF), prostaglandina E2, fator de crescimento a (TGFA). Estas substâncias são produzidas nas glândulas salivares e nas glândulas da submucosa do próprio esôfago.⁴⁴ Estudos experimentais demonstraram que a retirada cirúrgica das glândulas salivares esta associada a severidade da esofagite devido a deficiência de EGF.⁴⁵

As propriedades de defesa intrínsecas do epitélio são constituídas por fatores estruturais e funcionais tais como proliferação epitelial, migração de células e transporte de íons. É sabido que os espaços intercelulares dilatados são uma característica do epitélio esofágico de pacientes com DRGE e doença do refluxo gastroesofágico não erosiva (NERD - nonerosive reflux disease).⁴⁶ Junções intercelulares exercem um papel significativo em manter as defesas e a integridade do epitélio. A ZO-1 é um exemplo de junção intercelular que associado a proteínas como claudinas, ocludinas, citoesqueleto de actina e moléculas de adesão atuam mantendo a integridade do epitélio esofágico. A expressão deste tipo de junção intercelular é regulada por vários fatores incluindo o EGF.⁴⁷

Classificação

Na avaliação endoscópica a DRGE pode se manifestar com um amplo espectro de características, desde uma mucosa normal a uma severa alteração endoscópica associada a extensas anormalidades histológicas.¹⁴ O refluxo ácido anormal na luz esofágica induz diferentes graus de lesão da mucosa esofágica. Cerca de um terço dos pacientes com DRGE têm achados positivos endoscopicamente, enquanto 60% dos pacientes não apresentam alterações endoscópicas da mucosa e são denominados como doença do refluxo gastroesofágico não erosiva (NERD).⁴⁸⁻⁵⁰ O achado endoscópico de esofagite é considerado como uma complicação inicial da DRGE, e segundo a classificação de Los Angeles⁵¹ é dividida em quatro graus:

Grau A: uma ou mais erosões, cada uma menor ou igual a 5 mm de comprimento.



Figura 1 - Esofagite Grau A. (Los Angeles)

Grau B: pelo menos uma erosão maior do que 5 mm de comprimento, mas não contínuas entre os ápices de duas pregas esofágicas.



Figura 2 - Esofagite Grau B (Los Angeles)

Grau C: erosões contínuas (ou convergentes) entre os ápices de pelo menos duas pregas, envolvendo menos do que 75% do órgão .



Figura 3 - Esofagite Grau C (Los Angeles)

Grau D: erosão que compromete pelo menos $\frac{3}{4}$ da circunferência da luz esofágica.



Figura 4 - Esofagite Grau D (Los Angeles)

Os pacientes com endoscopia normal e com sintomas de DRGE, sendo estes sintomas relacionados ao refluxo ácido no esôfago distal, são categorizados como NERD.⁵² É importante a relação dos sintomas com o refluxo para o esôfago distal, este detalhe ajuda na diferenciação dos pacientes com NERD e dos pacientes com sintomas de refluxo funcionais.⁵² ⁵³ Essas diferenciações tornam a elaboração de estudos epidemiológicos, avaliando a incidência de NERD na população, em geral muito difícil.⁵⁰ Analisando estudos de coorte e estudos clínicos se constata o surgimento de esofagite em pacientes previamente caracterizados como NERD.⁵³⁻⁵⁶ Estima-se que aproximadamente 10% dos pacientes com NERD irão desenvolver esofagite erosiva no período de 10 anos mesmo sob avaliação periódica.⁵³

Embora várias características clínicas dos pacientes com NERD terem sido identificadas, são pouco claros os mecanismos que geram a pirose, bem como de que forma os irritantes presentes no conteúdo refluído estimulam as terminações nervosas na submucosa do esôfago sem lesões macroscópicas na mucosa.⁵⁷

Alterações histológicas

Uma série de alterações histológicas ocorrem no epitélio esofágico conseqüente ao refluxo gastroesofágico: espessamento das células da camada basal, alongamento das papilas epiteliais, aumento do número de células intraepiteliais, subdiferenciação de células intraepiteliais (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos), dilatação dos espaços intercelulares, aumento do número de eosinófilos na camada apical do epitélio, acantose glicogênica, ectasia e aumento do número dos capilares intrapapilares.^{58, 59} Existe uma relação entre a severidade da esofagite e achados como espessamento das células da camada basal, alongamento das papilas epiteliais e aumento do número de células inflamatórias intraepiteliais.⁶⁰

Progressão da DRGE

Alguns autores consideram NERD e esofagite erosiva duas doenças distintas.⁶¹ O grupo de pacientes com NERD, entretanto, pode representar, dentro das diversas etapas da DRGE, a fase inicial da doença. Este grupo teria apenas fatores de proteção da mucosa mais fortes do que aqueles que desenvolvem as formas complicadas da DRGE, enquanto que o surgimento da esofagite representaria a falha dos mecanismos defensivos da mucosa do esôfago.⁶² Uma vez que o ácido altera a estrutura normal do epitélio esofágico, produzindo dilatação dos espaços intercelulares, a penetração do ácido causa mudança no pH tissular, troca de íons com as células e aumento da acidez intracelular. Este último fato representa o início da morte celular.⁵⁷ A complicação mais importante desse processo inflamatório ocorre em conseqüência da cicatrização desordenada das lesões erosivas da mucosa esofágica, quando as células da camada basal do epitélio escamoso, ou dos ductos das glândulas submucosas esofágicas, diferenciam-se em células colunares que recobrem o esôfago distal em substituição ao epitélio escamoso originando o esôfago de Barrett.^{61, 63}

Esôfago de Barrett

O Esôfago de Barrett é uma condição clínica na qual o epitélio escamoso estratificado que normalmente reveste o esôfago distal é substituído por um epitélio colunar com metaplasia intestinal associado a presença de células caliciformes (*goblet cels*).^{64, 65} Representa a conseqüência histológica mais grave do refluxo gastroesofágico crônico, desenvolvendo-se em aproximadamente 8% a 20% dos pacientes que sofrem de DRGE.^{66, 67} Sabe-se que o epitélio metaplásico no esôfago pode progredir para o câncer. O risco anual de pacientes com Esôfago de Barrett de desenvolverem adenocarcinoma é de 0,5% a 2%, o que representa um risco 30 a 125 vezes maior do que o da população geral.^{63, 66, 68, 69}

A razão pela qual somente uma minoria dos pacientes com DRGE desenvolve o Esôfago de Barrett é desconhecida.⁷⁰ Da mesma forma, se desconhece o modo exato pelo qual a seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma se inicia. Sabe-se que esta a seqüência surge a partir de alterações histológicas caracterizadas, inicialmente, por um processo inflamatório crônico conseqüente ao refluxo gastroduodenal sobre a mucosa esofágica.⁶³ A partir do processo inflamatório sobre a mucosa esofágica, as células podem adquirir, ao longo do tempo, alterações funcionais como resistência a apoptose, aumento da proliferação celular e instabilidade genômica, com aumento da expressão de diversas proteínas específicas, relacionadas ao controle do ciclo celular.⁷¹⁻⁷³ A caracterização do mecanismo molecular que promove a progressão do Esôfago de Barrett pode levar a identificação de potenciais marcadores genéticos preditivos para a estimativa do risco de desenvolvimento de câncer esofágico.

Neoplasia de esôfago

As neoplasias do trato gastrointestinal superior (GI), originando-se do esôfago, junção gastroesofágica e estômago, constituem um importante problema de saúde em todo o mundo. Modificações no padrão histológico e na localização dos tumores gastrointestinais ocorreram nos Estados Unidos e Europa.⁷⁴ Além do aumento na incidência de adenocarcinoma em comparação ao carcinoma epidermóide, tem-se constatado um aumento da incidência de tumores localizados no terço distal do esôfago em relação aos tumores localizados na junção gastroesofágica.⁷⁵

A neoplasia de esôfago apresenta dois tipos histológicos mais comuns que são: carcinoma epidermóide e adenocarcinoma. O carcinoma epidermóide é a forma mais prevalente em regiões endêmicas do mundo e o adenocarcinoma é o mais comum em áreas não endêmicas, como a América do Norte e em muitos países da Europa Ocidental. Na nossa população o carcinoma epidermóide foi o diagnóstico em torno de 80% dos pacientes acometidos por neoplasia de esôfago ou junção gastroesofágica avaliados na década de 90.⁷⁶

Fumo e álcool são fatores de risco para o carcinoma epidermóide. Tabagismo e consumo regular de álcool são fatores de risco moderado para o adenocarcinoma. Os principais fatores de risco para o adenocarcinoma de esôfago são: a DRGE e o Esôfago de Barrett. Além disso, o câncer de esôfago está associado a obesidade e é mais comum em homens.⁷⁷

No momento do diagnóstico, cerca de 30% dos pacientes se apresentam com câncer que se estende além dos limites loco-regionais. Menos de 60% dos pacientes com doença

locorregional são passíveis de uma ressecção curativa. Cerca de 70% a 80% dos espécimes ressecados apresentam metástases nos linfonodos regionais. A sobrevida geral em cinco anos após o diagnóstico é menor do que 20%.⁷⁸

Receptor do Fator de Crescimento Epitelial

O EGF é um polipeptídeo secretado pelas glândulas submandibulares e outras porções do tubo digestivo que tem papel importante na cicatrização, manutenção da integridade do tecido e maturação do epitélio.^{79, 80} Estudos experimentais em animais demonstraram que a administração de EGF acelera a cicatrização tecidual, sendo sua utilização limitada devido aos efeitos tóxicos da substância.⁸¹ O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é uma proteína pertencente à superfamília dos receptores da tirosinaquinase, os quais atuam como mediadores da resposta celular a diversos fatores extracelulares.⁸² Os receptores tirosinaquinase são mediadores primários de muitos sinais e determinam o destino do crescimento, diferenciação, migração e morte celular.⁸³ A proteína EGFR consiste de três regiões: a região de ligação extracelular, a região intracelular com atividade tirosinaquinase e uma região transmembrana.⁸⁴

A alta expressão dos receptores tirosinaquinase tem um efeito deletério sobre o crescimento celular normal, gerando transformação. O receptor do fator de crescimento epidérmico, também chamado de ErbB-1, fornece uma das primeiras ligações entre uma atividade oncogênica e biologia tumoral humana.⁸⁵ Por exemplo, a alta expressão do receptor está associada com carcinoma não-pequenas células de pulmão e correlacionada com alta proporção de metástase, pobre diferenciação celular e redução na sobrevivência neste tipo de tumor.^{86, 87}

A proliferação celular é a resposta predominante das células normais à ativação do EGFR.⁸⁷ Muitos tumores sólidos apresentam alta expressão desta proteína, incluindo tumores de bexiga, cabeça e pescoço, mama, estômago, cólon e reto.⁸⁸

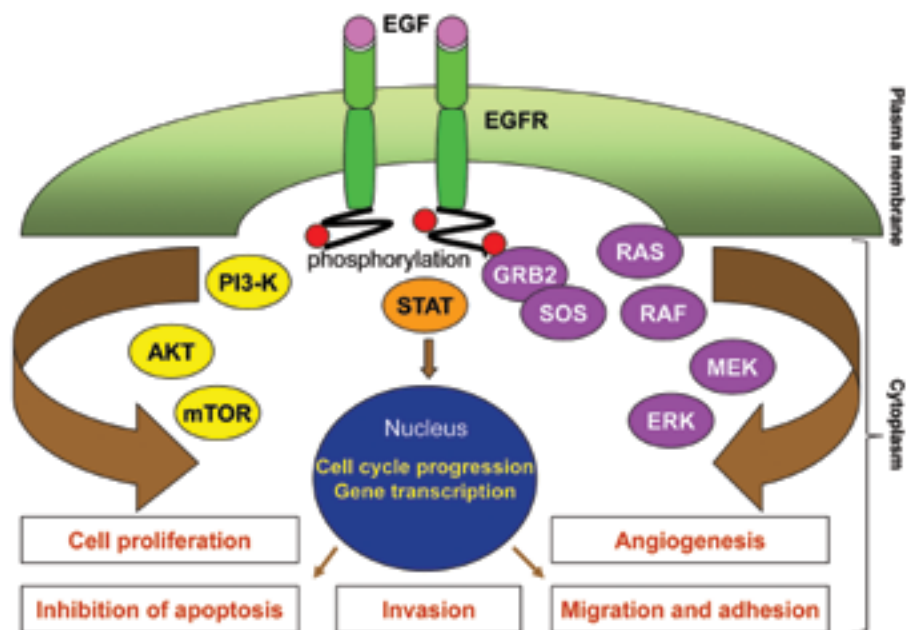


Figura 5: Esquema da cascata de reações após a estimulação do EGFR demonstrando as conseqüências celulares. Adaptado de Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Carcinoma: An Overview. Rohit Bhargava Connection 2009: 40-43.

Através da análise de citometria de fluxo se constatou o aumento da expressão do EGFR nas áreas que apresentaram maior grau de displasia esofágica, quando comparado com a mucosa de Barrett sem displasia ou mucosa cárdica normal.⁸⁹ Esse aumento da expressão dos receptores do fator de crescimento epitelial pode refletir o maior potencial de malignidade. O EGFR aumenta com a progressão do Esôfago de Barrett para adenocarcinoma de esôfago.⁹⁰ Além disso, a expressão desta proteína pode exercer uma função na carcinogênese esofágica, correlacionando-se com o avanço da classificação patológica do tumor e com o aumento de incidência de metástases linfonodais e com pior prognóstico.^{88,91}

A presença do EGFR em patologias benignas e/ou pré-malignas é pouco documentada. A expressão do EGFR em pacientes com NERD e graus menos intensos de esofagite ainda não foi avaliada.

A DRGE se expressa com uma ampla variedade de minúcias. Os fatores que explicam essa diversidade de manifestações não são claramente identificados. O papel do EGF na manutenção da integridade do epitélio esofágico já foi demonstrado.^{79, 92-94} O EGFR apresenta correlação com o potencial de malignidade nas alterações epiteliais esofágicas. Apesar destes conhecimentos, a literatura carece de informações relacionadas à expressão do

EGFR em pacientes com DRGE sem alterações no epitélio esofágico e em graus menos intensos de esofagite, correlacionando os resultados com achados em pacientes com doença de Barrett e adenocarcinoma de esôfago. O melhor entendimento da expressão do EGFR nas diferentes fases de evolução da DRGE pode ter papel importante no esclarecimento das alterações que ocorrem na mucosa esofágica de pacientes com refluxo gastroesofágico.

Atualmente, o tratamento da DRGE é baseado no controle do pH do conteúdo refluído para o esôfago ou através do uso de bloqueadores de bomba de prótons, ou através da correção cirúrgica com correção da barreira anti-refluxo. Não existem terapias direcionadas para o aumento da resistência do epitélio, ao menos com uso clínico conhecido. Por isso, o estudo das alterações do epitélio esofágico na DRGE, o reconhecimento de potenciais marcadores na evolução da doença e pesquisas para o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos são possíveis alternativas para o manejo adequado desta patologia que apesar de benigna tem grande impacto pela sua prevalência e pelo seu potencial de evolução maligna em alguns casos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moraes-Filho JP, Navarro-Rodriguez T, Barbuti R, Eisig J, Chinzon D, Bernardo W. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease: an evidence-based consensus. *Arq Gastroenterol* 2010;47:99-115.
2. Locke GR, 3rd, Talley NJ, Fett SL, Zinsmeister AR, Melton LJ, 3rd. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 1997;112:1448-56.
3. Jones RH, Lydeard SE, Hobbs FD, et al. Dyspepsia in England and Scotland. *Gut* 1990;31:401-5.
4. Moraes-Filho JP, Chinzon D, Eisig JN, Hashimoto CL, Zaterka S. Prevalence of heartburn and gastroesophageal reflux disease in the urban Brazilian population. *Arq Gastroenterol* 2005;42:122-7.
5. Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1900-20; quiz 43.
6. Flook N, Jones R, Vakil N. Approach to gastroesophageal reflux disease in primary care: Putting the Montreal definition into practice. *Can Fam Physician* 2008;54:701-5.
7. Wang R, Zou D, Ma X, et al. Impact of gastroesophageal reflux disease on daily life: the Systematic Investigation of Gastrointestinal Diseases in China (SILC) epidemiological study. *Health Qual Life Outcomes* 2010;8:128.
8. Peters JH, DeMeester TR. Gastroesophageal reflux. *Surg Clin North Am* 1993;73:1119-44.
9. DeVault KR, Castell DO. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:190-200.
10. Kahrilas PJ. GERD pathogenesis, pathophysiology, and clinical manifestations. *Cleve Clin J Med* 2003;70 Suppl 5:S4-19.
11. Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Johansson S. Epidemiology of gastroesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut* 2005;54:710-7.
12. Nasi A, de Moraes-Filho JP, Ceconello I. [Gastroesophageal reflux disease: an overview]. *Arq Gastroenterol* 2006;43:334-41.
13. Kahrilas PJ, Shaheen NJ, Vaezi MF. American Gastroenterological Association Institute technical review on the management of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 2008;135:1392-413, 413 e1-5.
14. Kahrilas PJ. Clinical practice. Gastroesophageal reflux disease. *N Engl J Med* 2008;359:1700-7.
15. Gurski RR, da Rosa AR, do Valle E, de Borba MA, Valiati AA. Extraesophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease. *J Bras Pneumol* 2006;32:150-60.
16. DeMeester TR, Bonavina L, Iacone C, Courtney JV, Skinner DB. Chronic respiratory symptoms and occult gastroesophageal reflux. A prospective clinical study and results of surgical therapy. *Ann Surg* 1990;211:337-45.
17. Everett CF, Morice AH. Gastroesophageal reflux and chronic cough. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2004;50:205-13.
18. Fouad YM, Katz PO, Hatlebakk JG, Castell DO. Ineffective esophageal motility: the most common motility abnormality in patients with GERD-associated respiratory symptoms. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1464-7.
19. Eslick GD, Coulshed DS, Talley NJ. Diagnosis and treatment of noncardiac chest pain. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;2:463-72.

20. Dughera L, Navino M, Cassolino P, Pellicano R. The diagnosis of gastroesophageal reflux disease. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2007;53:143-52.
21. Kongara K, Varilek G, Soffer EE. Salivary growth factors and cytokines are not deficient in patients with gastroesophageal reflux disease or Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci* 2001;46:606-9.
22. Campos GM, Peters JH, DeMeester TR, Oberg S, Crookes PF, Mason RJ. The pattern of esophageal acid exposure in gastroesophageal reflux disease influences the severity of the disease. *Arch Surg* 1999;134:882-7; discussion 7-8.
23. Castell DO, Murray JA, Tutuian R, Orlando RC, Arnold R. Review article: the pathophysiology of gastro-oesophageal reflux disease - oesophageal manifestations. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20 Suppl 9:14-25.
24. Crookes PF. Physiology of reflux disease: role of the lower esophageal sphincter. *Surg Endosc* 2006;20 Suppl 2:S462-6.
25. van Herwaarden MA, Samsom M, Smout AJ. Excess gastroesophageal reflux in patients with hiatus hernia is caused by mechanisms other than transient LES relaxations. *Gastroenterology* 2000;119:1439-46.
26. Grossi L, Ciccaglione AF, Travaglini N, Marzio L. Transient lower esophageal sphincter relaxations and gastroesophageal reflux episodes in healthy subjects and GERD patients during 24 hours. *Dig Dis Sci* 2001;46:815-21.
27. Kahrilas PJ, Shi G, Manka M, Joehl RJ. Increased frequency of transient lower esophageal sphincter relaxation induced by gastric distention in reflux patients with hiatal hernia. *Gastroenterology* 2000;118:688-95.
28. Kahrilas PJ, Lee TJ. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease. *Thorac Surg Clin* 2005;15:323-33.
29. Mittal RK, Holloway RH, Penagini R, Blackshaw LA, Dent J. Transient lower esophageal sphincter relaxation. *Gastroenterology* 1995;109:601-10.
30. Allison PR. Reflux esophagitis, sliding hiatal hernia, and the anatomy of repair. *Surg Gynecol Obstet* 1951;92:419-31.
31. Fornari F, Callegari-Jacques SM, Scussel PJ, Madalosso LF, Barros EF, Barros SG. Is ineffective oesophageal motility associated with reflux oesophagitis? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007;19:783-7.
32. Zaninotto G, DeMeester TR, Schwizer W, Johansson KE, Cheng SC. The lower esophageal sphincter in health and disease. *Am J Surg* 1988;155:104-11.
33. DeMeester TR, Johnson LF. Position of the distal esophageal sphincter and its relationship to reflux. *Surg Forum* 1975;26:364-6.
34. Fein M, Ritter MP, DeMeester TR, et al. Role of the lower esophageal sphincter and hiatal hernia in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. *J Gastrointest Surg* 1999;3:405-10.
35. Xenos ES. The role of esophageal motility and hiatal hernia in esophageal exposure to acid. *Surg Endosc* 2002;16:914-20.
36. Pellegrini CA, DeMeester TR, Skinner DB. Response of the distal esophageal sphincter to respiratory and positional maneuvers in humans. *Surg Forum* 1976;27:380-2.
37. Kahrilas PJ, Dodds WJ, Hogan WJ, Kern M, Arndorfer RC, Reece A. Esophageal peristaltic dysfunction in peptic esophagitis. *Gastroenterology* 1986;91:897-904.
38. Diener U, Patti MG, Molena D, Fisichella PM, Way LW. Esophageal dysmotility and gastroesophageal reflux disease. *J Gastrointest Surg* 2001;5:260-5.
39. Lemme EM, Abrahao-Junior LJ, Manhaes Y, Shechter R, Carvalho BB, Alvariz A. Ineffective esophageal motility in gastroesophageal erosive reflux disease and in nonerosive reflux disease: are they different? *J Clin Gastroenterol* 2005;39:224-7.

40. Fibbe C, Layer P, Keller J, Strate U, Emmermann A, Zornig C. Esophageal motility in reflux disease before and after fundoplication: a prospective, randomized, clinical, and manometric study. *Gastroenterology* 2001;121:5-14.
41. Meneghetti AT, Tedesco P, Damani T, Patti MG. Esophageal mucosal damage may promote dysmotility and worsen esophageal acid exposure. *J Gastrointest Surg* 2005;9:1313-7.
42. Chrysos E, Prokopakis G, Athanasakis E, et al. Factors affecting esophageal motility in gastroesophageal reflux disease. *Arch Surg* 2003;138:241-6.
43. Orlando RC. Esophageal epithelial defense against acid injury. *J Clin Gastroenterol* 1991;13 Suppl 2:S1-5.
44. Marcinkiewicz M, Han K, Zbroch T, et al. The potential role of the esophageal pre-epithelial barrier components in the maintenance of integrity of the esophageal mucosa in patients with endoscopically negative gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1652-60.
45. Fujiwara Y, Higuchi K, Takashima T, et al. Roles of epidermal growth factor and Na⁺/H⁺ exchanger-1 in esophageal epithelial defense against acid-induced injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G665-73.
46. Barlow WJ, Orlando RC. The pathogenesis of heartburn in nonerosive reflux disease: a unifying hypothesis. *Gastroenterology* 2005;128:771-8.
47. Okuyama M, Fujiwara Y, Tanigawa T, et al. Roles of ZO-1 and epidermal growth factor in esophageal epithelial defense against acid. *Digestion* 2007;75:135-41.
48. Galmiche JP, Clouse RE, Balint A, et al. Functional esophageal disorders. *Gastroenterology* 2006;130:1459-65.
49. Modlin IM, Hunt RH, Malfertheiner P, et al. Diagnosis and management of non-erosive reflux disease--the Vevey NERD Consensus Group. *Digestion* 2009;80:74-88.
50. El-Serag HB. Epidemiology of non-erosive reflux disease. *Digestion* 2008;78 Suppl 1:6-10.
51. Lundell LR, Dent J, Bennett JR, et al. Endoscopic assessment of oesophagitis: clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification. *Gut* 1999;45:172-80.
52. Modlin IM, Hunt RH, Malfertheiner P, et al. Non-erosive reflux disease--defining the entity and delineating the management. *Digestion* 2008;78 Suppl 1:1-5.
53. Pace F, Casini V, Pallotta S. Heterogeneity of endoscopy negative heartburn: epidemiology and natural history. *World J Gastroenterol* 2008;14:5233-6.
54. Long JD, Orlando RC. Nonerosive reflux disease: a pathophysiologic perspective. *Curr Gastroenterol Rep* 2008;10:200-7.
55. Pace F, Bollani S, Molteni P, Bianchi Porro G. Natural history of gastro-oesophageal reflux disease without oesophagitis (NERD)--a reappraisal 10 years on. *Dig Liver Dis* 2004;36:111-5.
56. Fullard M, Kang JY, Neild P, Poullis A, Maxwell JD. Systematic review: does gastro-oesophageal reflux disease progress? *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24:33-45.
57. Wang C, Hunt RH. Precise role of acid in non-erosive reflux disease. *Digestion* 2008;78 Suppl 1:31-41.
58. Ismail-Beigi F, Horton PF, Pope CE, 2nd. Histological consequences of gastroesophageal reflux in man. *Gastroenterology* 1970;58:163-74.
59. Ismail-Beigi F, Pope CE, 2nd. Distribution of the histological changes of gastroesophageal reflux in the distal esophagus of man. *Gastroenterology* 1974;66:1109-13.
60. Vieth M. Structural abnormalities of endoscopy-negative reflux disease--real or perceived? *Digestion* 2008;78 Suppl 1:24-30.
61. Orlando RC. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease. *J Clin Gastroenterol* 2008;42:584-8.

62. Achem SR. Endoscopy-negative gastroesophageal reflux disease. The hypersensitive esophagus. *Gastroenterol Clin North Am* 1999;28:893-904, vii.
63. Orlando RC. Pathogenesis of reflux esophagitis and Barrett's esophagus. *Med Clin North Am* 2005;89:219-41, vii.
64. Jankowski J, Barr H, Wang K, Delaney B. Diagnosis and management of Barrett's oesophagus. *BMJ* 2010;341:c4551.
65. Spechler SJ. Clinical practice. Barrett's Esophagus. *N Engl J Med* 2002;346:836-42.
66. DeMeester SR, DeMeester TR. Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus: fifty years of controversy. *Ann Surg* 2000;231:303-21.
67. O'Connor JB, Falk GW, Richter JE. The incidence of adenocarcinoma and dysplasia in Barrett's esophagus: report on the Cleveland Clinic Barrett's Esophagus Registry. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2037-42.
68. Provenzale D, Schmitt C, Wong JB. Barrett's esophagus: a new look at surveillance based on emerging estimates of cancer risk. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2043-53.
69. Shaheen N, Ransohoff DF. Gastroesophageal reflux, barrett esophagus, and esophageal cancer: scientific review. *JAMA* 2002;287:1972-81.
70. Grotenhuis BA, van Lanschot JJ, Dinjens WN, Wijnhoven BP. The pathogenesis of Barrett's metaplasia and the progression to esophageal adenocarcinoma. *Recent Results Cancer Res* 2010;182:39-63.
71. Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Dvorak K, Garewal H. Field defects in progression to gastrointestinal tract cancers. *Cancer Lett* 2008;260:1-10.
72. Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001;233:322-37.
73. Souza RF, Krishnan K, Spechler SJ. Acid, bile, and CDX: the ABCs of making Barrett's metaplasia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G211-8.
74. Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF, Jr. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 1991;265:1287-9.
75. Falk J, Carstens H, Lundell L, Albertsson M. Incidence of carcinoma of the oesophagus and gastric cardia. Changes over time and geographical differences. *Acta Oncol* 2007;46:1070-4.
76. de Barros SG, Vidal RM, Luz LP, et al. [Prevalence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction in a 10 year period at a cancer referral center in southern Brazil]. *Arq Gastroenterol* 1999;36:32-6.
77. Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. *N Engl J Med* 2003;349:2241-52.
78. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60:277-300.
79. Jankowski J, Murphy S, Coghill G, et al. Epidermal growth factor receptors in the oesophagus. *Gut* 1992;33:439-43.
80. Jankowski J, Coghill G, Tregaskis B, Hopwood D, Wormsley KG. Epidermal growth factor in the oesophagus. *Gut* 1992;33:1448-53.
81. Reindel JF, Gough AW, Pilcher GD, Bobrowski WF, Sobocinski GP, de la Iglesia FA. Systemic proliferative changes and clinical signs in cynomolgus monkeys administered a recombinant derivative of human epidermal growth factor. *Toxicol Pathol* 2001;29:159-73.
82. Playford RJ, Hanby AM, Gschmeissner S, Peiffer LP, Wright NA, McGarrity T. The epidermal growth factor receptor (EGF-R) is present on the basolateral, but not the apical, surface of enterocytes in the human gastrointestinal tract. *Gut* 1996;39:262-6.
83. Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 1997;410:83-6.

84. Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 1997;8:1197-206.
85. Morgan S, Grandis JR. ErbB receptors in the biology and pathology of the aerodigestive tract. *Exp Cell Res* 2009;315:572-82.
86. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008;358:1160-74.
87. Koppert LB, Wijnhoven BP, van Dekken H, Tilanus HW, Dinjens WN. The molecular biology of esophageal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2005;92:169-90.
88. Wilkinson NW, Black JD, Roukhadze E, et al. Epidermal growth factor receptor expression correlates with histologic grade in resected esophageal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2004;8:448-53.
89. Jankowski J, Hopwood D, Pringle R, Wormsley KG. Increased expression of epidermal growth factor receptors in Barrett's esophagus associated with alkaline reflux: a putative model for carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1993;88:402-8.
90. Li Y, Wo JM, Ray MB, et al. Cyclooxygenase-2 and epithelial growth factor receptor up-regulation during progression of Barrett's esophagus to adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2006;12:928-34.
91. Wang KL, Wu TT, Choi IS, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Cancer* 2007;109:658-67.
92. Sakai Y, Nelson KG, Snedeker S, et al. Expression of epidermal growth factor in suprabasal cells of stratified squamous epithelia: implications for a role in differentiation. *Cell Growth Differ* 1994;5:527-35.
93. Qureshi FG, Tchorzewski MT, Duncan MD, Harmon JW. EGF and IGF-I synergistically stimulate proliferation of human esophageal epithelial cells. In: *J Surg Res. United States*; 1997:354-8.
94. Zhao J, Yang J, Vinter-Jensen L, Zhuang F, Gregersen H. Biomechanical properties of esophagus during systemic treatment with epidermal growth factor in rats. *Ann Biomed Eng* 2003;31:700-9.

OBJETIVO

- Avaliar a expressão imuno-histoquímica do EGFR em biópsias de esôfago de pacientes com DRGE, em pacientes com Esôfago de Barrett e em pacientes com adenocarcinoma de esôfago.

ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

EGFR NA SEQUÊNCIA DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO – ESÔFAGO DE BARRETT – ADENOCARCINOMA DE ESÔFAGO

Versão em Português

Autores:

Guilherme Pretto

Marcelo Binato

Daniel Navarini

Luise Meurer

Richard Ricachenevsky Gurski

Local de Realização:

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

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

Endereço para Correspondência:

Guilherme Pretto

Rua Santa Cecília 1373/316 Bairro Santana CEP 90420-041

Porto Alegre – RS – Brasil. Fone: 55 51 9955-0575 e 55 51 3330-1072

Email: ggpretto@gmail.com.br

RESUMO

Introdução: A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é uma patologia freqüente e com incidência crescente. As manifestações clínicas e endoscópicas são diversas sendo que as razões para estas diferenças são pouco entendidas. O receptor do fator de crescimento epitelial(EGFR) encontrado no epitélio do trato digestivo é importante na restauração deste epitélio mas apresenta uma expressão aumentada em diferentes neoplasias incluindo tumores esofágicos.

Objetivos: Avaliar a expressão imuno-histoquímica do EGFR em biópsias de esôfago de pacientes com DRGE ; em pacientes com esôfago de Barrett e pacientes com adenocarcinoma de esôfago.

Métodos: A expressão do EGFR foi determinada pela análise imuno-histoquímica de biópsias esofágicas de 194 pacientes com sintomas de refluxo entre janeiro de 2003 e dezembro de 2008. Conforme avaliação anatomopatológica foram divididos três grupos: pacientes com DRGE, pacientes com Esôfago de Barrett e pacientes com adenocarcinoma. A expressão da coloração do EGFR foi considerada positiva quando foi observada presença do corante na membrana.

Resultados: A média de idade da população estudada foi de 55,25 anos (30-90). Os pacientes com DRGE (n = 127) constituíram 65,5% da população; pacientes com Esôfago de Barrett (n = 24) 12,4%; e pacientes com adenocarcinoma (n = 43) 22,2%. A análise imuno-histoquímica do EGFR foi positiva em 19,1% dos casos (37/194). Nos pacientes com DRGE a expressão do EGFR foi positiva em 8,7% (11/127), no grupo de esôfago de Barrett 25% (6/24) dos pacientes e no grupo de adenocarcinoma 46,5% (20/43). A análise estatística evidenciou uma diferença significativa entre os três grupos com $p = 0,0001$.

Conclusão: Avaliando a expressão imuno-histoquímica do EGFR em biópsias de esôfago constatamos que os pacientes com DRGE apresentam uma menor expressão deste marcador quando comparados com pacientes com esôfago de Barrett e adenocarcinoma de esôfago. Os resultados demonstraram que a medida que há progressão da doença ocorre uma maior expressão do EGFR.

Palavras-Chave: EGFR, DRGE, adenocarcinoma de esôfago, Esôfago de Barrett

INTRODUÇÃO

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) é uma das doenças mais freqüentes no consultório do gastroenterologista e sua prevalência nas últimas décadas vem aumentando significativamente.¹ Estudos populacionais demonstram que aproximadamente 20% das pessoas apresentam sintomas de refluxo ao menos uma vez por semana e até 60% apresentam sintomas ocasionais.^{2,3} Estudo avaliando a população brasileira identificou uma incidência de um ou dois episódios semanais de refluxo em 12% das pessoas.⁴ A principal manifestação clínica da DRGE é a sensação de queimação retroesternal ou pirose, presente em mais de 60% dos casos. Outras manifestações são: regurgitação, disfagia, salivação excessiva dor torácica, rouquidão, asma, tosse crônica e infecções respiratórias de repetição.⁵⁻⁷

A DRGE é multifatorial na sua etiologia, sendo o resultado do desequilíbrio das propriedades prejudiciais do conteúdo refluído do estômago, dos mecanismos de *clearance* esofágico e da resistência da mucosa esofágica.⁸ A gravidade da DRGE depende da quantidade de conteúdo refluído para dentro do esôfago, do tempo de permanência da secreção em contato com a mucosa esofágica, da suscetibilidade desta ao refluxo e da capacidade do esôfago de impulsionar o suco gástrico de volta para o estômago.⁹⁻¹¹

As manifestações clínicas e endoscópicas da DRGE são muito variadas. Os mecanismos que geram essa diversidade de manifestações clínicas e endoscópicas são pouco claros.¹² O ácido gástrico é o principal fator de agressão ao epitélio. Os mecanismos de defesa estão presentes na saliva, no esvaziamento esofágico e na resistência do epitélio. A resistência do epitélio esofágico pode ser subdividido em fatores pré-epiteliais, epiteliais e pós-epiteliais.¹³ Os elementos que constituem a defesa pré-epitelial são: bicarbonato, mucinas, fator de crescimento epitelial (EGF), prostaglandina E2, fator de crescimento “a” (TGFa). Estas substâncias são produzidas nas glândulas salivares e nas glândulas da submucosa do próprio esôfago.¹⁴ As propriedades de defesa intrínsecas do epitélio são constituídas por fatores estruturais e funcionais tais como proliferação epitelial, migração de células e transporte de íons.^{15,16}

O EGF é um polipeptídeo secretado pelas glândulas submandibulares e outras porções do tubo digestivo que tem papel importante na cicatrização, manutenção da integridade do tecido e maturação do epitélio.^{17,18} Estudos experimentais em animais demonstraram que a administração de EGF acelera a cicatrização tecidual, sendo sua utilização limitada devido aos efeitos tóxicos da substância.¹⁹ O receptor do fator de crescimento epitelial(EGFR) é uma proteína pertencente à superfamília dos receptores da tirosinaquinase, os quais atuam como

mediadores da resposta celular a diversos fatores extracelulares.²⁰ Os receptores tirosinaquinase são mediadores primários de muitos sinais e determinam crescimento, diferenciação, migração e morte celular.²¹

A alta expressão dos receptores tirosinaquinase tem um efeito deletério sobre o crescimento celular normal, gerando transformação. A proliferação celular é a resposta predominante das células normais à ativação do EGFR.²² O receptor do fator de crescimento epidérmico, também chamado de ErbB-1, fornece uma das primeiras ligações entre uma atividade de oncogene e biologia tumoral humana.²³ Por exemplo, a alta expressão do receptor está associada com carcinoma não-pequenas células de pulmão e correlacionada com alta proporção de metástase, pobre diferenciação celular e redução na sobrevivência neste tipo de tumor.^{22, 24} Muitos tumores sólidos apresentam alta expressão desta proteína, incluindo tumores de bexiga, cabeça e pescoço, mama, estômago, cólon e reto.²⁵

Análises prévias evidenciaram um aumento da expressão do EGFR nas áreas que apresentaram maior grau de displasia esofágica, comparado com mucosa de Barrett sem displasia ou mucosa cárdica normal.²⁶ O EGFR aumenta com a progressão do Esôfago de Barrett para adenocarcinoma de esôfago²⁷, podendo também a expressão desta proteína exercer uma função na carcinogênese esofágica. Existem descrições também da sua correlação com o avanço da classificação patológica do tumor, e com o aumento da incidência de metástases linfonodais e, conseqüentemente, com pior prognóstico.^{25, 28}

A presença do EGFR em patologias benignas é pouco documentada. O melhor entendimento da expressão do EGFR nas diferentes fases de evolução da DRGE pode ter papel importante no esclarecimento das alterações que ocorrem na mucosa esofágica de pacientes com refluxo gastroesofágico. O estudo das alterações do epitélio esofágico na DRGE e o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos são uma alternativa para o manejo adequado desta patologia que apesar de benigna tem grande impacto pela sua prevalência.

Neste trabalho, temos como objetivo avaliar a expressão imuno-histoquímica do EGFR em biópsias de esôfago de pacientes com DRGE ; em pacientes com esôfago de Barrett e pacientes com adenocarcinoma de esôfago.

MATERIAL E MÉTODOS

População em estudo:

A população em estudo constituiu-se de pacientes acima de 30 anos de idade encaminhados ao Serviço de Endoscopia Digestiva do Hospital Universitário de Santa Maria

(HUSM/UFSM) com sintomas típicos de DRGE, como pirose e/ou regurgitação ao menos uma vez por semana com duração mínima dos sintomas de no mínimo 5 anos. Os pacientes com adenocarcinoma de esôfago foram atendidos pelo Grupo de Cirurgia de Esôfago, Estômago e Intestino Delgado (GCEEID) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA/UFRGS). O período de análise de todos os pacientes desse estudo foi de janeiro de 2003 à dezembro de 2008.

Os critérios de inclusão foram: 1) pacientes com sintomas relativos à DRGE (como pirose e/ou regurgitação, pelo menos uma vez por semana), com achados na EDA de: mucosa normal, esofagite ou presença endoscópica de mucosa colunar ou, 2) pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago ou de junção esôfago-gástrica Siewert I ou II. Foram critérios de exclusão: 1) pacientes com distúrbios de coagulação; 2) pacientes em uso de anticoagulantes ou antiinflamatórios não esteróides; 3) pacientes com uso de inibidores da bomba de prótons nos últimos 60 dias; 4) pacientes com varizes gastroesofágicas; 5) pacientes com metaplasia intestinal na biópsia esofágica, porém sem a visualização endoscópica de mucosa colunar (Metaplasia Intestinal do Cardia - MIC); 6) pacientes com exames obtidos dos blocos de parafina com material insuficiente; 7) pacientes submetidos a radioterapia ou quimioterapia previamente; 8) pacientes com adenocarcinomas da junção esôfago-gástrica subcárdicos, correspondentes à classificação de Siewert tipo III; 9) pacientes com cirurgia gástrica ou esofágica prévia 10) recusa do paciente.

Os pacientes foram informados a respeito da pesquisa, sendo requerido o consentimento informado. A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética do Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com o número 08-692.

Após revisão dos dados clínicos e dos laudos anatomopatológicos, os pacientes foram divididos em três grupos principais: pacientes com adenocarcinoma, pacientes com Esôfago de Barrett e pacientes com DRGE com achados variados na EDA, abrangendo achados normais, esofagite grau A-D na classificação de Los Angeles e pacientes com epitélio colunar sem metaplasia intestinal.

Endoscopia Digestiva Alta

As biópsias endoscópicas dos pacientes provenientes do HUSM/UFSM foram realizadas pelo mesmo médico endoscopista, segundo metodologia descrita no protocolo de Seattle²⁹. Com o endoscópio posicionado próximo a linha Z foi realizada cromoscopia com solução de Lugol a 3% (12 g de I + 24 g de KCl em 1000 ml de água) para salientar a

transição do epitélio e as lesões causadas pela DRGE. As biópsias endoscópicas dos pacientes provenientes do HCPA/UFRGS foram realizadas por médicos do serviço de endoscopia do HCPA, com biópsia dos tumores em 4 quadrantes. A graduação da esofagite foi realizada conforme a classificação de Los Angeles.³⁰

Análise Histopatológica:

Para a avaliação histológica, todos os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. Os achados histológicos foram classificados como: amostras inadequadas ou adequadas, essas últimas eram avaliadas quanto a presença de epitélio escamoso normal, células da camada basal em mais de 15% da camada epitelial total, alongamento das papilas em mais de 50% do total da camada epitelial, presença de neutrófilos e/ou eosinófilos e/ou monócitos intra-epitelial.³¹

As amostras foram consideradas adequadas quando os dois fragmentos estavam intactos com ou sem lâmina própria presente. O diagnóstico histopatológico de esofagite foi definida pela presença de um ou mais dos achados descritos acima³¹. A esofagite foi classificada como leve, moderada e severa de acordo com as alterações inflamatórias presentes.³²

Dois patologistas com experiência em patologia gastrointestinal examinaram independentemente das lâminas, e um diagnóstico foi feito quando eles concordaram. No caso de discordância, o diagnóstico final foi feito por consenso entre os dois patologistas.

Análise Imuno-histoquímica:

As biópsias e peças cirúrgicas de tumores dos pacientes alocados para o estudo foram fixadas em formalina e incluídas em parafina. Realizados cortes em micrótomo em lâminas de 5 micrômetros (μm), submetidos a um pré-tratamento com enzimas proteolíticas. As lâminas foram desparafinizadas e re-hidratadas em água destilada. Imersas em peróxido de hidrogênio 3% por 15 minutos, para bloqueio da atividade da peroxidase endógena e após lavadas com PBS (phosphate-buffered saline) por 5 minutos. Posteriormente as lâminas foram pré-tratadas com Proteinase K (20 $\mu\text{g/ml}$) por 14 minutos e lavadas em PBS por 5 minutos e bloqueados com caseína 0.03% por 30 minutos. O EGFR monoclonal anti-humano, clone H11 (anti-EGFR) (Dako) foi aplicado nas lâminas a uma concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ e incubado por 1 hora em temperatura ambiente, após foi enxaguado em PBS e incubado com Streptavidina (diluição de 1:20) por 30 minutos em temperatura ambiente e novamente lavado duas vezes por 5

minutos com PBS. Posteriormente o cromógeno diaminobenzidina foi aplicado por 5 minutos e após lavados por 3 minutos em água e depois em água destilada. Em seguida as lâminas foram coradas com Hematoxilina por 2 minutos, desidratadas com álcool e montada em lâminas para análise.

A expressão da coloração do EGFR foi considerada positiva quando foi observada presença do corante na membrana. Foi realizado controle externo positivo com uma linha de carcinoma de células escamosas de esôfago, A431.

A leitura das lâminas foi realizada por uma patologista cegada (LM), sem o conhecimento dos dados clínico-patológicos.

Análises Estatísticas:

Para análise estatística da expressão do EGFR e a correlação com as características dos tumores e pacientes, foi utilizado o teste exato de Fisher e teste de chi-quadrado.

A expressão do EGFR e as variáveis relevantes serão colocadas em uma base de dados e analisadas pelo programa estatístico SPSS (Statistical Package for Social Science) versão 11.0. O nível de significância utilizado foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

Foram estudados 194 pacientes. Os pacientes apresentaram uma média de idade de 55,25 anos, abrangendo pacientes dos 30 aos 90 anos. A prevalência foi de 54,4% de homens dos pacientes estudados. Esta população foi dividida segundo os achados endoscópicos e anatomopatológicos. De acordo com as características anatomopatológicas três grupos principais foram definidos: pacientes com adenocarcinoma, pacientes com Esôfago de Barrett e pacientes com DRGE com achados variados na EDA, abrangendo achados normais, esofagite grau A-D na classificação de Los Angeles e pacientes com epitélio colunar sem metaplasia intestinal. O percentual de pacientes com neoplasia foi de 22,2% (43/194), pacientes com Esôfago de Barrett 12,4% (24/194) e pacientes com DRGE 65,5% (127/194).

Avaliando as características da população se verificou uma diferença na idade e na prevalência sexual entre os grupos. Pacientes com diagnóstico de câncer eram mais frequentemente do sexo masculino e mais idosos ($p < 0,0001$). (tabela 1)

	Classificação Patológica			P
	Pacientes com DRGE sem complicações	Pacientes com Esôfago de Barrett	Pacientes com Adenocarcinoma	
Número de Integrantes	127	24	43	
Idade	51,0 ± 14,5	58,2 ± 13,3	66,3 ± 9,7	<0,001
Sexo masculino	39,7%	79,2%	83,7%	<0,001
Sexo feminino	60,3%	20,8%	16,3%	

Tabela 1: Características dos pacientes.

A análise imuno-histoquímica do EGFR foi positiva em 19,1% dos casos (37/194). Entre os pacientes com DRGE, 91,3% (116/127) foram negativos para o EGFR (figura 1) e 8,7% (11/127) foram positivos (figura 2). No grupo dos pacientes com Esôfago de Barrett 25% (6/24) dos pacientes apresentaram positividade para o EGFR (figura 3), sendo o percentual de casos negativos igual a 75% (18/24) (figura 4). No grupo de doentes com neoplasia essa proporção foi de 46,5% (20/43) positivos e 53,5% (23/43) negativos. A positividade na expressão do EGFR foi maior no grupo dos pacientes com adenocarcinoma e no grupo dos pacientes com Barrett. A análise imuno-histoquímica do EGFR evidenciou uma diferença significativa entre os três grupos. (figura 5)

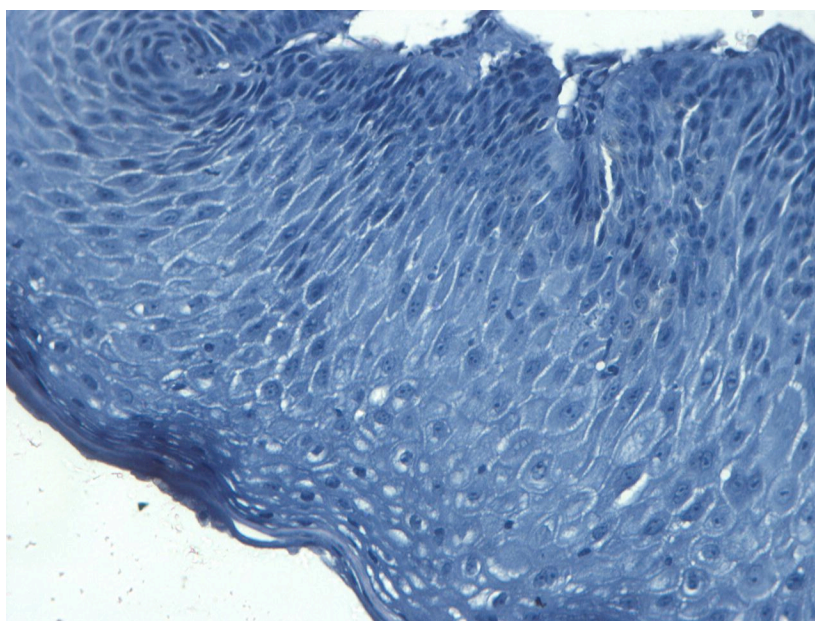


Figura 1: Biópsia esofágica de paciente com DRGE com esofagite grau A na endoscopia e esofagite leve no achado anatomopatológico sem expressão do EGFR.

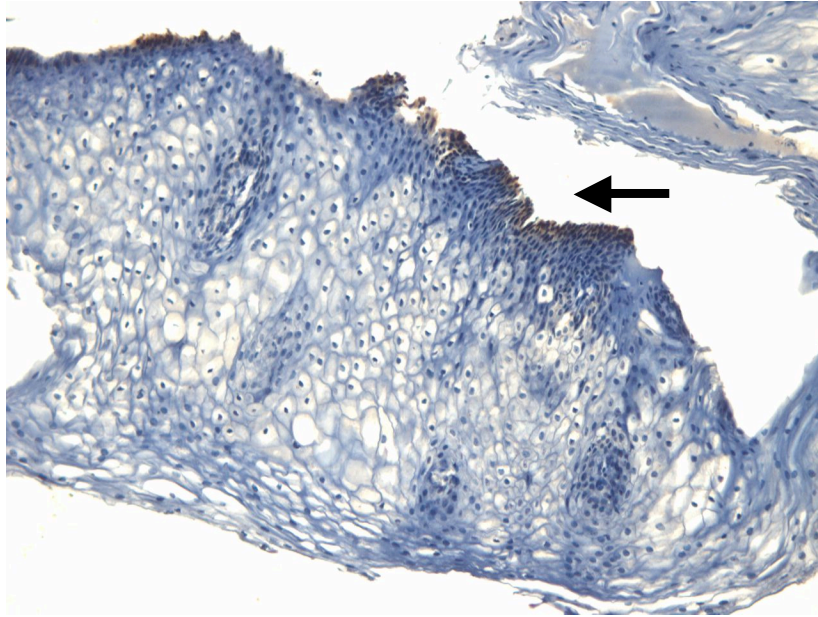


Figura 2: Biópsia esofágica de paciente com DRGE com esofagite grau A na endoscopia e esofagite leve no achado anatomopatológico. Na seta evidencia-se a expressão positiva do EGFR neste tecido.

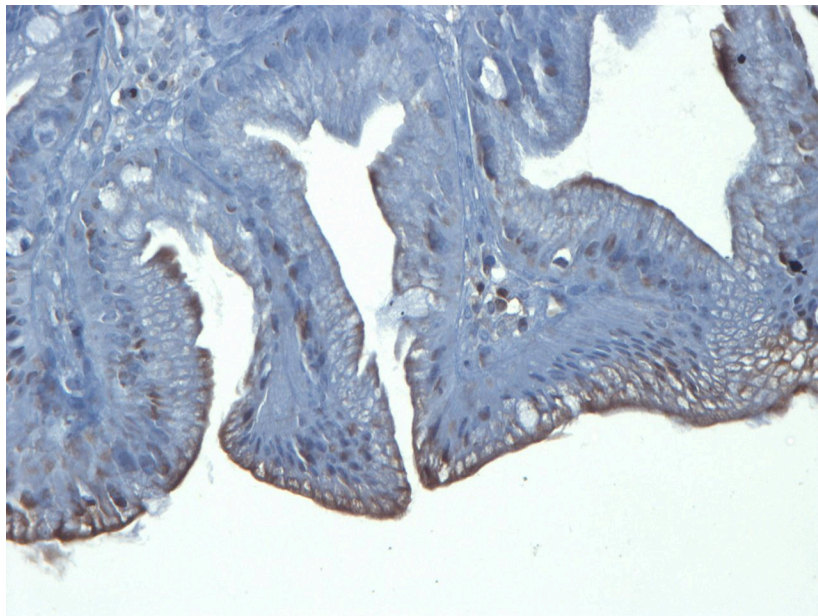


Figura 3: Biópsia esofágica de paciente com doença de Barrett com expressão positiva do EGFR.

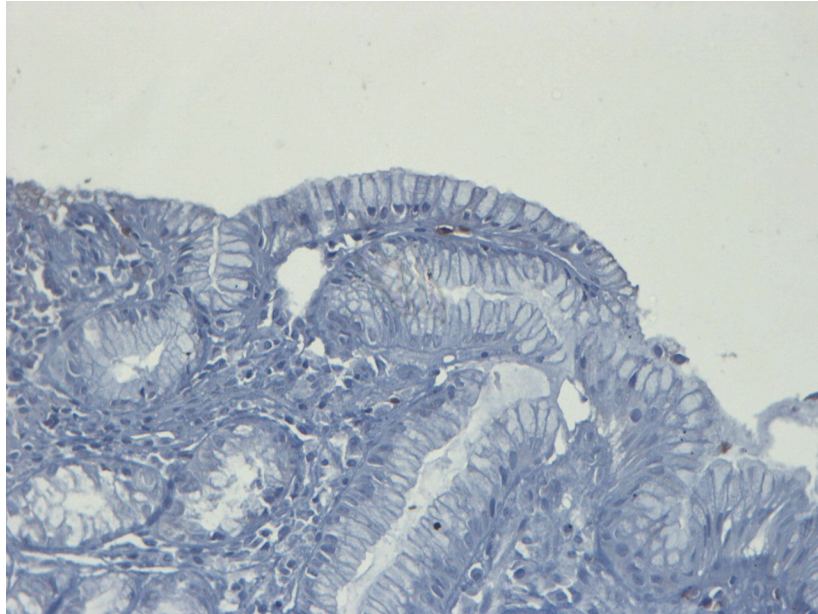


Figura 4: Biópsia esofágica de paciente com doença de Barrett com expressão negativa para o EGFR.

Análise Imuno-histoquímica do EGFR conforme Classificação Anatomopatológica

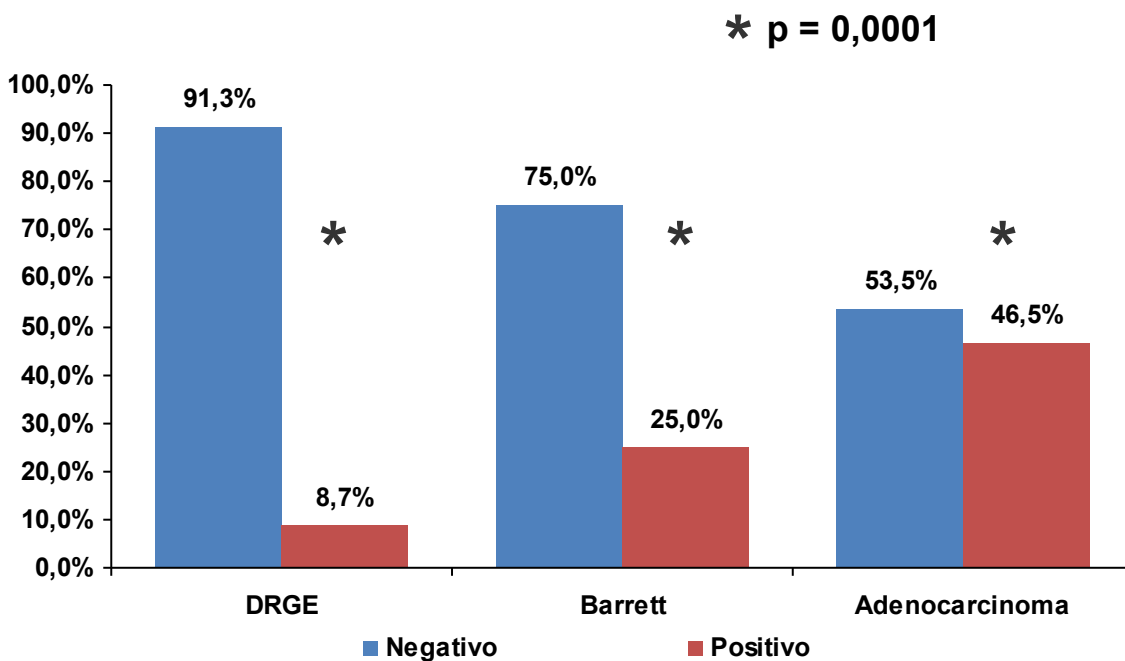


Figura 5: Análise Imuno-histoquímica do EGFR conforme Classificação Anatomopatológica.

Ao se avaliar somente os pacientes com DRGE e Barrett em relação aos sintomas apresentados durante a investigação constatou-se que não existiam diferenças significativas. O

sintoma dor apresentou uma tendência a ser um fator protetor para a positividade do EGFR, mas não houve significância estatística.

Caso seja feita uma divisão considerando-se os achados endoscópicos, os pacientes poderiam ser divididos em três grupo:

- grupo 1: pacientes sem alterações ou com alterações leve (EDA normal e esofagites graus A-C na classificação de Los Angeles);
- grupo 2: pacientes com alterações severas (EDA esofagite grau D e presença de epitélio colunar independente da confirmação de metaplasia intestinal)
- grupo 3: pacientes com achados sugestivos de neoplasia (lesões ulceradas e vegetantes)

Considerando-se estes grupos, a análise imuno-histoquímica do EGFR foi positiva em 5,7% (6/104) dos pacientes do grupo 1 . No grupo 2, 23,4% (11/47) dos pacientes apresentaram positividade para o EGFR, sendo o percentual de casos negativos foi igual a 76,6% (36/47). No grupo 3 a percentagem foi de 46,5% (20/43) positivos e 53,5% (23/43). (figura 6)

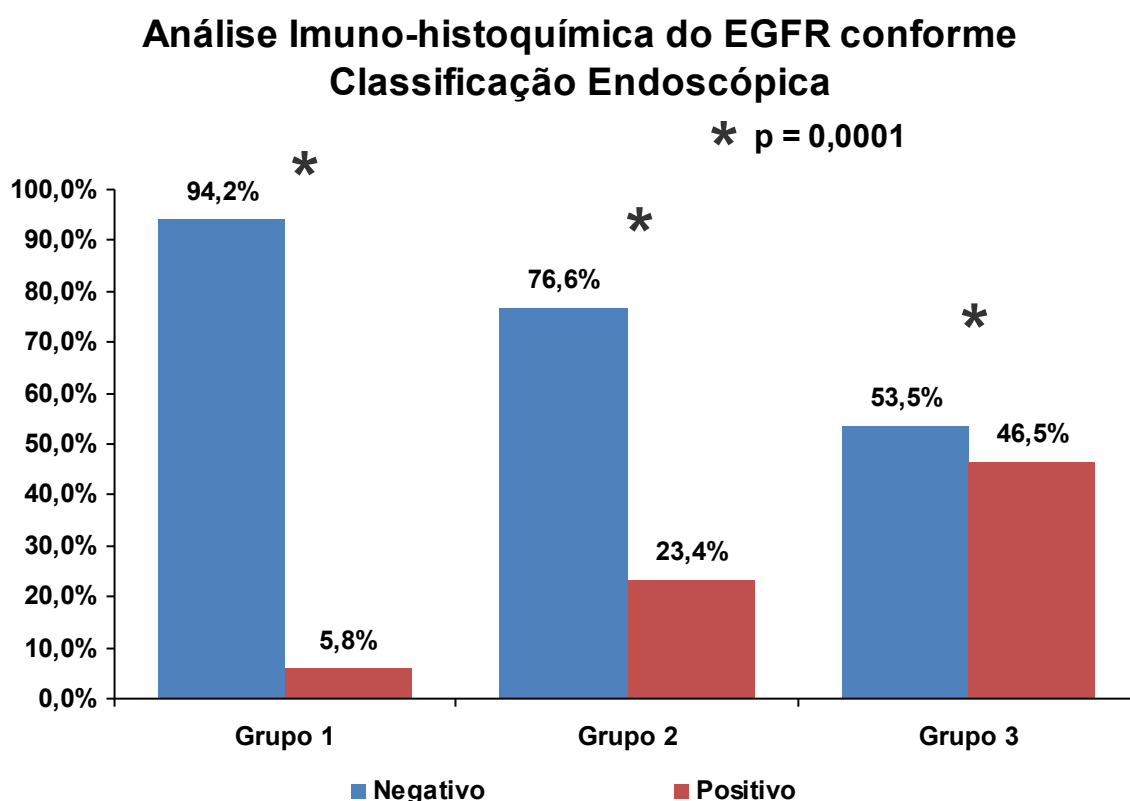


Figura 6: Análise Imuno-histoquímica do EGFR conforme Classificação Endoscópica. Grupo 1: pacientes com EDA normal ou esofagites graus A-C na classificação de Los Angeles; grupo 2: esofagite grau D e presença de epitélio colunar independente da confirmação de metaplasia intestinal; grupo 3: pacientes com achados sugestivos de neoplasia (lesões ulceradas e vegetantes)

Realizando esta categorização, conforme o achado endoscópico, foi constatada uma maior expressão do EGFR em pacientes com apresentações endoscópicas mais graves. Houve uma diferença estatística demonstrando uma maior expressão do EGFR tanto em pacientes com achados sugestivos de neoplasia quanto em pacientes com epitélio colunar ou esofagite grau D quando comparados com graus mais leves de esofagite.

DISCUSSÃO:

A DRGE é uma patologia benigna que apresenta uma grande variedade de manifestações clínicas. As manifestações clínicas podem ser brandas com sintomas eventuais ou frequentes que diminuem a qualidade de vida dos doentes.^{2, 6, 7} Além disso, os casos mais complicados como o Esôfago de Barrett representam um risco aumentado para o desenvolvimento do adenocarcinoma de esôfago.^{33, 34} Alguns passos da progressão da DRGE para Esôfago de Barrett e posteriormente em adenocarcinoma esofágico são conhecidos, mas as razões pelas quais alguns pacientes apresentam um desfecho benigno e outros evoluem com pior prognóstico necessitam ser melhor esclarecidas.

O EGF recebeu essa denominação por se constatar um papel na mitogênese e proliferação celular não só do esôfago mas como de todo o trato gastrointestinal.¹⁸ Foi constatada sua liberação pelas glândulas salivares e se pensou inicialmente que apresentasse uma função na revitalização e cicatrização do epitélio esofágico.^{35, 36} Estudos experimentais em cobaias, ratos³⁷⁻³⁹, macacos¹⁹, coelhos⁴⁰ e porcos³⁸ foram realizados para avaliar o papel do EGF. Os animais receberam a injeção de fator de crescimento epitelial recombinante humano. O resultado foi uma proliferação celular principalmente em mucosa e submucosa que resultaram em aumento da espessura da parede esofágica e aumento do diâmetro interno e externo do órgão.³⁷⁻³⁹

O questionamento a respeito do papel do EGF e do seu receptor em condições fisiológicas permaneciam sem resposta. Investigando a concentração do EGF na saliva de pessoas normais e comparando com pacientes com DRGE e esôfago de Barrett não evidenciaram diferenças. Esses achados não davam suporte a hipótese que deficiência de fatores de crescimento na saliva fossem responsável por esofagite.⁸ Modelos cirúrgicos experimentais que geram esofagite em ratos demonstraram que uma resposta do epitélio agredido é o aumento da expressão do EGFR.^{41, 42}

Os primeiros estudos que avaliaram a expressão do EGFR no esôfago de Barrett foram estudos descritivos.^{26, 43, 44} O primeiro estudo com um grupo controle comparou biópsia de

pacientes com Barrett com biópsias realizadas em controles constituída por uma população submetidas a EDA sem patologia definida.¹⁷ Mais recentemente, estudo realizado na China, avaliou a expressão do EGFR e da ciclogênase-2 - outra enzima envolvida em crescimento tumoral - em biópsia de esôfagos de pacientes com esôfago de Barrett com diferentes graus de diferenciação celular e pacientes com adenocarcinoma de esôfago.²⁷ O grupo controle foi constituído por pacientes com epitélio colunar mas sem metaplasia intestinal. Além do desenho do estudo, outro aspecto a ser ressaltado, foi a avaliação imuno-histoquímica realizada com auxílio de análise computadorizada, permitindo a análise quantitativa dos marcadores. Constatou-se que a expressão do EGFR era mais intensa nos pacientes com câncer e Barrett quando comparados com o grupo controle e que dentro do grupo do Barrett havia uma progressão da expressão conforme aumentava o grau de displasia do epitélio. No nosso estudo não foi avaliado o grau de displasia dos pacientes com esôfago de Barrett, mas, de maneira semelhante, observamos que quanto maior o grau de alterações anatomopatológicas maior é a expressão do EGFR.

Estudo avaliando biópsias de pacientes com diagnóstico câncer de esôfago identificou uma maior expressão do EGFR em tumores com pior tipo histológico.⁴⁵ A expressão do EGFR foi constatada também em linfonodos positivos para metástase. Este foi o primeiro estudo a sugerir a associação da expressão do EGFR com pior prognóstico em pacientes com câncer de esôfago. Outras neoplasias como pulmão⁴⁶, mama⁴⁷, bexiga⁴⁸ e colon⁴⁹ também foram associadas com pior prognóstico conforme maior expressão deste receptor.

Estudo recente desenvolvido no centro de oncologia M. D. Anderson para avaliar a relação da expressão do EGFR com o prognóstico tumoral, utilizando classificação imuno-histoquímica semelhante a este trabalho, identificou uma expressão positiva em 32% dos cânceres.²⁸ Outros trabalhos avaliando adenocarcinoma de esôfago apresentam positividade na expressão do EGFR em 64%⁵⁰ e 39%²⁵ dos pacientes. Em nosso estudo a positividade para a expressão do EGFR foi de 46,5%, estando dentro dessa variabilidade encontrada na literatura.

A função teórica do EGF em restaurar o epitélio esofágico não era condizente com os achados de maior expressão de seu receptor em tecidos com alterações malignas e pré-malignas, ainda mais constatando-se uma maior expressão em tecidos com maiores alterações histológicas.

Durante a transformação neoplásica, aberrações no ciclo celular levam à replicação celular descontrolada, um mecanismo molecular suspeito de estar envolvido em todas as carcinogêneses.⁵¹ O EGFR pertence a família dos receptores tirosina quinase e é responsável por uma complexa cascata que modula a proliferação, diferenciação, adesão e migração

cellular.^{20, 21, 27, 52} A proteína EGFR é um receptor transmembrana que consiste de três regiões: a região de ligação extracelular, a região intracelular com atividade tirosinaquinase e uma região transmembrana.⁵³ Essa estrutura permite que sinais transmitidos através da membrana plasmática atuem na expressão gênica e induzam respostas celulares. Na complexa cascata da oncogênese o aumento da expressão de receptores de fatores de crescimento tornam o ambiente celular mais suscetível ao desencadeamento da proliferação celular e assim ao desenvolvimento de neoplasias.^{22, 54, 55} Seria necessária uma menor quantidade de fatores de crescimento para manter uma proliferação celular normal. O aumento da expressão do EGFR pode regular a expressão de oncogenes ou genes supressores tumorais envolvidos na cascata intracelular de produção de outros fatores de crescimento endógenos.^{56, 57}

No nosso estudo avaliamos a expressão imuno-histoquímica do EGFR em diferentes populações abrangendo a seqüência DRGE, esôfago de Barrett e adenocarcinoma de esôfago. Como em outros trabalhos científicos já citados neste artigo constatou-se a presença mais acentuada do EGFR em pacientes com doença pré-maligna e câncer. Esses achados apontam para um grupo de pacientes que apresentam um risco de pior progressão da doença.

Avaliamos também uma população de pacientes com diagnóstico de DRGE que representa a grande parte dos pacientes avaliados no dia a dia da clínica médica. Não encontramos nenhuma análise na literatura avaliando a expressão do EGFR nesse tipo de população. Este grupo constituído por pacientes com fases iniciais da doença apresentou uma expressão do EGFR significativamente menor. Esse dado pode ser um fator tranquilizador em relação ao prognóstico destes pacientes e ao mesmo tempo deixa claro que o aumento do EGFR tem relação direta com o aumento do processo inflamatório decorrente de maiores agressões ao epitélio esofágico. Talvez se possa no futuro realizar procedimentos com intervenções terapêuticas e acompanhamento de longo prazo, avaliando a progressão do EGFR antes e após as intervenções. No nosso estudo não tivemos como objetivo medir esses dados de forma continuada na evolução de cada paciente. Da mesma forma, os pacientes que apresentaram positividade na expressão do EGFR não foram acompanhados para se evidenciar uma possível pior progressão da doença.

Em relação ao prognóstico dos pacientes, a relação do EGFR com piores tipos histológicos de neoplasia e menor sobrevida vem sendo constatada. O grupo de pacientes com Barrett, entretanto, não foi estudado em relação a evolução. Apesar de haver indícios de que a expressão do EGFR é maior em casos de maior displasia, não existem trabalhos que avaliem se pacientes com Barrett e expressão do EGFR positiva apresentam maior risco para desenvolver câncer.

Considerando a população com doença benigna avaliada neste trabalho, podemos hipotetizar que os pacientes que durante a EDA apresentem epitélio colunar ou esofagite grau D de Los Angeles com uma maior expressão do EGFR, poderiam ser o alvo principal de novos estudos para avaliar a progressão e o prognóstico dos pacientes com DRGE que apresentem EGFR positivo.

A análise de nossos resultados nos permite concluir que a expressão do EGFR é menor nos pacientes com DRGE e maior em pacientes com Esôfago de Barrett e Adenocarcinoma . Além disso os resultados demonstraram que a medida que piora a doença, maior é a expressão do EGFR. Apesar de a progressão DRGE, Barrett e adenocarcinoma esofágico já ter sido amplamente estudada, este trabalho apresenta novas informações a respeito da expressão do EGFR em pacientes com doença benigna, bem como da relação de prevalência deste marcador nas diversas fases dessa seqüência progressiva da doença. Esses novos conhecimentos apontam para novos aspectos a serem investigados. Sendo a expressão do EGFR sabidamente um fator de mal prognóstico no adenocarcinoma esofágico, se fazem necessárias novas investigações com o objetivo de realizar o seguimento dos pacientes com doença benigna e doença pré-maligna que apresentem positividade na expressão deste marcador avaliando a progressão da doença neste grupo de pacientes.

CONCLUSÃO:

Avaliando a expressão imuno-histoquímica do EGFR em biópsias de esôfago constatamos que os pacientes com DRGE apresentam uma menor expressão deste marcador quando comparados com pacientes com esôfago de Barrett e adenocarcinoma de esôfago. Os resultados demonstraram que a medida que há progressão da doença ocorre uma maior expressão do EGFR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moraes-Filho JP, Navarro-Rodriguez T, Barbuti R, Eisig J, Chinzon D, Bernardo W. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease: an evidence-based consensus. *Arq Gastroenterol* 2010;47:99-115.
2. Locke GR, 3rd, Talley NJ, Fett SL, Zinsmeister AR, Melton LJ, 3rd. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 1997;112:1448-56.
3. Jones RH, Lydeard SE, Hobbs FD, et al. Dyspepsia in England and Scotland. *Gut* 1990;31:401-5.
4. Moraes-Filho JP, Chinzon D, Eisig JN, Hashimoto CL, Zaterka S. Prevalence of heartburn and gastroesophageal reflux disease in the urban Brazilian population. *Arq Gastroenterol* 2005;42:122-7.
5. Gurski RR, da Rosa AR, do Valle E, de Borba MA, Valiati AA. Extraesophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease. *J Bras Pneumol* 2006;32:150-60.
6. Kahrilas PJ, Shaheen NJ, Vaezi MF. American Gastroenterological Association Institute technical review on the management of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 2008;135:1392-413, 413 e1-5.
7. Kahrilas PJ. Clinical practice. Gastroesophageal reflux disease. *N Engl J Med* 2008;359:1700-7.
8. Kongara K, Varilek G, Soffer EE. Salivary growth factors and cytokines are not deficient in patients with gastroesophageal reflux disease or Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci* 2001;46:606-9.
9. Campos GM, Peters JH, DeMeester TR, Oberg S, Crookes PF, Mason RJ. The pattern of esophageal acid exposure in gastroesophageal reflux disease influences the severity of the disease. *Arch Surg* 1999;134:882-7; discussion 7-8.
10. DeMeester TR, Johnson LF, Joseph GJ, Toscano MS, Hall AW, Skinner DB. Patterns of gastroesophageal reflux in health and disease. *Ann Surg* 1976;184:459-70.
11. DeMeester TR, Johnson LF. The evaluation of objective measurements of gastroesophageal reflux and their contribution to patient management. *Surg Clin North Am* 1976;56:39-53.
12. Wang C, Hunt RH. Precise role of acid in non-erosive reflux disease. *Digestion* 2008;78 Suppl 1:31-41.
13. Orlando RC. Esophageal epithelial defense against acid injury. *J Clin Gastroenterol* 1991;13 Suppl 2:S1-5.
14. Marcinkiewicz M, Han K, Zbroch T, et al. The potential role of the esophageal pre-epithelial barrier components in the maintenance of integrity of the esophageal mucosa in patients with endoscopically negative gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1652-60.
15. Barlow WJ, Orlando RC. The pathogenesis of heartburn in nonerosive reflux disease: a unifying hypothesis. *Gastroenterology* 2005;128:771-8.
16. Okuyama M, Fujiwara Y, Tanigawa T, et al. Roles of ZO-1 and epidermal growth factor in esophageal epithelial defense against acid. *Digestion* 2007;75:135-41.
17. Jankowski J, Murphy S, Coghill G, et al. Epidermal growth factor receptors in the oesophagus. *Gut* 1992;33:439-43.
18. Jankowski J, Coghill G, Tregaskis B, Hopwood D, Wormsley KG. Epidermal growth factor in the oesophagus. *Gut* 1992;33:1448-53.
19. Reindel JF, Gough AW, Pilcher GD, Bobrowski WF, Sobocinski GP, de la Iglesia FA. Systemic proliferative changes and clinical signs in cynomolgus monkeys administered a recombinant derivative of human epidermal growth factor. *Toxicol Pathol* 2001;29:159-73.

20. Playford RJ, Hanby AM, Gschmeissner S, Peiffer LP, Wright NA, McGarrity T. The epidermal growth factor receptor (EGF-R) is present on the basolateral, but not the apical, surface of enterocytes in the human gastrointestinal tract. *Gut* 1996;39:262-6.
21. Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 1997;410:83-6.
22. Koppert LB, Wijnhoven BP, van Dekken H, Tilanus HW, Dinjens WN. The molecular biology of esophageal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2005;92:169-90.
23. Morgan S, Grandis JR. ErbB receptors in the biology and pathology of the aerodigestive tract. *Exp Cell Res* 2009;315:572-82.
24. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008;358:1160-74.
25. Wilkinson NW, Black JD, Roukhadze E, et al. Epidermal growth factor receptor expression correlates with histologic grade in resected esophageal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2004;8:448-53.
26. Jankowski J, Hopwood D, Pringle R, Wormsley KG. Increased expression of epidermal growth factor receptors in Barrett's esophagus associated with alkaline reflux: a putative model for carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1993;88:402-8.
27. Li Y, Wo JM, Ray MB, et al. Cyclooxygenase-2 and epithelial growth factor receptor up-regulation during progression of Barrett's esophagus to adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2006;12:928-34.
28. Wang KL, Wu TT, Choi IS, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Cancer* 2007;109:658-67.
29. Levine DS, Haggitt RC, Blount PL, Rabinovitch PS, Rusch VW, Reid BJ. An endoscopic biopsy protocol can differentiate high-grade dysplasia from early adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1993;105:40-50.
30. Lundell LR, Dent J, Bennett JR, et al. Endoscopic assessment of oesophagitis: clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification. *Gut* 1999;45:172-80.
31. Flora-Filho R, Camara-Lopes LH, Zilberstein B. [Histological criteria of esophagitis in the gastroesophageal reflux disease. Reevaluation of the sensitivity of the esophageal 24-hours pHmetry]. *Arq Gastroenterol* 2000;37:197-202.
32. Riddell RH. The biopsy diagnosis of gastroesophageal reflux disease, "carditis," and Barrett's esophagus, and sequelae of therapy. *Am J Surg Pathol* 1996;20 Suppl 1:S31-50.
33. Pera M, Cameron AJ, Trastek VF, Carpenter HA, Zinsmeister AR. Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. In: *Gastroenterology*. United States; 1993:510-3.
34. Altorki NK, Oliveria S, Schrupp DS. Epidemiology and molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. In: *Semin Surg Oncol*. United States; 1997:270-80.
35. Sakai Y, Nelson KG, Snedeker S, et al. Expression of epidermal growth factor in suprabasal cells of stratified squamous epithelia: implications for a role in differentiation. *Cell Growth Differ* 1994;5:527-35.
36. Qureshi FG, Tchorzewski MT, Duncan MD, Harmon JW. EGF and IGF-I synergistically stimulate proliferation of human esophageal epithelial cells. In: *J Surg Res*. United States; 1997:354-8.
37. Breider MA, Bleavins MR, Reindel JF, Gough AW, de la Iglesia FA. Cellular hyperplasia in rats following continuous intravenous infusion of recombinant human epidermal growth factor. *Vet Pathol* 1996;33:184-94.

38. Juhl CO, Vinter-Jensen L, Poulsen SS, Orntoft TF, Dajani EZ. Chronic treatment with epidermal growth factor causes esophageal epithelial hyperplasia in pigs and rats. *Dig Dis Sci* 1995;40:2717-23.
39. Zhao J, Yang J, Vinter-Jensen L, Zhuang F, Gregersen H. Biomechanical properties of esophagus during systemic treatment with epidermal growth factor in rats. *Ann Biomed Eng* 2003;31:700-9.
40. Jimenez P, Lanás A, Piazuolo E, Esteve F. Effect of growth factors and prostaglandin E2 on restitution and proliferation of rabbit esophageal epithelial cells. *Dig Dis Sci* 1998;43:2309-16.
41. Fujiwara Y, Higuchi K, Takashima T, et al. Roles of epidermal growth factor and Na⁺/H⁺ exchanger-1 in esophageal epithelial defense against acid-induced injury. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. United States; 2006:G665-73.
42. Fujiwara Y, Higuchi K, Hamaguchi M, et al. Increased expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptors in rat chronic reflux esophagitis. In: *J Gastroenterol Hepatol*. Australia; 2004:521-7.
43. Jankowski J, Hopwood D, Wormsley KG. Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha and their receptor in gastro-oesophageal diseases. *Dig Dis* 1993;11:1-11.
44. Poller DN, Steele RJ, Morrell K. Epidermal growth factor receptor expression in Barrett's esophagus. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:1226-7.
45. Mukaida H, Yamamoto T, Hirai T, et al. Expression of human epidermal growth factor and its receptor in esophageal cancer. *Jpn J Surg* 1990;20:275-82.
46. Scagliotti GV, Selvaggi G, Novello S, Hirsch FR. The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer. In: *Clin Cancer Res*. United States; 2004:4227s-32s.
47. Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L. Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer* 1994;74:381-400.
48. Vet JA, Debruyne FM, Schalken JA. Molecular prognostic factors in bladder cancer. *World J Urol* 1994;12:84-8.
49. O'Dwyer P J, Benson AB, 3rd. Epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer. *Semin Oncol* 2002;29:10-7.
50. Yacoub L, Goldman H, Odze RD. Transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor receptor, and MiB-1 expression in Barrett's-associated neoplasia: correlation with prognosis. *Mod Pathol* 1997;10:105-12.
51. Lazebnik Y. What are the hallmarks of cancer? *Nat Rev Cancer* 2010;10:232-3.
52. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. In: *Eur J Cancer*. England; 2001:S3-8.
53. Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 1997;8:1197-206.
54. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. In: *Cell*. United States; 2000:57-70.
55. Okawa T, Michaylira CZ, Kalabis J, et al. The functional interplay between EGFR overexpression, hTERT activation, and p53 mutation in esophageal epithelial cells with activation of stromal fibroblasts induces tumor development, invasion, and differentiation. In: *Genes Dev*. United States; 2007:2788-803.
56. Logan A. Intracrine regulation at the nucleus--a further mechanism of growth factor activity? *J Endocrinol* 1990;125:339-43.
57. Aaronson SA. Growth factors and cancer. *Science* 1991;254:1146-53.

EGFR IN GASTROESOPHAGEAL REFLUX DISEASE, BARRETT'S ESOPHAGUS, AND ESOPHAGEAL ADENOCARCINOMA

Guilherme Pretto

Marcelo Binato

Daniel Navarini

Luise Meurer

Richard Ricachenevsky Gurski

The present study was carried out at the Digestive Surgery and Pathology Unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence:

Guilherme Pretto

Rua Santa Cecília 1373/316 Bairro Santana CEP 90420-041

Porto Alegre – RS – Brazil. Tel.: +55 51 9955-0575, +55 51 3330-1072

Email: ggpretto@gmail.com.br

Abstract:

Introduction: Gastroesophageal reflux disease (GERD) is a common pathology with a wide range clinical and endoscopic manifestations whose underlying mechanisms are not well understood. Epidermal growth factor receptor (EGFR), found in the epithelium of the digestive tract, plays an important role in epithelial repair and shows increased expression in a number of different neoplasms, including esophageal tumors. **Objectives:** To evaluate EGFR expression using immunohistochemistry in esophageal biopsies obtained from patients with GERD, Barrett's esophagus, and adenocarcinoma of the esophagus.

Methods: EGFR expression was immunohistochemically determined in biopsies from 194 patients with symptoms suggestive of GERD or adenocarcinoma of the esophagus, seen at two Brazilian university hospitals between January 2003 and December 2008. Based on histopathological analysis, patients were divided into three groups: GERD, Barrett's esophagus and adenocarcinoma of the esophagus. EGFR expression was considered positive when staining was detected in the membrane. **Results:** Mean age was 55.25 years (30-90). Patients with GERD (n = 127) accounted for 65.5% of the sample, compared with 12.4% (n = 24) of patients with Barrett's esophagus and 22.2% (n = 43) of patients with esophageal adenocarcinoma. Immunohistochemical analysis was positive for EGFR in 19.1% of the patients (37/194), divided as follows: 8.7% (11/127) in the GERD group, 25% (6/24) in the Barrett's esophagus group, and 46.5% (20/43) in the esophageal adenocarcinoma group. Statistical analysis revealed significant differences between the three groups (p = 0.0001).

Conclusions: GERD patients showed lower levels of EGFR expression than patients with Barrett's esophagus or patients with adenocarcinoma of the esophagus, suggesting a direct relationship between EGFR expression and disease progression.

Keywords: EGFR, GERD, adenocarcinoma of the esophagus, Barrett's esophagus

INTRODUCTION

Gastroesophageal reflux disease (GERD) is among the conditions most frequently seen by gastroenterologists, and a significant increase in prevalence has been observed over recent decades.¹ Population studies have shown that approximately 20% of the general population experience reflux symptoms at least once a week and that up to 60% have occasional symptoms.^{2,3} A Brazilian study has reported an incidence of one or two episodes of reflux per week in 12% of the individuals assessed.⁴ The main clinical manifestation of GERD is a retrosternal burning sensation (pyrosis), present in more than 60% of cases. Other manifestations include regurgitation, dysphagia, excessive salivation, chest pain, hoarseness, asthma, chronic coughing, and repeat respiratory infections.⁵⁻⁷

The etiology of GERD is multifactorial. The disease results from an imbalance between harmful properties of refluxed stomach contents, mechanisms of esophageal clearance, and esophageal mucosal resistance.⁸ GERD severity depends on the amount of contents refluxed into the esophagus, the length of time these contents remain in contact with the esophageal mucosa, susceptibility of the mucosa to the refluxed contents, and the esophagus' ability to propel gastric juices back into the stomach.⁹⁻¹¹

GERD may produce several different clinical and endoscopic manifestations. However, the mechanisms underlying such manifestations are still unclear.¹² For example, gastric acid plays an important role in epithelial aggression. Defense mechanisms against injury by contact with gastric acid include the saliva, esophageal clearance, and epithelial resistance. In particular, esophageal epithelial resistance can be subdivided into pre-epithelial, epithelial and post-epithelial protective factors.¹³ Elements that provide pre-epithelial defense are bicarbonate, mucins, epidermal growth factor (EGF), prostaglandin E₂, and transforming growth factor-alpha (TGF- α). These substances are produced by the salivary and esophageal submucosal glands.¹⁴ In turn, epithelial defenses are provided by structural and functional mechanisms such as epithelial proliferation, cell migration, and ion transport.^{15, 16}

EGF is a polypeptide secreted by submandibular glands and other portions of the digestive tube that have important functions in healing, maintenance of tissue integrity, and maturation.^{17, 18} Experimental studies with animals have shown that EGF administration accelerates tissue healing; however, its use in humans has been limited as a result of associated toxic effects.¹⁹ In turn, epidermal growth factor receptor (EGFR) is a protein that belongs to the superfamily of receptor tyrosine kinases, which act as cell response mediators to a range of

extracellular factors.²⁰ Receptor tyrosine kinases are primary mediators of many signals that control cell growth, differentiation, migration, and death.²¹

High levels of expression of receptor tyrosine kinases affect normal cell growth, leading to transformation. Cell proliferation is the predominant response of normal cells to EGFR activation.²² EGFR, also known as ErbB-1, was the first receptor to allow identification of a relationship between activated oncogenes and human tumor formation.²³ EGFR overexpression is associated with non-small cell lung carcinoma and correlates with a high incidence of metastasis, poor cell differentiation, and reduced survival.^{22, 24} Many solid tumors also show high levels of this protein, including tumors of the bladder, head and neck, breast, stomach, colon, and rectum.²⁵

Previous analyses have provided evidence of increased EGFR expression associated with high-grade esophageal dysplasia when compared with Barrett's mucosa without dysplasia or normal cardiac mucosa.²⁶ EGFR increases as Barrett's esophagus progresses to adenocarcinoma of the esophagus,²⁷ and its expression may also have a function in esophageal carcinogenesis. Other reports have suggested that EGFR correlates with more severe tumors with an increased incidence of lymph node metastasis and consequently a worse prognosis.^{25, 28}

Conversely, the presence and role of EGFR in benign pathologies is poorly documented. A better understanding of EGFR expression in the different clinical stages of GERD would probably shed some light on the esophageal mucosal changes that take place in patients with gastroesophageal reflux and possibly provide grounds for the development of new treatment methods for this population.

The objective of this study was to immunohistochemically evaluate and compare EGFR expression in esophageal biopsies obtained from patients with GERD, Barrett's esophagus, and adenocarcinoma of the esophagus.

MATERIALS AND METHODS

Study population

GERD patients were selected among subjects over the age of 30 who had been referred to the Gastrointestinal Endoscopy Service at the Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM/UFSM) with symptoms suggestive of GERD, e.g. pyrosis and/or regurgitation at least once per week, with a minimum duration of symptoms of 5 years. Patients with adenocarcinoma of the esophagus were selected among those being treated by the Esophagus, Stomach and Small Intestine Surgery Team at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA/UFRGS). Sample selection was conducted between January 2003 and December 2008.

The following inclusion criteria were taken into consideration: 1) symptoms suggestive of GERD (e.g. pyrosis and/or regurgitation at least once weekly) and esophagogastroduodenoscopy (EGD) results showing normal mucosa, esophagitis or presence of columnar mucosa; or 2) diagnosis of Siewert types I or II adenocarcinoma of the esophagus or of the esophagogastric junction. Exclusion criteria were: 1) presence of coagulation disorders; 2) patients taking anticoagulants or nonsteroidal anti-inflammatories; 3) use of proton pump inhibitors during the previous 60 days; 4) presence of esophageal varices; 5) intestinal metaplasia on esophageal biopsy, but no columnar mucosa visible on endoscopy (gastric cardia intestinal metaplasia, CIM); 6) insufficient material to allow analysis; 7) previous treatment with radiotherapy or chemotherapy; 8) patients with adenocarcinoma of the subcardial esophagogastric junction (Siewert type III classification); 9) previous gastric or esophageal surgery; or 10) refusal to sign an informed consent form.

Patients were informed about the study objectives and were asked to sign an informed consent form. The study was approved by the Research Ethics Committee at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (protocol no. 08-692).

After review of clinical and anatomopathological findings, patients were divided into three main groups: patients with adenocarcinoma of the esophagus, patients with Barrett's esophagus, and patients with GERD with varying EGD findings, ranging from normal findings, through esophagitis grades A-D according to the Los Angeles classification, to patients with columnar epithelium but no intestinal metaplasia.

Upper digestive endoscopy

All endoscopic biopsies performed in GERD patients were conducted by the same endoscopist, following the methodology described in the Seattle protocol.²⁹ With the endoscope placed near the Z line, chromoscopy with 3% Lugol's solution (12 g I + 24 g KCl in 1,000 ml of water) was used to stain transitional epithelium and damage caused by GERD. Patients with adenocarcinoma of the esophagus were submitted to endoscopic biopsies conducted by physicians from the hospital endoscopy service, following a four-quadrant biopsy protocol. Two biopsy samples were obtained from each patient, one for histopathological analysis and one for immunohistochemical analysis.

Histopathological analysis

Slides were stained with hematoxylin and eosin for histological assessment. Histological findings were classified as follows: samples were first classed as unacceptable or acceptable; acceptable samples were subdivided into normal squamous epithelium, basal layer cells in more than 15% of the total epithelial cell layer, elongated papillae in more than 50% of the total epithelial layer, or presence of intraepithelial neutrophils and/or eosinophils and/or monocytes.³⁰

Samples were considered acceptable when the two collected fragments were intact, with or without lamina propria. A histopathological diagnosis of esophagitis was established when one or more of the criteria listed above were present.³⁰ Esophagitis was classified according to the Los Angeles classification³¹ as mild, moderate, or severe, depending on the inflammatory abnormalities observed.³²

Two pathologists with experience in gastrointestinal pathology examined the slides independently, and diagnoses were considered definitive when both agreed. In cases of disagreement, findings were discussed by the two pathologists, and the definitive diagnosis was achieved by consensus.

Immunohistochemical analysis

Biopsies and surgical tumor specimens were fixed in formalin and embedded in paraffin. Five micrometer (5 μ m) sections were cut using a microtome and pretreated with proteolytic enzymes. Slides were deparaffinized and rehydrated with distilled water. They were immersed in 3% hydrogen peroxide for 15 minutes, in order to block endogenous peroxidase activity, and then washed with phosphate buffered saline (PBS) for 5 minutes. Subsequently, slides were pretreated with proteinase K (20 μ g/ml) for 14 minutes, washed with PBS for 5 minutes, and blocked with casein 0.03% for 30 minutes. Anti-human EGFR

monoclonal antibody, clone H11 (anti-EGFR) (Dako) was applied to the slides at a concentration of 1 µg/ml and incubated for 1 hour at room temperature, then rinsed in PBS and incubated with streptavidin (diluted at 1:20) for 30 minutes at room temperature, and washed again twice for 5 minutes with PBS. Diaminobenzidine chromogen was applied for 5 minutes, washed for 3 minutes in water and then in distilled water. Finally, slides were stained with hematoxylin for 2 minutes, dehydrated with alcohol and mounted for viewing.

EGFR expression was considered positive when staining was detected in the membrane. A cell line of esophageal squamous cell carcinoma was used as an external positive control (A431).

Slides were classified by a pathologist (L.M.) who was blind to clinical and histopathological data.

Statistical analysis

Fisher's exact test and Pearson's chi-square test were used to analyze EGFR expression and to assess the presence of correlations with patient characteristics.

EGFR expression and related variables were entered into a database and analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences, version 11.0. Significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

A total of 194 patients were assessed. Mean age was 55.25 years (range: 30 to 90 years). The majority of patients (54.4%) were male. The sample was divided into three main groups based on endoscopic and anatomopathological findings, as follows: 43 patients with adenocarcinoma of the esophagus (22.2%), 24 patients with Barrett's esophagus (12.4%), and 127 patients with GERD (65.4%).

The three groups were statistically different in terms of age and sex distribution. Patients with a diagnosis of cancer were more likely to be male and older ($p < 0.0001$, Table 1).

Table 1. Sample characteristics

	Histopathological analysis			p
	GERD	Barrett's esophagus	Adenocarcinoma of the esophagus	
No. of patients	127	24	43	
Age, mean \pm SD	51.0 \pm 14.5	58.2 \pm 13.3	66.3 \pm 9.7	< 0.001
Sex, %				
Male	39.7	79.2	83.7	
Female	60.3	20.8	16.3	< 0.001

GERD: gastroesophageal reflux disease; SD: standard deviation.

Immunohistochemical analysis was positive for EGFR in 19.1% of the specimens (37/194). Among patients with GERD, 91.3% (116/127) were negative for EGFR (Figure 1), whereas 8.7% (11/127) were positive (Figure 2). Among patients with Barrett's esophagus, 25% (6/24) were positive for EGFR (Figure 3) and 75% (18/24) had negative results (Figure 4). Finally, among patients with neoplasms, 46.5% (20/43) showed positive immunohistochemical findings, compared with 53.5% (23/43) with negative results. Positive EGFR expression was more frequent in patients with adenocarcinoma of the esophagus and in those with Barrett's esophagus. Significant differences were observed between the three groups (Figure 5).

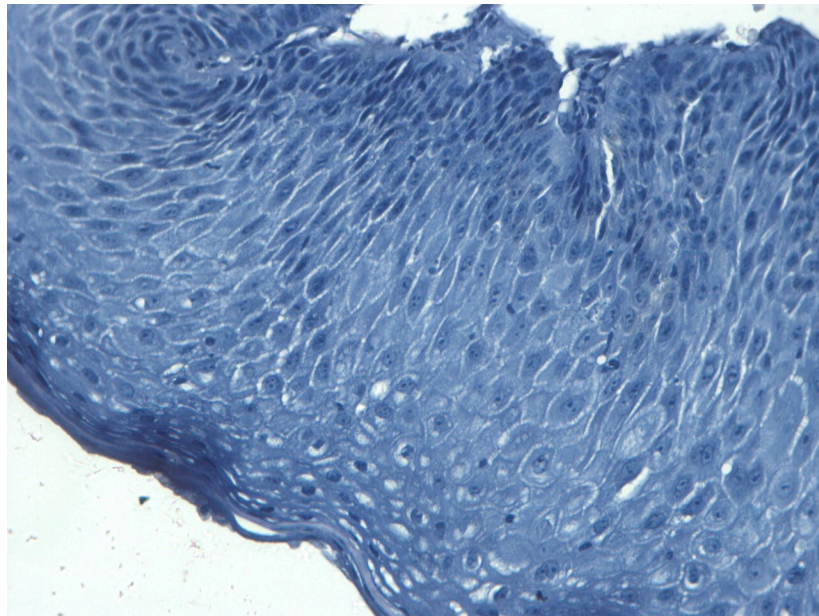


Figure 1. Esophageal biopsy from a GERD patient with grade A esophagitis on endoscopy and mild esophagitis on histological examination, negative for EGFR expression

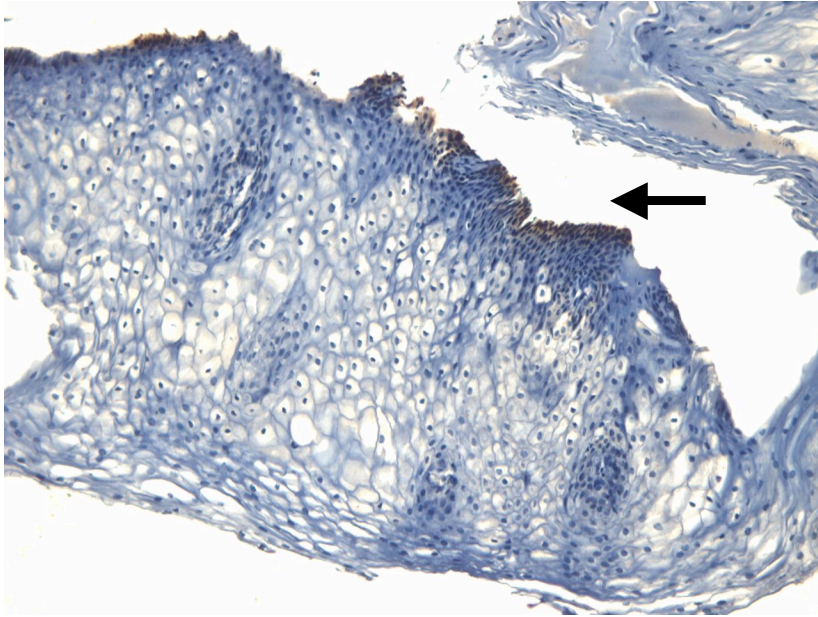


Figure 2. Esophageal biopsy from a GERD patient with grade A esophagitis on endoscopy and mild esophagitis on histological examination, positive for EGFR expression (arrow shows positive EGFR expression)

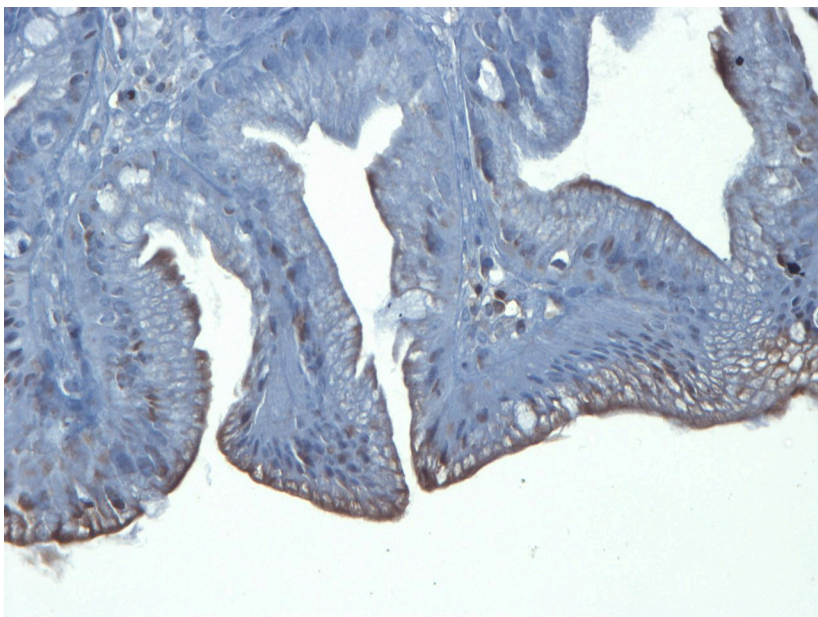


Figure 3. Esophageal biopsy from a patient with Barrett's esophagus, positive for EGFR expression

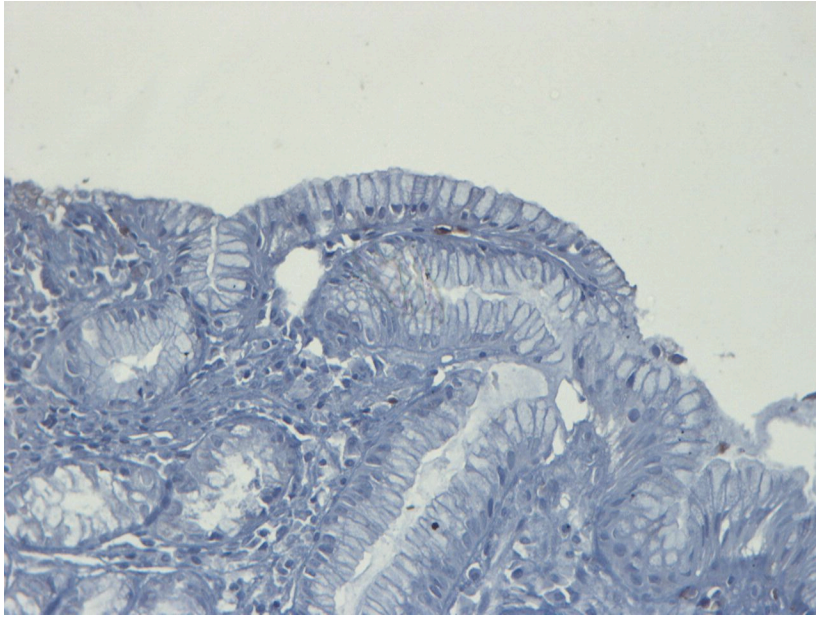
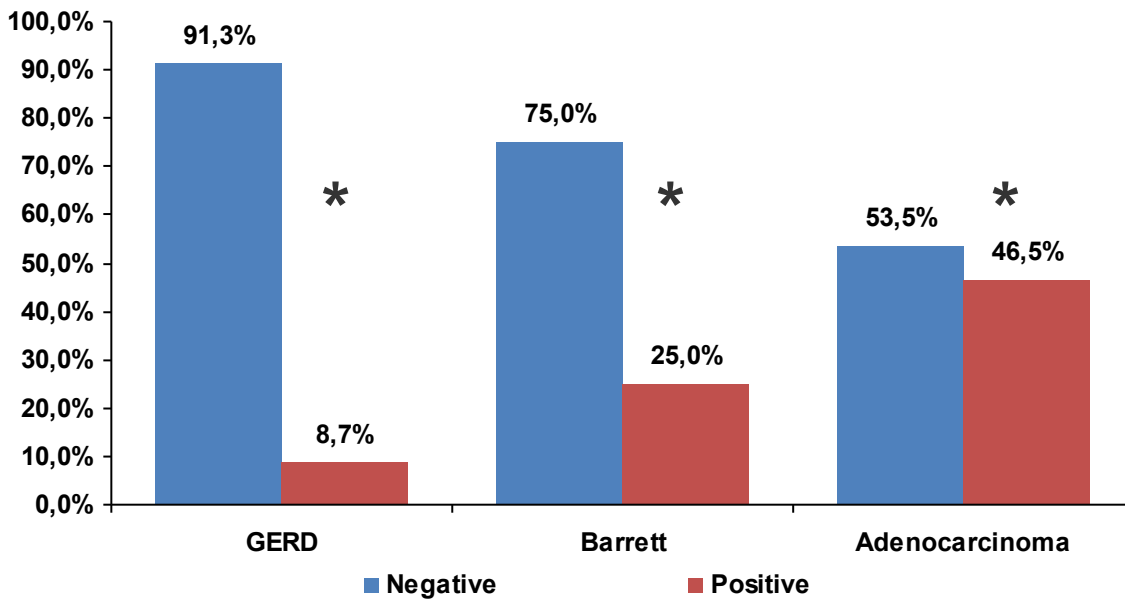


Figure 4. Esophageal biopsy from a patient with Barrett's esophagus, negative for EGFR expression

Immunohistochemical Analysis of EGFR Histopathologic Classification

* p = 0,0001



GERD: gastroesophageal reflux disease.

Figure 5. Immunohistochemical expression of EGFR in the three groups assessed.

A comparison between symptoms presented by patients with GERD and Barrett’s esophagus did not reveal significant differences between the two groups. Pain showed a trend toward being a protective factor against EGFR positivity, however without statistical significance.

A separate analysis of EGFR expression was conducted using a different group classification, based on endoscopic findings, as follows: Group 1, patients with no abnormal findings or mild disorders (normal EGD and esophagitis grades A-C on the Los Angeles classification); Group 2, patients with severe disorders (grade D esophagitis on EGD and presence of columnar epithelium, regardless of confirmation of intestinal metaplasia); and Group 3, patients with findings suggestive of neoplasia (ulcerated, vegetative lesions). EGFR immunohistochemical analysis was positive in 5.7% (6/104) of patients in Group 1, in 23.4% (11/47) of those in Group 2, and in 46.5% (20/43) of patients in Group 3 (Figure 6).

Immunohistochemical Analysis of EGFR Endoscopic Classification

* p = 0,0001

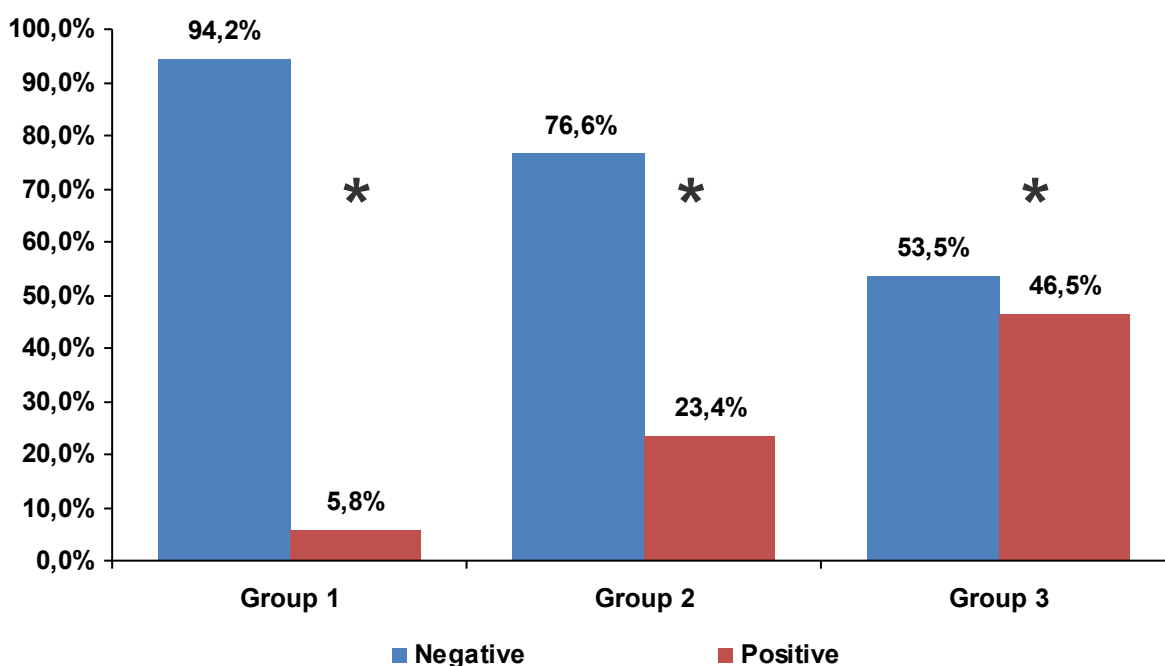


Figure 6. Immunohistochemical expression of EGFR according to endoscopic findings (group 1: patients with normal endoscopic or esophagitis grades A-C on the Los Angeles classification; group 2: grade D esophagitis and presence of columnar epithelium, regardless of confirmation of intestinal metaplasia; group 3: patients with findings suggestive of malignancy, i.e. ulcerated or vegetative lesions)

Analysis of the three endoscopy-based groups revealed that higher levels of EGFR expression were found in patients with more severe endoscopic findings. A statistical difference was observed when comparing Group 1 with Groups 2 and 3, with significantly higher levels of EGFR expression in the latter two groups.

DISCUSSION

GERD is a benign pathology associated with a wide range of clinical manifestations. Such manifestations may be mild, with occasional symptoms, or they may occur frequently and reduce the patient's quality of life.^{2, 6, 7} Furthermore, GERD may progress to more severe conditions, e.g. Barrett's esophagus, and thus increase the risk of development of adenocarcinoma of the esophagus.^{33, 34} Some of the characteristics of disease progression from GERD to Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma are already well understood. However, it remains unclear why some patients enjoy a benign outcome, whereas others have a poor prognosis.

The term epidermal growth factor refers to the role played by this polypeptide in mitogenesis and cell proliferation, not only in the esophagus, but in the entire gastrointestinal tract.¹⁸ Salivary glands have been shown to release EGF, which was initially thought to act on esophageal epithelial revitalization and healing.^{35, 36} Experimental studies conducted with guinea pigs, rats,³⁷⁻³⁹ monkeys,¹⁹ rabbits,⁴⁰ and pigs³⁸ injected with recombinant human EGF, all observed cell proliferation, primarily of the mucosa and submucosa, resulting in thickening of the esophageal wall and increased esophageal diameter (both internal and external diameters).³⁷⁻³⁹

However, questions remain unanswered about the role of EGF and its receptor EGFR under benign conditions. Studies designed to determine the concentration of EGF in normal human saliva found no differences between patients with GERD and Barrett's esophagus, which contradicts the theory that esophagitis could be caused by a deficiency of growth factors in the saliva.⁸ In turn, an experimental study of rats with surgically induced esophagitis showed EGFR overexpression to be an epithelial response to insult.^{41, 42}

Early investigations of EGFR expression in Barrett's esophagus were descriptive only.^{26, 43, 44} The first study to include a control group compared biopsies obtained from patients with Barrett's esophagus and from controls (patients with no pathology detected on

EGD).¹⁷ More recently, a study in China assessed the relationship between EGFR and cyclooxygenase-2 (another enzyme involved in tumor growth) in esophageal biopsies obtained from patients with Barrett's disease (with a range of grades of cell differentiation), with adenocarcinoma of the esophagus, and control patients with columnar epithelium but no intestinal metaplasia.²⁷ The two main strengths of that study were the design and the fact that immunohistochemical analysis was computer-assisted, allowing quantitative analysis of the markers. The authors reported higher levels of EGFR expression in patients with cancer and Barrett's esophagus when compared with the control group; moreover, within the Barrett's esophagus group, there was a progressive increase in EGFR expression as the degree of epithelial dysplasia increased. We did not assess grade of dysplasia in patients with Barrett's esophagus in our study, but we also identified an association between abnormal anatomopathological findings and EGFR overexpression.

Another study has assessed biopsies from patients with esophageal cancer and has identified increased EGFR expression in tumors with a more severe histological classification and metastatic lymph nodes.⁴⁵ That study was the first to suggest an association between EGFR expression and poor prognosis in patients with esophageal cancer. Other neoplasms, such as cancer of the lung,⁴⁶ breast,⁴⁷ bladder,⁴⁸ and colon,⁴⁹ have also presented worse prognoses associated with higher EGFR expression levels.

Finally, a recent study conducted at the MD Anderson Cancer Center to investigate the relationship between EGFR expression and tumor prognosis, using the same immunohistochemical classification adopted in our study, found positive results for EGFR expression in 32% of the cases.²⁸ Other studies assessing adenocarcinoma of the esophagus found EGFR positivity in 64%⁵⁰ and 39%²⁵ of patients. In our study, EGFR expression was positive in 46.5% of the patients with adenocarcinoma, a finding that is within the range found in the literature.

The hypothesis that the role of EGF is to restore esophageal epithelium is not compatible with the finding of EGFR overexpression in tissues with malignant and premalignant abnormalities, and even less so in tissues with more severe histological findings. During neoplastic transformation, cell cycle aberrations lead to uncontrolled cell replication, a molecular mechanism that has been suspected of involvement in carcinogenesis.⁵¹ EGFR is part of the receptor tyrosine kinase family and is responsible for a complex cascade of events that include cell proliferation, differentiation, adhesion and migration.^{20, 21, 27, 52} It contains three regions: an extracellular binding domain, the intracellular region (where tyrosine kinase activity takes place), and a transmembrane domain.⁵³ Within this structure, signals transmitted

across the plasma membrane activate gene expression and induce cell responses. During oncogenesis, overexpression of growth factor receptors makes the cellular environment more susceptible to triggering cell proliferation and developing neoplasms.^{22, 54, 55} Lower amounts of growth factors would be needed to maintain abnormal levels of cell proliferation. The increase in EGFR expression may regulate expression of oncogenes or of tumor suppressing genes present in intracellular signaling cascades involved in the production of other endogenous growth factors.^{56, 57}

Our study immunohistochemically assessed the expression of EGFR in patients with GERD, Barrett's esophagus, and esophageal adenocarcinoma. Confirming previous studies, we found higher levels of EGFR expression in patients with premalignant disease and cancer, pointing to the existence of a group of patients with esophageal disease who are at higher risk for a poor prognosis.

One particular feature of our study was the assessment of patients with a diagnosis of GERD, who represent the majority of patients daily seen by gastroenterologists in clinical practice. We did not find any previous reports in the literature analyzing EGFR expression in this population. Our GERD group, comprised of patients at early stages of the disease, showed significantly lower levels of EGFR expression. This finding seems to corroborate the better prognosis associated with GERD and to confirm that increases in EGFR levels have a direct relationship with more severe inflammatory processes, resulting from greater insult to the esophageal epithelium. Measurement of EGFR levels in relation to disease progression was beyond the objectives of the present study. However, future studies are warranted to assess possible therapeutic interventions and the evolution of these patients in the long term, with a focus on the behavior of EGFR before and after treatment.

The relationship between high EGFR levels on the one hand and neoplasms with worse histological grades or lower survival rates on the other has been previously confirmed. However, patients with Barrett's esophagus have not been investigated in terms of disease progression. Although there are indications that EGFR expression is greater in cases showing greater dysplasia, there are no studies presently available that have investigated whether patients with Barrett's esophagus and positive EGFR expression are at greater risk for the development of cancer.

Considering our results, it is possible to suggest that GERD patients showing columnar epithelium or grade D esophagitis according to the Los Angeles classification, associated with EGFR overexpression, should be the primary focus of future studies designed to evaluate the prognosis of EGFR-positive GERD patients.

Our results allow to conclude that EGFR expression is lower in patients with GERD and higher in patients with Barrett's esophagus and adenocarcinoma of the esophagus. Furthermore, our results show that as the disease becomes more severe, EGFR expression increases. Although esophageal disease progression from GERD into Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma has been widely investigated, our study provides new information on EGFR expression in patients with benign disease and on the prevalence of this marker at each of the different disease stages. Finally, because EGFR expression is known to be associated with poor prognosis in esophageal adenocarcinoma, further studies are needed to follow EGFR-positive patients with benign and premalignant disease and to better investigate disease progression in this subset of patients.

CONCLUSIONS:

Immunohistochemical analysis of EGFR expression in esophageal biopsies revealed that patients with GERD show lower levels of this marker when compared with patients with Barrett's esophagus and especially patients with adenocarcinoma of the esophagus, suggesting a direct relationship between EGFR expression and disease progression.

REFERENCES

1. Moraes-Filho JP, Navarro-Rodriguez T, Barbuti R, Eisig J, Chinzon D, Bernardo W. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease: an evidence-based consensus. *Arq Gastroenterol* 2010;47:99-115.
2. Locke GR, 3rd, Talley NJ, Fett SL, Zinsmeister AR, Melton LJ, 3rd. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 1997;112:1448-56.
3. Jones RH, Lydeard SE, Hobbs FD, et al. Dyspepsia in England and Scotland. *Gut* 1990;31:401-5.
4. Moraes-Filho JP, Chinzon D, Eisig JN, Hashimoto CL, Zaterka S. Prevalence of heartburn and gastroesophageal reflux disease in the urban Brazilian population. *Arq Gastroenterol* 2005;42:122-7.
5. Gurski RR, da Rosa AR, do Valle E, de Borba MA, Valiati AA. Extraesophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease. *J Bras Pneumol* 2006;32:150-60.
6. Kahrilas PJ, Shaheen NJ, Vaezi MF. American Gastroenterological Association Institute technical review on the management of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 2008;135:1392-413, 413 e1-5.
7. Kahrilas PJ. Clinical practice. Gastroesophageal reflux disease. *N Engl J Med* 2008;359:1700-7.
8. Kongara K, Varilek G, Soffer EE. Salivary growth factors and cytokines are not deficient in patients with gastroesophageal reflux disease or Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci* 2001;46:606-9.
9. Campos GM, Peters JH, DeMeester TR, Oberg S, Crookes PF, Mason RJ. The pattern of esophageal acid exposure in gastroesophageal reflux disease influences the severity of the disease. *Arch Surg* 1999;134:882-7; discussion 7-8.
10. DeMeester TR, Johnson LF, Joseph GJ, Toscano MS, Hall AW, Skinner DB. Patterns of gastroesophageal reflux in health and disease. *Ann Surg* 1976;184:459-70.
11. DeMeester TR, Johnson LF. The evaluation of objective measurements of gastroesophageal reflux and their contribution to patient management. *Surg Clin North Am* 1976;56:39-53.
12. Wang C, Hunt RH. Precise role of acid in non-erosive reflux disease. *Digestion* 2008;78 Suppl 1:31-41.
13. Orlando RC. Esophageal epithelial defense against acid injury. *J Clin Gastroenterol* 1991;13 Suppl 2:S1-5.
14. Marcinkiewicz M, Han K, Zbroch T, et al. The potential role of the esophageal pre-epithelial barrier components in the maintenance of integrity of the esophageal mucosa in patients with endoscopically negative gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1652-60.
15. Barlow WJ, Orlando RC. The pathogenesis of heartburn in nonerosive reflux disease: a unifying hypothesis. *Gastroenterology* 2005;128:771-8.
16. Okuyama M, Fujiwara Y, Tanigawa T, et al. Roles of ZO-1 and epidermal growth factor in esophageal epithelial defense against acid. *Digestion* 2007;75:135-41.
17. Jankowski J, Murphy S, Coghill G, et al. Epidermal growth factor receptors in the oesophagus. *Gut* 1992;33:439-43.
18. Jankowski J, Coghill G, Tregaskis B, Hopwood D, Wormsley KG. Epidermal growth factor in the oesophagus. *Gut* 1992;33:1448-53.
19. Reindel JF, Gough AW, Pilcher GD, Bobrowski WF, Sobocinski GP, de la Iglesia FA. Systemic proliferative changes and clinical signs in cynomolgus monkeys administered a recombinant derivative of human epidermal growth factor. *Toxicol Pathol* 2001;29:159-73.

20. Playford RJ, Hanby AM, Gschmeissner S, Peiffer LP, Wright NA, McGarrity T. The epidermal growth factor receptor (EGF-R) is present on the basolateral, but not the apical, surface of enterocytes in the human gastrointestinal tract. *Gut* 1996;39:262-6.
21. Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 1997;410:83-6.
22. Koppert LB, Wijnhoven BP, van Dekken H, Tilanus HW, Dinjens WN. The molecular biology of esophageal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2005;92:169-90.
23. Morgan S, Grandis JR. ErbB receptors in the biology and pathology of the aerodigestive tract. *Exp Cell Res* 2009;315:572-82.
24. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008;358:1160-74.
25. Wilkinson NW, Black JD, Roukhadze E, et al. Epidermal growth factor receptor expression correlates with histologic grade in resected esophageal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2004;8:448-53.
26. Jankowski J, Hopwood D, Pringle R, Wormsley KG. Increased expression of epidermal growth factor receptors in Barrett's esophagus associated with alkaline reflux: a putative model for carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1993;88:402-8.
27. Li Y, Wo JM, Ray MB, et al. Cyclooxygenase-2 and epithelial growth factor receptor up-regulation during progression of Barrett's esophagus to adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2006;12:928-34.
28. Wang KL, Wu TT, Choi IS, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Cancer* 2007;109:658-67.
29. Levine DS, Haggitt RC, Blount PL, Rabinovitch PS, Rusch VW, Reid BJ. An endoscopic biopsy protocol can differentiate high-grade dysplasia from early adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1993;105:40-50.
30. Flora-Filho R, Camara-Lopes LH, Zilberstein B. [Histological criteria of esophagitis in the gastroesophageal reflux disease. Reevaluation of the sensitivity of the esophageal 24-hours pHmetry]. *Arq Gastroenterol* 2000;37:197-202.
31. Lundell LR, Dent J, Bennett JR, et al. Endoscopic assessment of oesophagitis: clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification. *Gut* 1999;45:172-80.
32. Riddell RH. The biopsy diagnosis of gastroesophageal reflux disease, "carditis," and Barrett's esophagus, and sequelae of therapy. *Am J Surg Pathol* 1996;20 Suppl 1:S31-50.
33. Pera M, Cameron AJ, Trastek VF, Carpenter HA, Zinsmeister AR. Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. In: *Gastroenterology*. United States; 1993:510-3.
34. Altorki NK, Oliveria S, Schrupp DS. Epidemiology and molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. In: *Semin Surg Oncol*. United States; 1997:270-80.
35. Sakai Y, Nelson KG, Snedeker S, et al. Expression of epidermal growth factor in suprabasal cells of stratified squamous epithelia: implications for a role in differentiation. *Cell Growth Differ* 1994;5:527-35.
36. Qureshi FG, Tchorzewski MT, Duncan MD, Harmon JW. EGF and IGF-I synergistically stimulate proliferation of human esophageal epithelial cells. In: *J Surg Res*. United States; 1997:354-8.
37. Breider MA, Bleavins MR, Reindel JF, Gough AW, de la Iglesia FA. Cellular hyperplasia in rats following continuous intravenous infusion of recombinant human epidermal growth factor. *Vet Pathol* 1996;33:184-94.

38. Juhl CO, Vinter-Jensen L, Poulsen SS, Orntoft TF, Dajani EZ. Chronic treatment with epidermal growth factor causes esophageal epithelial hyperplasia in pigs and rats. *Dig Dis Sci* 1995;40:2717-23.
39. Zhao J, Yang J, Vinter-Jensen L, Zhuang F, Gregersen H. Biomechanical properties of esophagus during systemic treatment with epidermal growth factor in rats. *Ann Biomed Eng* 2003;31:700-9.
40. Jimenez P, Lanas A, Piazuolo E, Esteva F. Effect of growth factors and prostaglandin E2 on restitution and proliferation of rabbit esophageal epithelial cells. *Dig Dis Sci* 1998;43:2309-16.
41. Fujiwara Y, Higuchi K, Takashima T, et al. Roles of epidermal growth factor and Na⁺/H⁺ exchanger-1 in esophageal epithelial defense against acid-induced injury. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. United States; 2006:G665-73.
42. Fujiwara Y, Higuchi K, Hamaguchi M, et al. Increased expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptors in rat chronic reflux esophagitis. In: *J Gastroenterol Hepatol*. Australia; 2004:521-7.
43. Jankowski J, Hopwood D, Wormsley KG. Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha and their receptor in gastro-oesophageal diseases. *Dig Dis* 1993;11:1-11.
44. Poller DN, Steele RJ, Morrell K. Epidermal growth factor receptor expression in Barrett's esophagus. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:1226-7.
45. Mukaida H, Yamamoto T, Hirai T, et al. Expression of human epidermal growth factor and its receptor in esophageal cancer. *Jpn J Surg* 1990;20:275-82.
46. Scagliotti GV, Selvaggi G, Novello S, Hirsch FR. The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer. In: *Clin Cancer Res*. United States; 2004:4227s-32s.
47. Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L. Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer* 1994;74:381-400.
48. Vet JA, Debruyne FM, Schalken JA. Molecular prognostic factors in bladder cancer. *World J Urol* 1994;12:84-8.
49. O'Dwyer P J, Benson AB, 3rd. Epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer. *Semin Oncol* 2002;29:10-7.
50. Yacoub L, Goldman H, Odze RD. Transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor receptor, and MiB-1 expression in Barrett's-associated neoplasia: correlation with prognosis. *Mod Pathol* 1997;10:105-12.
51. Lazebnik Y. What are the hallmarks of cancer? *Nat Rev Cancer* 2010;10:232-3.
52. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. In: *Eur J Cancer*. England; 2001:S3-8.
53. Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 1997;8:1197-206.
54. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. In: *Cell*. United States; 2000:57-70.
55. Okawa T, Michaylira CZ, Kalabis J, et al. The functional interplay between EGFR overexpression, hTERT activation, and p53 mutation in esophageal epithelial cells with activation of stromal fibroblasts induces tumor development, invasion, and differentiation. In: *Genes Dev*. United States; 2007:2788-803.
56. Logan A. Intracrine regulation at the nucleus--a further mechanism of growth factor activity? *J Endocrinol* 1990;125:339-43.
57. Aaronson SA. Growth factors and cancer. *Science* 1991;254:1146-53.