

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

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO C-MYC NA SEQÜÊNCIA
METAPLASIA-DISPLASIA-ADENOCARCINOMA NO ESÔFAGO**

MARCELO KRUEL SCHMIDT

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas:
Cirurgia, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul

**Orientador: Prof^o Dr. Richard Ricachenevsky Gurski
Co-Orientadora: Prof^a Dra. Luise Meurer**

PORTO ALEGRE

2005

Dedicatória:

Aos Meus Pais, Norton Weissheimer Schmidt e Elizabeth Kruehl Schmidt, pelo amor e carinho sempre presentes, e pelos ensinamentos que nortearam a minha formação.

À Minha Esposa, Lílian Ponte Troviscal, pelo carinho e compreensão. Pelo amor e pelo convívio prazeroso que fizeram de mim uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Richard Ricachenevsky Gurski, meu orientador, pela sua dedicação e confiança. Sua obstinação científica, sua habilidade de ensinar e o seu empenho incansável em aprimorar meus conhecimentos serviram-me de exemplo de profissional e professor a ser seguido.

À Prof. Dra. Luíse Meurer, minha co-orientadora, pela sua constante presença, mesmo nas horas mais impróprias. Sua determinação e generosidade sem limites tornaram possível a concretização deste projeto.

Ao Dr. Bernardo Silveira Volkweis, amigo e colega, pelo exemplo de responsabilidade e determinação. Sua preocupação com o bem estar daqueles que o cercam, torna-o singular.

Ao Dr. André Ricardo Pereira da Rosa, pelo incentivo e companheirismo. Sua visão crítica e conhecimento profundo na língua portuguesa contribuíram de forma importante no aprimoramento deste trabalho.

Ao Dr. Alessandro Bersch Osvaldt, pela amizade, pelos ensinamentos em medicina e principalmente para a vida, e pelas aulas de informática.

À Prof. Dra. Maria Isabel Edelweiss, pelo carinho e atenção. Sua satisfação em buscar novos conhecimentos e seu modo responsável e prazeroso de participar de projetos de estudo servem de incentivo à pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Kruel, pelo exemplo de dedicação à pesquisa científica.

À Dra. Vânia Naomi Hirakatu, pelo auxílio na análise estatística.

Aos acadêmicos de medicina Maurício Longaray, Marcos Somaglia e Cleber Brenner, pela inestimável colaboração na coleta de dados.

Ao Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio estrutural para a realização deste estudo. Especial agradecimento a Sra. Zeli Fogaça

Pacheco, pelo auxílio incansável na busca de lâminas e blocos de parafina, e a Sra. Flávia Giusti, pela presteza dedicada na confecção das lâminas.

Ao Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE), pelo auxílio financeiro.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA), pela orientação e apoio na realização de todas as fases deste estudo.

Ao Centro de Pesquisas, na pessoa da Sra. Rosane Schlatter, por oferecer todas as condições estruturais para a realização deste estudo.

A Sra. Estela Maris Emer Araripe e a Sra. Helena Costa, secretárias do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, pelo incentivo, amizade, pelos esclarecimentos e soluções.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, por oferecer-me condições em prosseguir com minha formação acadêmica.

Agradecimento especial ao:

Sr. Rui Manoel Considra Fernandes Troviscal, a Sra. Beatriz Ponte Troviscal e a Srta. Renata Ponte Troviscal, que foram minha segunda família enquanto longe de casa. O amor, carinho, e cuidados a mim dedicados fizeram com que me sentisse seu filho e irmão.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	03
2.1 Esôfago de Barrett: Conceitos e Definições.....	03
2.2 Etiopatogenia do Esôfago de Barrett.....	04
2.2.1 Manometria e pHmetria Esofágica.....	05
2.2.2 Papel do conteúdo do refluxo.....	05
2.2.3 Importância do refluxo misto.....	07
2.3 Epidemiologia do Esôfago de Barrett.....	08
2.4 Esôfago de Barrett como lesão precursora do adenocarcinoma.....	11
2.5 Marcadores celulares prognósticos no Esôfago de Barrett.....	13
2.5.1 Regulação da expressão do c-myc.....	14
2.5.2 Função do c-myc no desenvolvimento de neoplasia.....	17
2.5.3 c-myc no desenvolvimento do adenocarcinoma de esôfago.....	19
3. JUSTIFICATIVA.....	22
4. OBJETIVOS.....	23
5. MÉTODOS.....	24
5.1 População em Estudo.....	24
5.2 Cálculo Amostral.....	24
5.3 Critérios de Inclusão.....	25
5.4 Critérios de Exclusão.....	25

5.5 Elegibilidade dos Pacientes.....	25
5.6 Critérios Diagnósticos de Esôfago de Barrett, displasia e adenocarcinoma.....	26
5.7 Análise Imunohistoquímica.....	27
5.8 Considerações Éticas.....	29
5.9 Análise Estatística.....	30
6. RESULTADOS.....	31
7. DISCUSSÃO.....	38
7.1 Metodologia do Estudo.....	38
7.2 Interpretação dos Resultados.....	40
8. CONCLUSÕES.....	45
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXOS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

CEE	- carcinoma epidermóide de esôfago
ACE	- adenocarcinoma de esôfago
EB	- esôfago de Barrett
JEG	- junção esofagogástrica
JEC	- junção escamocolunar
DRGE	- doença do refluxo gastresofágico
ACG	- American College of Gastroenterology
EEI	- esfíncter esofágico inferior
EDA	- endoscopia digestiva alta
DNA	- ácido desoxirribonucleico
GCEEID	- grupo de cirurgia do esôfago, estômago e intestino delgado
HCPA	- Hospital de Clinicas de Porto Alegre
DBG	- displasia de baixo grau
DGA	- displasia de alto grau
H&E	- hematoxilina & eosina
IRS	- Immunoreactive Scoring System
ANOVA	- análise de variância
SPSS	- Statistical Package for Social Science
MIC	- metaplasia intestinal do cárdia
TNM	- Sistema de Estadiamento Tumoral

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1:** A. Visão endoscópica da transição escamocolunar com projeção de epitélio colunar em esôfago distal. B. Identificação de metaplasia intestinal com células caliciformes coradas pelo Alcian Blue.
- Figura 2:** Curva de dissociação dos ácidos biliares.
- Figura 3:** Representação da seqüência Metaplasia-Displasia-Adenocarcinoma no Esôfago de Barrett.
- Figura 4:** Fases do ciclo celular.
- Figura 5:** Transdução do sinal da membrana celular até o núcleo.
- Figura 6:** Escore de reatividade quanto à intensidade de coloração imunohistoquímica em campo visual de grande aumento (400x).
- Figura 7.** Escore de reatividade quanto a proporção de positividade imunohistoquímica celular em campo visual de grande aumento (400x).
- Figura 8.** Fluxograma dos pacientes ao longo de sua seleção.
- Figura 9.** Aspecto histológico de EB sem displasia.
- Figura 10.** Aspecto histológico de EB com displasia.
- Figura 11.** Aspecto histológico de adenocarcinoma.
- Figura 12.** Correlação da positividade imunohistoquímica do *c-Myc* entre os grupos estudados
- Figura 13.** Expressão do *c-Myc* em relação ao comprimento do epitélio colunar.
- Figura 14:** Escore de Imunorreatividade do *c-Myc* nos pacientes com adenocarcinoma segundo diferenciação histológica.
- Figura 15:** Imunorreatividade do *c-Myc* X Estadiamento tumoral
- Tabela 1:** Características demográficas dos 122 pacientes em estudo.

RESUMO

Introdução e Objetivos: O esôfago de Barrett (BE) desenvolve-se como consequência de uma agressão acentuada sobre a mucosa esofágica causada pelo refluxo gastresofágico crônico. É uma lesão precursora e exerce papel importante no desenvolvimento do adenocarcinoma esofágico (ACE). Inúmeras alterações genéticas estão presentes ao longo da transformação tumoral de uma célula, sendo o *c-Myc* um dos principais genes envolvidos na carcinogênese humana. O objetivo do presente estudo foi determinar a expressão do c-myc em pacientes com EB e com adenocarcinoma esofágico, e avaliar esta prevalência relacionada com a seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma.

Métodos: A expressão da proteína do C-myc foi determinada através da análise imunohistoquímica em quatro grupos diferentes: 31 pacientes com tecido normal, 43 pacientes com EB sem displasia, 11 pacientes com displasia em EB e 37 pacientes com o adenocarcinoma esofágico. O material foi obtido de peças de biópsias ou de ressecção cirúrgica de pacientes atendidos pelo Grupo de Cirurgia de Esôfago, Estômago e Intestino Delgado (GCEEID) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) no período de janeiro 1998 a fevereiro 2004. Dados demográficos e endoscópicos (sexo, idade, raça, tamanho hiatal da hérnia e extensão do epitélio colunar esofágico), e as características morfológicas e histopatológicas tumorais (invasão tumoral, comprometimento linfonodal, e diferenciação histológica do tumor) foram analisados. A expressão de *c-Myc* foi avaliada usando o sistema de escore de imunorreatividade (Immunoreactive Scoring System - ISS).

Resultados: Expressão aumentada do c-myc foi encontrada em apenas 9,7% das amostras de epitélio normal, em 37,2% dos pacientes com EB, em 45,5% dos pacientes com displasia e em 73% dos pacientes com adenocarcinoma, com diferença estatística significativa entre os grupos. Nenhuma associação foi identificada quando a expressão do *c-Myc* foi comparada as características morfológicas e histológicas do tumor ou aos dados endoscópicos. Entretanto, uma correlação linear da expressão do c-myc ao longo da seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma foi observada.

Conclusão: O estudo demonstrou um aumento significativo da expressão do *c-Myc* no EB, na displasia, e no adenocarcinoma em relação aos controles, bem como uma progressão linear da positividade deste gene ao longo desta seqüência. Estes resultados apontam para um papel importante deste marcador no desenvolvimento do ACE a partir do EB. Esta expressão aumentada do *c-Myc* em pacientes com EB poderá ajudar a identificar pacientes com risco elevado para o desenvolvimento de adenocarcinoma, contribuindo para um diagnóstico precoce desta doença.

Palavras-Chave: Barrett, esôfago, adenocarcinoma, c-myc, imunohistoquímica.

ABSTRACT

Background & Aims: Barrett's esophagus (BE) develops as a result of severe esophageal mucosa injury from gastroesophageal reflux. BE is premalignant lesion and plays important role in the development of esophageal adenocarcinoma. Several genetic alterations have been identified in the transforming process through a normal cell to tumor one, where the c-myc is one of the most important genes involved in the development of human tumors. The aim of the present study was to determine the expression of the c-myc in patients with BE and esophageal adenocarcinoma, and to evaluate this prevalence in relation to the metaplasia-displasia-adenocarcinoma sequence.

Methods: The c-myc protein expression was determined by immunohistochemical analysis in four different groups: 31 patients with normal tissue, 43 patients with BE without dysplasia, 11 patients with dysplasia in BE and 37 patients with esophageal adenocarcinoma. The material was obtained from esophageal biopsy or dissection of esophagectomy specimens of patients from the Esophagus, Stomach and Small Bowel Surgery Group of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre from January 1998 to February 2004. Demographic and endoscopic data (sex, age, race, hiatal hernia size and intestinal metaplasia extension), and morphologic and histopathologic tumor characteristics (deep tumor invasion, lymph node status, and tumor differentiation) were analyzed. The c-myc expression was assessed using the Immunoreactive Scoring System (IRS).

Results: Overexpression of c-myc was found in only 9.6% of normal tissue specimens, 37,2% of Barrett's esophagus, 45,5% of BE patients with displasia and 73% adenocarcinoma samples, with significant statistic difference among these groups. No association was identified when the c-myc expression was compared with morphologic and histologic tumor features or endoscopic data. However, linear correlation of c-myc overexpression along the metaplasia-displasia-adenocarcinoma sequence was observed.

Conclusion: The study demonstrated a significant increase of the expression of c-myc in Barrett's esophagus, dysplasia and adenocarcinoma in relation to the control group, as well as a linear progression of this gene expression in this sequence. These results put forward to an important role of this marker in the development of ACE from EB. The increased expression of the c-myc in patients with EB may help to identify patients with increased risk for adenocarcinoma development, contributing to an early diagnosis of this disease.

Key-Words: Barrett, esophagus, esophageal adenocarcinoma, c-myc, immunohistochemistry,

1. INTRODUÇÃO

Até a década de 60, noventa por cento dos tumores esofágicos nos Estados Unidos eram do tipo carcinoma epidermóide (CEE) (1;2). Todavia, nas últimas duas décadas, a frequência de adenocarcinoma de esôfago (ACE) e da junção esofagogástrica (JEG) tem aumentado de tal forma que a sua ocorrência é hoje quase a mesma que a do CEE nos países industrializados (3-6).

O aumento da incidência do ACE associado ao reconhecimento do Esôfago de Barrett (EB) como seu precursor pré-maligno tem estimulado pesquisas em busca de métodos de detecção precoce do ACE e sua relação com o EB. O adenocarcinoma desenvolve-se através de estágios de metaplasia, seguido de graus crescentes de displasia até o carcinoma invasor. A natureza pré-maligna do EB atribui aos pacientes um risco anual de desenvolvimento de ACE de 0,5% a 2% (7-9), representando um risco 30 a 125 vezes maior que o da população geral (10-14).

Apesar dos avanços nas várias modalidades de tratamento, o prognóstico do ACE ainda é ruim. Embora o ACE acometa apenas 10% dos pacientes com EB, é fundamental que se consiga identificar precocemente aqueles pacientes com risco aumentado de desenvolver um carcinoma invasor.

Um melhor entendimento da biologia molecular do EB pode auxiliar no diagnóstico, na terapêutica e no prognóstico destes pacientes. A caracterização do mecanismo molecular que promove a progressão do EB pode levar à identificação de potenciais marcadores genéticos preditivos para o risco de desenvolvimento de câncer de esôfago. Anormalidades genéticas envolvendo uma variedade de oncogenes, genes supressores tumorais, moléculas de adesão celular e fatores de crescimento têm sido identificados. No entanto, o envolvimento funcional destas anormalidades no direcionamento da carcinogênese ainda está por ser definido.

O c-myc é um dos fatores envolvidos no processo de gênese tumoral. Localizado no cromossomo 8 (8q23-24), é um proto-oncogene que atua de forma complexa na carcinogênese humana, estando presente, fundamentalmente, nos processos de proliferação e crescimento celular e na apoptose. Sua expressão gênica alterada tem sido observada em tumores de estômago, cólon, mama, pulmão, além do linfoma de Burkitt (15;16). No entanto, o papel do c-myc na carcinogênese do EB e do ACE ainda é pouco conhecido.

Apesar dos estudos para caracterizar as mudanças genéticas em pacientes com EB, a patogênese deste tipo de metaplasia ainda é controversa. A descoberta de marcadores celulares que identifiquem subgrupos de pacientes com EB com perfil molecular para desenvolver displasia e neoplasia é fundamental. Em vista disso, o presente estudo pretende avaliar a expressão do c-myc em pacientes com EB e ACE, além de buscar estabelecer uma correlação prognóstica desta expressão na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Esôfago de Barrett: Conceitos e definições

Em 1950, Norman Barrett, um renomado cirurgião inglês, descreveu as seções do trato gastrintestinal de acordo com suas respectivas mucosas. Conceituou como esôfago “todo o segmento que se encontrava caudal ao esfíncter cricofaríngeo cuja mucosa era constituída de epitélio escamoso” (17). Desta forma, a porção tubular distal à junção escamocolunar deveria ser entendida como o segmento inicial do estômago.

Em 1957, Barrett retifica seu conceito inicial afirmando que o epitélio colunar distal à junção escamocolunar (JEC) não possuía função nem características histológicas de mucosa gástrica, questionando a origem congênita deste segmento. Surge então o termo “esôfago revestido de epitélio colunar”, que mais tarde receberia o nome de Esôfago de Barrett (18).

A partir de então, inúmeros trabalhos tentaram definir a etiologia dessa doença, até que em 1970, Bremner e colaboradores apresentaram um estudo experimental em que se confirmou a associação entre esôfago revestido pelo epitélio colunar e a doença do refluxo gastresofágico (DRGE) (19), descartando assim a teoria congênita para o EB.

Desde a sua primeira descrição, o EB passou por diversas modificações em sua definição. Originalmente, o termo descrevia um segmento de esôfago distal cuja mucosa escamosa havia sido substituída por um epitélio colunar. A freqüente associação de esofagite e hérnia de hiato tornava difícil identificar pela endoscopia não só onde o esôfago terminava como também onde começava o estômago. Hayward, em 1961, relatou que o esôfago distal era “normalmente” revestido por um a dois centímetros de epitélio colunar (20). Mais tarde, em 1975, a definição de EB exigia a observação de uma ampla área de metaplasia colunar no esôfago distal, maior que três

centímetros - a regra dos três centímetros - além da confirmação histológica de metaplasia intestinal (21).

Somente em 1988 se estabeleceu a atual definição do EB, postulada pelo American College of Gastroenterology (ACG). O EB passou a ser definido, desde então, como a substituição do epitélio escamoso estratificado, que normalmente reveste o esôfago, por um epitélio colunar, de qualquer extensão, que possa ser identificado à endoscopia e confirmado histologicamente pela presença de metaplasia intestinal especializada com células caliciformes (22) (Figura 1).

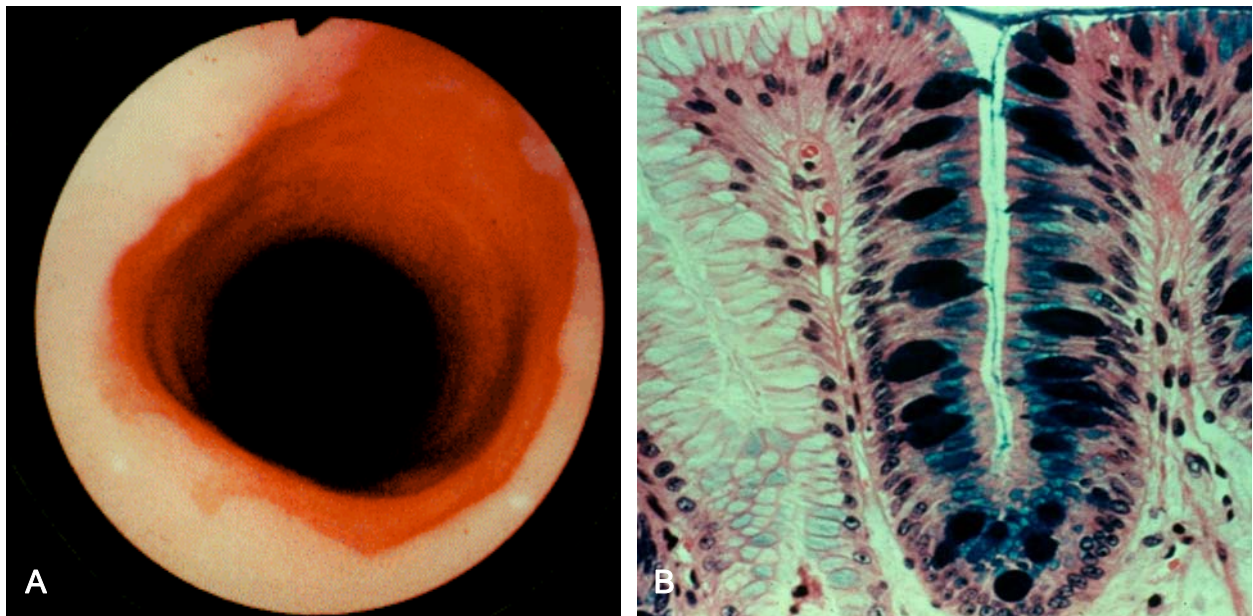


Figura 1. A. Visão endoscópica da transição escamocolunar com projeção de epitélio colunar em esôfago distal. B. Identificação de metaplasia intestinal com células caliciformes coradas pelo Alcian Blue.

2.2 Etiopatogenia do Esôfago de Barrett

O EB é uma condição adquirida que se desenvolve em conseqüência do refluxo gastresofágico. A ocorrência destes episódios de refluxo de forma mais freqüente e/ou duradoura resulta no desenvolvimento de lesão tecidual péptica sobre o epitélio

esofágico. Histologicamente, o processo inflamatório inicial manifesta-se através de um amplo espectro de alterações, que vai desde as mais sutis como expansão da zona basal do epitélio esofágico, passando por graus progressivos de esofagite, até destruição tecidual e substituição do epitélio (23).

Três importantes aspectos são característicos no paciente com DRGE que progride para o EB: o volume e tempo de exposição ao conteúdo refluído, a constituição do conteúdo e o padrão dos episódios de refluxo. Todos estes aspectos são determinantes para a seqüência de alterações celulares que inicia com um pequeno processo inflamatório e evolui até a substituição pelo epitélio colunar metaplásico.

2.2.1 Manometria e pHmetria esofágica

A pHmetria esofágica de 24 horas demonstra um refluxo ácido acentuado para o esôfago distal na maioria dos pacientes com EB (24). Isso se deve principalmente a um esfíncter esofágico inferior (EEI) estruturalmente defeituoso. A manometria esofágica identifica o EEI com comprimento e/ou pressão diminuídos em quase 90% dos pacientes com EB. Além disso, a motilidade esofágica também se encontra alterada nestes pacientes, com contrações peristálticas de baixa amplitude e um aumento na freqüência de ondas ineficazes (25). Tais características fisiopatológicas, comumente observadas nos pacientes com EB, determinam maior número de episódios de refluxo e dificultam o clareamento esofágico, permitindo uma maior exposição e agressão do refluxato ao epitélio esofágico.

2.2.2 Papel do conteúdo do refluxo

A constituição do refluxato também contribui para o surgimento do EB. O refluxo duodenogástrico, uma mistura de bile, secreção pancreática, ácido e pepsina, exerce papel muito importante. Pacientes com refluxo gástrico e duodenal apresentam uma prevalência de esofagite e de EB maior do que pacientes apenas com refluxo gástrico (26). Da mesma forma, pacientes com lesões mais graves em mucosa

esofágica possuem maior probabilidade de apresentarem refluxo misto (27). Além disso, pacientes com EB apresentam episódios mais freqüentes de refluxo duodenogástrico quando comparados a grupos controles e a pacientes com DRGE não complicada (28-30). Utilizando uma sonda espectrofotométrica sensível à bilirrubina, Champion e colaboradores identificaram a presença de bile durante pHmetria esofágica de 24 horas em 43% do tempo nos pacientes com EB, 12% nos com esofagite de refluxo e 2% no grupo controle (28).

Os sais biliares parecem ser o componente mais nocivo do conteúdo duodenal refluído, sendo sua capacidade de provocar injúria tecidual dependente do pH em que se encontra o meio. Os sais biliares somente causam dano ao epitélio esofágico quando estiverem solúveis e na forma não-ionizada. Quando em pH igual ou maior que 7, mais de 90% dos sais biliares estão ionizados. A acidificação destes para um pH inferior a 2 produz precipitação irreversível. Portanto, em condições gástricas fisiológicas, a bile é inócua. No entanto, na presença de um ambiente gástrico mais alcalino, como ocorre após a ingestão de medicação ácido-supressora, os sais biliares estão parcialmente dissociados. Em um pH dito crítico, entre 3 e 6, a bile não-ionizada pode penetrar na célula (Figura 2). Uma vez no seu interior, num ambiente alcalino, os sais biliares são convertidos novamente à forma ionizada, ficando presos no citoplasma celular onde se acumulam e se tornam tóxicos à mitocôndria celular, atuando de forma a facilitar a carcinogênese (8).

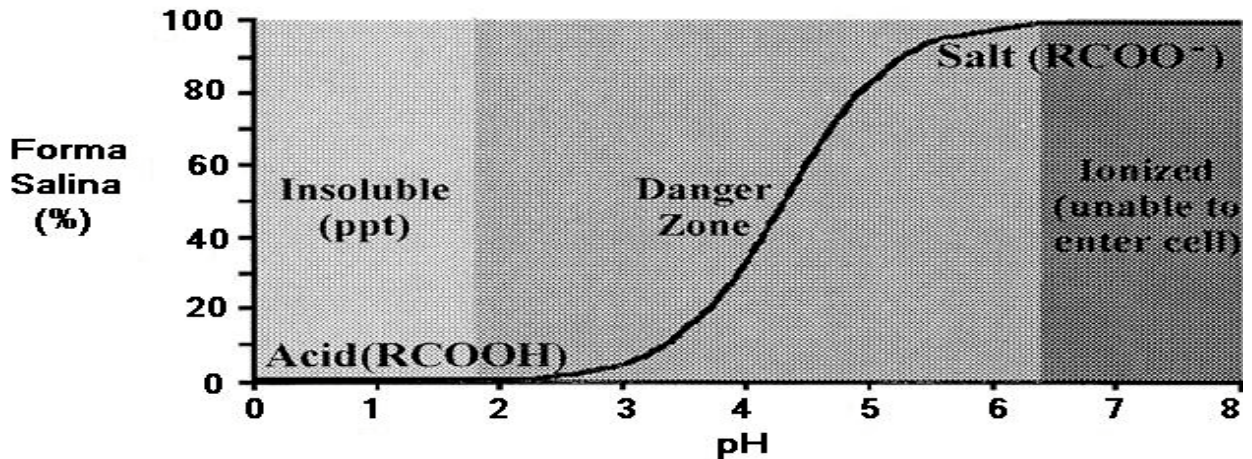


Figura 2. Curva de dissociação dos ácidos biliares. Em pH entre 3 e 6 os ácidos biliares tornam-se não ionizados e solúveis, podendo penetrar no interior da célula mucosa e exercer sua ação nociva ao provocar dano mitocondrial. (Adaptado de DeMeester SR, DeMeester TR. Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus: fifty years of controversy. *Ann Surg* 2000; 231(3):303-321).

2.2.3 Importância do refluxo misto

O padrão dos episódios de refluxo também é importante no surgimento do EB. Fitzgerald e colaboradores (31) sugeriram que a dinâmica da exposição ácida pode influenciar a proliferação e a diferenciação do epitélio colunar. Em um estudo utilizando culturas de células oriundas de biópsias de EB, estes autores demonstraram que a exposição contínua a um pH de 3,5 resultava no aumento de expressão de vilina - um marcador de diferenciação celular epitelial - e na redução da proliferação celular. Em contrapartida, quando a cultura celular foi exposta a um meio ácido (pH<2,5), não foi observada expressão alguma de vilina. Os autores então expuseram o epitélio colunar esofágico a períodos curtos em pH ácido, intercalados com exposição a um meio de pH neutro, e observaram um aumento importante na taxa de proliferação celular (31). Estudos posteriores relataram que repetidas exposições, por curto espaço de tempo, de células aos sais biliares em meio com pH entre 5 e 7, resultaram no aumento na frequência de mutações celulares (8).

Assim, não somente o volume e o tempo de exposição, mas também mudanças no pH luminal e no padrão de exposição podem promover alterações de crescimento

celular e contribuir para a heterogeneidade molecular e estrutural observadas no EB. A regeneração do epitélio esofágico agredido promove o surgimento de células escamosas imaturas que são mais sensíveis ao refluxo ácido e/ou alcalino. Embora a hierarquia da proliferação do epitélio escamoso esofágico normal seja relativamente bem conhecida, o mecanismo pelo qual áreas focais de epitélio escamoso nativo são substituídas por metaplasia intestinal ainda é incerto.

2.3 Epidemiologia do Esôfago de Barrett

O EB representa uma das conseqüências histológicas mais graves do refluxo gastresofágico crônico, acometendo 6% a 12% dos pacientes com DRGE (32). Utilizando a definição tradicional, que requer no mínimo três centímetros de epitélio colunar acima da junção gastresofágica, o EB tem sido reportado em 0,45% a 2,2% dos pacientes submetidos a endoscopia digestiva alta (33). Entretanto, se todos os pacientes com metaplasia intestinal em epitélio colunar esofágico, independente de sua extensão, fossem considerados, a incidência do EB aumentaria para 9% a 32% (34;35).

A incidência do EB tem aumentado acentuadamente desde a década de 70, associado a uma maior utilização da endoscopia digestiva alta (EDA) (36). Uma análise realizada com base em dados de necropsia nos Estados Unidos sugere que a maioria dos casos de EB não é diagnosticada na população geral (37). Aproximadamente 25% dos pacientes com EB não possuem sintomas de refluxo (38) e estima-se que para cada caso de EB diagnosticado outros cinco a vinte não são reconhecidos (39).

O EB é raro na infância e sua prevalência aumenta conforme a idade. Estima-se que a idade média para o seu desenvolvimento seja próxima dos 40 anos (23), e que sua incidência atinja um platô aos 60 anos (40). Tipicamente, pacientes com EB referem sintomas clássicos de DRGE como pirose e regurgitação, acompanhados ou

não de disfagia, e geralmente descrevem uma duração mais prolongada dos sintomas, inclusive noturnos, do que pacientes com DRGE não complicada. Em estudo realizado por Romero e colaboradores, o EB foi encontrado em 10,3% dos pacientes com sintomas que perduravam a mais de 10 anos, e em apenas 2,2% dos pacientes que referiam sintomas por um período inferior a este (41).

Idade de início, duração dos sintomas, sintomas de longa data, presença de sintomas noturnos ou complicações da DRGE, como esofagite, úlcera ou estenose, estão associados a um risco aumentado de desenvolvimento de EB. Entretanto, deve-se salientar que pacientes com EB podem apresentar sintomas que não diferem daqueles de pacientes com DRGE não complicado.

Quando comparado a pacientes com DRGE erosiva e não-erosiva, pacientes com EB possuem uma maior exposição ácida esofágica baseados em estudos de pHmetria de 24 horas (24;25;42). Parte desta exposição aumentada é atribuída à freqüente presença de hérnia hiatal, que é tipicamente maior e que torna o EEI mais defeituoso do que em pacientes controles ou com esofagite (43). Além disso, pacientes com EB apresentam uma pressão basal do EEI mais baixa do que pacientes com DRGE sem metaplasia (25).

Quando classificado de acordo com a extensão do epitélio colunar, o EB pode ser dividido em longo e curto. O primeiro caracteriza-se pela presença de três centímetros ou mais de epitélio esofágico metaplásico, cuja incidência varia de 10% e 15% dos pacientes com DRGE (44). O EB curto, com uma extensão de epitélio colunar menor que 3 centímetros, pode estar presente em até 20% dos pacientes submetidos a EDA (45).

Acredita-se que o EB desenvolva-se a partir de um grupo de células pluripotentes, embora a localização e a origem destas ainda permaneçam em discussão (46). A teoria mais aceita é a de que este grupo de células originar-se-ia a

partir de papilas da mucosa escamosa inflamada (Teoria da Metaplasia De Novo). Entretanto, há autores que afirmam que estas células estão localizadas em glândulas esofágicas e que colonizariam o esôfago quando a sua mucosa sofresse alguma forma de agressão (Teoria da Metaplasia de Célula Ductal). Uma terceira teoria postula que células presentes na junção esofagogástrica poderiam colonizar tanto a região cárdica do estômago quanto o segmento distal do esôfago (Teoria da Metaplasia de Zona de Transição) (47). Este grupo de células, quando agredido por bile e ácido, e na presença de um infiltrado inflamatório, diferencia-se por meio de uma rota alternativa dando origem a um epitélio de fenótipo característico do EB (48)

Dados epidemiológicos sugerem que, uma vez exposto à injúria suficiente para que ocorra transformação metaplásica, o EB desenvolve-se em sua total extensão de forma rápida, com pequenas alterações subseqüentes em seu comprimento (49). No entanto, estudos têm demonstrado que pacientes com EB curto podem apresentar anormalidades manométricas e na pHmetria esofágica intermediárias entre aqueles pacientes com EB longo e pacientes controles. Além disso, existe uma correlação entre o comprimento da mucosa metaplásica do EB e a duração da exposição ácida esofágica (50;51). Tais evidências parecem favorecer a hipótese de que o EB apresenta uma evolução gradativa desde o seu surgimento, com a substituição do epitélio escamoso pelo metaplásico, passando pelos graus de displasia até atingir o carcinoma invasor. Gurski e colaboradores analisaram 91 pacientes com EB em acompanhamento de tratamento clínico e cirúrgico e observaram um desaparecimento de metaplasia intestinal significativamente maior no grupo tratado cirurgicamente. Observaram também que esta regressão histológica foi mais comum no paciente com EB curto ($p < 0,05$)(52).

2.4 Esôfago de Barrett como lesão precursora

Desde a década de 70, a incidência do ACE tem crescido em muitos países ocidentais em um índice que supera qualquer outro tipo de neoplasia maligna (53-57). O ACE é o tumor de maior incidência entre homens brancos nos EUA, sendo cinco vezes mais freqüente do que em negros e mantém uma relação de 7:1 entre homens e mulheres. Este acentuado crescimento em sua incidência sugere que fatores ambientais influenciam sua etiologia.

Assim como no CEE, o álcool e o fumo também estão associados ao ACE, porém esta associação é bem mais fraca e sua distribuição geográfica é diferente. A raça branca ou hispânica, o sexo masculino e a idade avançada também são fatores que estão associados ao EB e ao desenvolvimento de ACE.

A obesidade é outro importante fator de risco, por favorecer o refluxo gastresofágico, mas a sua elevada prevalência nos países desenvolvidos não parece ser o único fator responsável. O aumento na incidência do ACE parece não ter relação com a elevação na média do índice de massa corporal observado na população dos países ocidentais nas últimas décadas. Além disso, a rapidez no crescimento da incidência do adenocarcinoma e sua marcada predominância sobre o sexo masculino desautorizam a associação direta com a obesidade (58).

Tem sido postulado que o uso de substâncias que promovem o relaxamento do EEI (nitroglicerina, anticolinérgicos, agonistas beta-adrenérgicos, aminofilina e benzodiazepínicos) pode contribuir para o aumento da incidência da doença do refluxo e suas complicações. Embora um amplo estudo caso-controle tenha demonstrado uma associação positiva entre o uso prévio de medicamentos que diminuem o tônus do EEI e o risco para desenvolvimento de ACE, esta hipótese ainda é especulativa (59). Em acréscimo, nenhuma influência hereditária tem sido encontrada na etiologia do ACE.

A DRGE está intimamente associada ao ACE, sendo apontada como o mais importante e específico fator de risco. Lagergren e colaboradores demonstraram que a presença de sintomas de refluxo gastroesofágico estava significativamente associada ao ACE. Pacientes que apresentavam sintomas de pirose e regurgitação pelo menos uma vez por semana possuíam quase oito vezes mais chance de desenvolver câncer. Entre aqueles que apresentavam sintomas noturnos o risco era onze vezes maior. Quando os pacientes possuíam uma história de sintomas de longa duração, este risco aumentava de forma significativa (59) .

Esta relação entre os sintomas de refluxo esofágico e o risco de desenvolvimento de adenocarcinoma é decorrente da associação entre DRGE e EB. Sabe-se que o epitélio com metaplasia intestinal especializada está predisposto à transformação maligna e que grande número dos ACE originam-se do EB (60-62). Entretanto, ainda se desconhece por que as células metaplásicas estão sujeitas ao desenvolvimento de ACE, uma vez que a incidência de ACE em estudos de acompanhamento de pacientes com EB varia consideravelmente, entre um caso para cada 46 pacientes/ano até um caso em 441 pacientes/ano de acompanhamento (63-65). Contudo, em mais de 95% dos casos de ACE o EB não é diagnosticado precocemente, e na maioria dos casos o paciente já se encontra com doença avançada (66).

Sabe-se que o epitélio metaplásico pode progredir para o câncer através de inflamação e irritação contínuas, mas ainda se desconhece o modo pelo qual esta seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma se inicia (Figura 3). Isso pode ocorrer devido a ação mitogênica secundária à injúria crônica sobre a mucosa esofágica ou devido à mutagênese secundária à exposição a um agente danoso à célula (8).

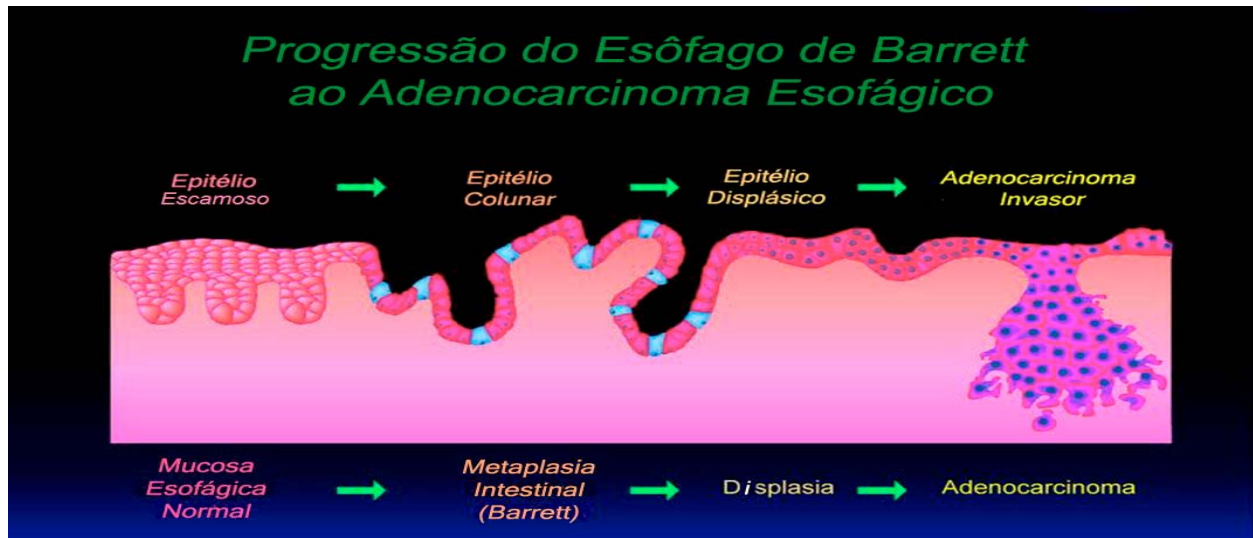


Figura 3. Representação da seqüência Metaplasia-Displasia-Adenocarcinoma no Esôfago de Barrett (Adaptado de Zhuang Z, Vortmeyer AO, Mark EJ, Odze R, Emmert-Buck MR, Merino MJ et al. Barrett's esophagus: metaplastic cells with loss of heterozygosity at the APC gene locus are clonal precursors to invasive adenocarcinoma. *Cancer Res* 1996; 56(9):1961-1964)

A progressão do EB para o ACE está associada a alterações na estrutura e na expressão gênica, e provavelmente múltiplas interações moleculares estão envolvidas na patogênese da doença.

Embora a displasia de alto grau seja aceita como precursora imediata do carcinoma invasor, a busca por novos marcadores biológicos e o melhor entendimento da patogênese do ACE podem auxiliar na identificação daqueles pacientes com EB com risco aumentado para a transformação maligna.

2.5 Marcador celular prognóstico no Esôfago de Barrett

Ao longo do processo de carcinogênese, uma seqüência de múltiplas alterações genéticas torna a célula não vulnerável a mecanismos reguladores de proliferação e de morte programada (apoptose). Com isso, a célula adquire capacidade de proliferação não-controlada e potencial invasor, tornando-se uma célula neoplásica.

Acredita-se que sejam necessárias pelo menos 5 a 10 alterações genéticas para que surja um fenótipo maligno. Como a maioria dos tumores caracteriza-se pela presença de instabilidade genômica, isso facilita o acúmulo de mutações. Esta instabilidade genômica atinge três principais classes de genes: proto-oncogenes, genes supressores tumorais e genes de reparo de emparelhamento de ácido desoxirribonucléico (DNA). Estes genes são essenciais para a regulação do ciclo celular e proliferação ordenada da célula (60).

2.5.1. Regulação da expressão do c-myc

O ciclo celular é dividido em quatro fases seqüenciais. O processo se inicia pela Fase G1, a fase de crescimento, e progride para a Fase S (Síntese), onde a síntese e replicação do DNA ocorrem. A célula passa então por uma segunda fase de crescimento, a Fase G2, e finalmente sofre divisão mitótica na Fase M (Mitose). Algumas células podem entrar em uma fase quiescente (Fase G0) a partir de G1 (Figura 4). O ciclo celular é regulado por pontos de controle (*“check-points”*) presentes nas transições G1/S e G2/M, onde as células terão o DNA com conteúdo de 2N ou 4N, respectivamente. Estes pontos de controle previnem a replicação e a divisão celular na presença de alterações cromossômicas não-reparadas (67).

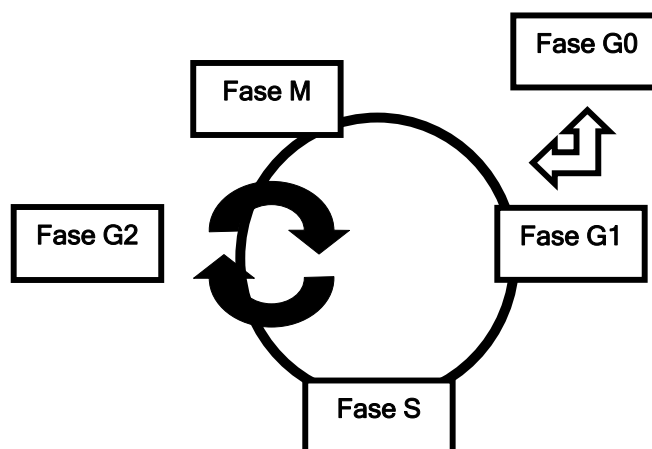


Figura 4. Fases do ciclo celular (Adaptado de Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. Ann Surg 2001; 233(3):322-337.)

Sob condições fisiológicas, a proliferação celular se processa basicamente através de quatro principais passos. O primeiro envolve a ligação de um fator de crescimento ao seu respectivo receptor na membrana celular. Esta ativação transitória e limitada do receptor, por sua vez, promove a ativação de inúmeras proteínas transdutoras de sinais, localizadas junto à porção interna da membrana celular. A seguir, mensageiros secundários transmitem o sinal através do citoplasma até o núcleo celular. Por fim, estes sinais alcançam o núcleo da célula onde se deparam com um grande número de genes, denominados fatores de regulação nuclear, que iniciam a transcrição do DNA e orquestrarão o avanço celular através do ciclo mitótico (Figura 5).

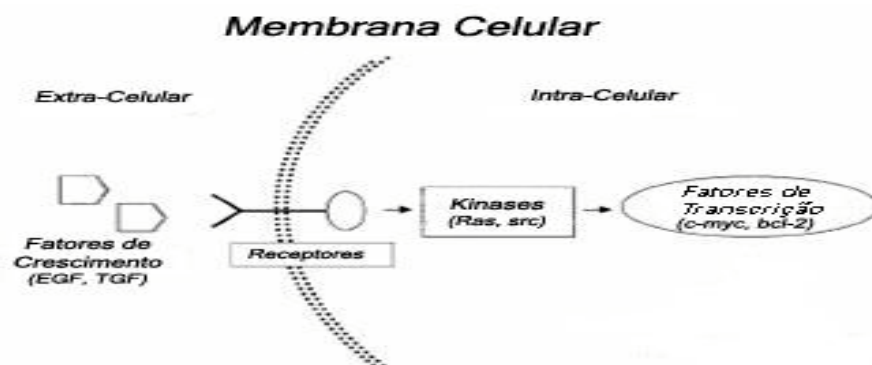


Figura 5. Transdução do sinal da membrana celular até o núcleo. Fatores de crescimento ativados progridem o sinal através de receptores para o interior da célula. Proteínas citoplasmáticas carregam o sinal até genes transdutores nucleares, como o c-myc, com conseqüente estimulação de proteínas nucleares e ativação do ciclo celular. (Adaptado de Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. Ann Surg 2001; 233(3):322-337)

O gene c-myc é um proto-oncogene encontrado no braço longo do cromossomo 8, na posição 8q24, identificado primeiramente como um homólogo celular do oncogene retroviral v-myc. Pertence à família dos fatores de transcrição nuclear que são responsáveis pela codificação dos estímulos que chegam ao núcleo celular e pela ordenação da transcrição do DNA e do processo mitótico (68). Nas últimas duas décadas, muito se evoluiu a respeito do conhecimento da função do c-myc,

fundamentalmente sobre a proliferação celular. Envolvido neste processo está o ciclo da divisão celular, onde a célula primária cresce, tem seu DNA replicado e então se divide dando origem a outras duas células filha.

Na regulação do ciclo celular, o c-myc é necessário para a progressão das células primárias da fase G1 para a fase S. A indução da expressão do c-myc estimula células quiescentes a atravessarem a fase G1 e entrarem na fase S (69;70). Além de possuir papel chave na transição G0/G1 para S, a expressão contínua em baixos níveis do c-myc ao longo do ciclo celular sugere que este gene seja requerido também em outras fases (71).

Em geral, a expressão do c-myc correlaciona-se intimamente com o potencial de proliferação da célula. Em células quiescentes, a sua expressão é virtualmente não detectada. Sob estímulo, há um rápido e transitório aumento em sua expressão enquanto as células entram para a fase G1 do ciclo celular, seguido de um declínio gradual a níveis bastante baixos, mas ainda detectáveis, nas células em proliferação (72-74).

Após receber o estímulo dos sinais de transdução, o c-myc forma um heterodímero com outra proteína, o *Max*. O complexo *myc/max* liga-se então a seqüências específicas de DNA, presumivelmente próximo a genes essenciais para a proliferação celular. Desta localização estratégica, o c-myc ativa a transcrição do DNA através da estimulação de genes relacionados ao crescimento celular, coordenando assim o processo de proliferação celular (75).

Uma vez cessado o estímulo dos fatores de crescimento ou na presença de sinais que traduzem o estágio final do processo de diferenciação celular, a expressão do c-myc declina ainda mais até tornar-se novamente não-detectada nas células já diferenciadas que se encontram no término do ciclo celular (76-78).

2.5.2 Função do c-myc no desenvolvimento de neoplasia

Os proto-oncogenes, que promovem o crescimento normal e a diferenciação celular, podem sofrer alterações genéticas dando origem aos chamados oncogenes, ou genes causadores de câncer. Esta transformação decorre de dois principais tipos de alterações:

- Alterações na *estrutura* do gene, que resultam em síntese de um produto anormal do gene (oncoproteína) com função aberrante;
- Alterações na *regulação da expressão* do gene, que resultam na produção aumentada ou inapropriada de um proto-oncogene estruturalmente normal.

Lesões específicas no DNA do gene como translocação cromossomal, duplicação do locus ou mutação de ponto promovem estas alterações estruturais e regulatórias sobre o proto-oncogene c-myc, dando origem ao oncogene c-myc. Este gene alterado codificará então oncoproteínas que se assemelham aos produtos normais dos proto-oncogenes, à exceção de que essas são desprovidas de elementos regulatórios e suas produções não estão atreladas a fatores de crescimento ou outros fatores externos, influenciando, por conseguinte, o processo de proliferação celular.

A expressão alterada do gene c-myc exerce um papel importante no desenvolvimento de neoplasias humanas. Sua expressão encontra-se aumentada em inúmeros tumores: 80% dos cânceres de mama, 70% dos cânceres de cólon, 90% dos cânceres ginecológicos e em 50% dos carcinomas hepatocelulares (79). Além disso, uma grande variedade de tumores hematológicos apresenta uma expressão alterada do c-myc. Com base nestes dados, estima-se que 70.000 a 100.000 mortes devido ao câncer por ano estão associadas a alterações no gene c-myc ou na sua expressão (16;80).

Apesar das inúmeras pesquisas investigando a regulação e a função deste gene, e da definida associação existente entre o c-myc e o câncer, os caminhos

moleculares da atividade do oncogene e do proto-oncogene c-myc ainda permanecem ignorados. Ao longo das duas últimas décadas, estudos permitiram a descoberta de diversas atividades deste gene, incluindo a potencialização na progressão da célula no ciclo celular, a inibição da diferenciação celular, a indução da morte celular programada (apoptose) (81), e a instabilidade genômica (82-84).

Um modelo proposto é de que o c-myc promoveria a proliferação celular e a instabilidade genômica através da aceleração celular durante o ciclo celular, mais precisamente entre as fases G1 e S (85;86), abolindo a ação dos check-points, evitando a entrada das células na fase quiescente do ciclo celular (G0) e aumentando o metabolismo celular (60). Em condições normais, estas alterações levariam a apoptose. Mas em um contexto de transformação celular, onde outras mutações adicionais podem ativar sinais anti-apoptóticos, o c-myc pode levar a uma transformação neoplásica.

Estudos recentes indicam que o c-myc também contribui para o processo de carcinogênese ao alterar a expressão de outros genes, que estariam envolvidos na proliferação celular (87). Entretanto, a presença destes genes, ditos genes-alvo diretos por terem a sua funcionalidade alterada pela ação direta do c-myc, pode ser necessária, mas não suficiente, para os fenótipos oriundos da expressão do *c-Myc* (88). É possível que genes-alvo indiretos, cuja expressão é alterada como consequência de modificações na expressão dos genes-alvo diretos, podem fornecer o elo que falta entre a expressão alterada do c-myc e a transformação neoplásica.

As células do organismo regulam a multiplicação celular ao induzir as células a entrarem em um estágio de diferenciação pós-mitótico, através de diversos mecanismos ainda não completamente conhecidos (89). Especula-se que o efeito carcinogênico do c-myc também envolva a inibição da diferenciação terminal da célula ao evitar que esta saia do ciclo celular. Tal fato resultaria em uma grande população de

células precursoras indiferenciadas, aumentando assim a probabilidade de que um significativo número de células adquira outras mutações que possam culminar com o surgimento de uma célula neoplásica (90).

2.5.3 c-myc no Desenvolvimento do Adenocarcinoma Esofágico

Embora a expressão alterada do c-myc tenha sido demonstrada em várias neoplasias humanas, o papel do c-myc no EB e no ACE ainda é pouco conhecido. Abdelatif e colaboradores estudaram pacientes com EB utilizando a técnica de hibridização *in situ* e demonstraram que a expressão do RNA mensageiro do c-myc pode ser observada regularmente na displasia e no ACE, mas não na presença apenas de metaplasia intestinal especializada (91). Estudos mais recentes identificaram uma amplificação de seqüências genômicas a partir de 8q (sítio onde se localiza o gene c-myc) em até 80% dos ACE (92-94).

Gabbet e colaboradores, analisando peças cirúrgicas esofágicas de pacientes com ACE, não identificaram amplificação do c-myc em nenhum dos fragmentos com metaplasia intestinal especializada ou com displasia de baixo grau. Entretanto, vinte e cinco por cento das amostras contendo displasia de alto grau e em 44% dos fragmentos com ACE apresentaram uma expressão alterada do c-myc (82). Tselepis e colaboradores demonstraram através de estudo imunohistoquímico que a proteína codificada pelo gene c-myc estava aumentada em 50% nos casos de EB e em 90% nos pacientes com ACE. A análise imunohistoquímica revelou uma localização nuclear celular discreta do c-myc em amostras de EB, que se tornaram cada vez mais difusas com a progressão para displasia de baixo grau, de alto grau e para ACE (95). O mesmo estudo realizou análises envolvendo cultura de células tratadas com conteúdo ácido e biliar e identificou indução na expressão do c-myc e promoção da proliferação celular quando essas células foram expostas ao conteúdo biliar por períodos curtos e intermitentes.

A técnica de imunohistoquímica é um dos métodos que permite detectar a presença de “antígenos” que podem ser produtos do gene c-myc, correlacionando desta forma a expressão imunohistoquímica do produto do gene c-myc com uma possível alteração genética do mesmo. A imunohistoquímica genogênica permite a avaliação do material estudado em associação com a sua caracterização morfológica, com adequada correlação entre positividade/intensidade e o tipo de estrutura ou alteração morfológica tecidual. Tal característica permite ao método o estabelecimento de uma correlação entre alterações moleculares e histológicas, que pode favorecer o diagnóstico final e até mesmo sugerir o prognóstico do material em estudo, no caso de análise de biópsias de EB.

O acompanhamento endoscópico com análise histológica tem sido a avaliação padrão para acompanhamento do desenvolvimento de câncer no EB (tomando a displasia de alto grau como marcador para o subsequente desenvolvimento de adenocarcinoma). No entanto, existem problemas com este método de acompanhamento. Primeiro, a taxa de progressão de lesões displásicas de alto grau é bastante variável: 60% desenvolverão ACE em 5 anos (96), enquanto que 41% destes pacientes já possuem ao menos um foco de carcinoma *in situ* ao primeiro diagnóstico de displasia de alto grau (97). Além disso, questiona-se a respeito dos custos e benefícios do programa de acompanhamento endoscópico em todos os pacientes com EB, devido à pequena proporção de casos de EB que progridem para ACE. Tais questionamentos associados ainda à avaliação subjetiva dos patologistas e à variação existente intra e interobservador demonstram a necessidade de se buscar melhores marcadores diagnósticos para classificar pacientes de alto risco para o desenvolvimento do ACE.

Novos estudos são necessários para se demonstrar a expressão do c-myc ao longo da evolução do EB até o desenvolvimento do adenocarcinoma. A identificação de

uma relação existente do c-myc com a seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma pode oferecer um critério objetivo na discriminação de lesões de alto risco daquelas que possuem um risco significativamente mais baixo de desenvolver câncer.

3. JUSTIFICATIVA

O c-myc tem se mostrado como um promissor marcador prognóstico em cânceres de mama, pulmão, cólon e em linfomas. A partir desta observação e, considerando-se as limitações da análise histológica convencional da biópsia esofágica em determinar a evolução dos pacientes com EB para o adenocarcinoma, o presente estudo tem por objetivo avaliar o potencial do c-myc como marcador prognóstico através do método imunohistoquímico.

A identificação de uma expressão imunohistoquímica aumentada do proto-oncogene c-myc em tecidos esofágicos com EB, quando comparados a tecidos esofágicos normais, e de um aumento linear ao longo da seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma podem caracterizar a importância do c-myc como marcador prognóstico nestes pacientes.

4. OBJETIVOS

4.1 Avaliar a expressão imunohistoquímica do gene c-myc em amostras teciduais esofágicas de pacientes com metaplasia intestinal, displasia e adenocarcinoma.

4.2 Avaliar a correlação dos níveis de expressão imunohistoquímica do c-myc entre os grupos de pacientes na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma.

5. MÉTODOS

5.1 População em estudo

Constituída de pacientes entre 16 e 90 anos que apresentavam DRGE complicada com EB ou adenocarcinoma de esôfago e da junção esofagogástrica, atendidos pelo Grupo de Cirurgia de Esôfago, Estômago e Intestino Delgado (GCEEID) e pela Unidade de Endoscopia Digestiva do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) entre agosto de 1998 e fevereiro de 2004. A seleção dos pacientes foi realizada mediante revisão de prontuário após análise inicial dos diagnósticos obtidos pelos laudos histopatológicos de cada paciente. As amostras teciduais foram obtidas de biópsia endoscópica e/ou peças cirúrgicas de esofagectomias.

Foram incluídos como controles pacientes submetidos à biópsia endoscópica do estômago devido à dispepsia que não fosse decorrente de DRGE, cujo achado histológico mostrou-se normal.

5.2 Cálculo Amostral

Levando-se em consideração dados da literatura (95), que apontaram uma positividade imunohistoquímica para a expressão gênica do proto-oncogene c-myc de 50% em pacientes com EB, e de 90% em pacientes com ACE, foram necessários 72 pacientes, divididos em três grupos de 24 pacientes, para se obter uma diferença estatisticamente significativa na expressão do c-myc entre estes grupos, com nível de confiança de 95% e poder estatístico de 90%.

5.3 Critérios de Inclusão

Diagnóstico de tecido gástrico normal à biópsia endoscópica em pacientes com dispepsia não relacionada à DRGE (Grupo controle).

Diagnóstico clínico de DRGE com achado endoscópico e histológico de Esôfago de Barrett sem displasia.

Diagnóstico clínico de DRGE com achado endoscópico e histológico de Esôfago de Barrett com displasia.

Diagnóstico histológico de adenocarcinoma de esôfago e de junção esofagogástrica.

5.4 Critérios de Exclusão

Presença de outra neoplasia maligna concomitante.

Achado de metaplasia intestinal do cárdia, à biópsia da junção escamocolunar, sem presença de epitélio colunar visível à endoscopia.

Blocos de parafina com material insuficiente.

Adenocarcinomas gástricos subcárdicos, segundo classificação de Siewert (Tumores tipo III).

5.5 Elegibilidade dos Pacientes

Depois de selecionadas as amostras teciduais, e após correlação do laudo histopatológico com os dados clínicos, os pacientes foram divididos em quatro grupos.

O Grupo 1 foi formado por pacientes submetidos à investigação endoscópica devido a sintomas dispépticos não relacionados a DRGE e que apresentaram mucosa gástrica normal (Grupo Controle). Os Grupos 2 e 3 referem-se a pacientes que tiveram indicação de investigação endoscópica devido a: 1) Sintomas sugestivos de DRGE sem confirmação diagnóstica; 2) Suspeita de DRGE complicada; 3) Acompanhamento

endoscópico durante tratamento clínico para DRGE sem resposta efetiva; e 4) Acompanhamento endoscópico de pacientes com EB. Estes grupos foram constituídos de pacientes com EB sem displasia (grupo 2) e com displasia (Grupo 3).

O Grupo 4 foi composto de pacientes com adenocarcinoma esofágico e de junção esofagogástrica, classificados de acordo com os achados descritos por Cameron (98) e Siewert (99), submetidos ou não ao tratamento cirúrgico.

5.6 Critérios diagnósticos de Esôfago de Barrett, displasia e adenocarcinoma

As amostras obtidas foram analisadas, separadamente, por dois patologistas com experiência na área digestiva. O diagnóstico de EB foi definido seguindo os critérios do Colégio Americano de Gastreenterologia (22).

Após confirmação histológica de metaplasia intestinal em epitélio esofágico, procurou-se identificar padrões histológicos que sugerissem displasia. Esta foi definida na presença de alterações nucleares (aumento nuclear e nucléolo proeminente), citológicas (depleção de mucina, basofilia citoplasmática e atipia nuclear) e arquiteturais (irregularidade das glândulas). Quando presente, a displasia pode ser classificada como:

- Displasia de Baixo Grau (DBG): alterações citológicas profundas nas criptas sugestivas de displasia, mas com algum grau de maturação em direção à superfície; mitoses eventuais, mas com crescimento ordenado; e alterações nucleares em menos de 50% das células.

- Displasia de Alto Grau (DAG): padrão de crescimento celular bastante anormal, com camadas celulares distorcidas ou irregulares; citoplasma de volume reduzido e de aparência anormal; mais de 50% dos núcleos alterados; e número reduzido de células caliciformes coradas pela técnica de alcian blue.

O diagnóstico de adenocarcinoma, por sua vez, foi obtido ao se identificar a presença de glândulas atípicas não mais confinadas a membrana basal, invadindo a lâmina própria e a camada submucosa.

5.7 Análise Imunohistoquímica

Os materiais obtidos dos blocos de parafina foram submetidos à técnica imunohistoquímica para a identificação do gene c-myc. Realizou-se a recuperação antigênica com forno de microondas após desparafinização, reidratação dos cortes histológicos, inativação da peroxidase endógena e bloqueio de reações inespecíficas. O anticorpo primário c-myc (DAKO, código M3570 - Mouse anti c-myc; clone 9E10), foi encubado por 6 horas, a 60°C, na diluição de 1:50. O complexo estreptavidina-biotina foi utilizado para localização do anticorpo primário, enquanto que o diaminobenzidina-tetracloruro foi empregado como cromógeno. A seguir, a contra-coloração foi realizada com Hematoxilina-Eosina (H&E). Como controle da técnica para o marcador c-myc foi utilizada uma biópsia de cólon normal com e sem anticorpo para o controle positivo e negativo, respectivamente.

A avaliação do c-myc foi realizada de acordo com o Sistema de Escore de Imunorreatividade (Imunoreactive Scoring System - IRS) utilizado por Remmele (100). Inicialmente, avaliou-se a intensidade da coloração, graduando-a entre 0 e 3, onde 0 é negativa, 1 é fraca, 2 é moderada e 3 é forte (Figura 6).

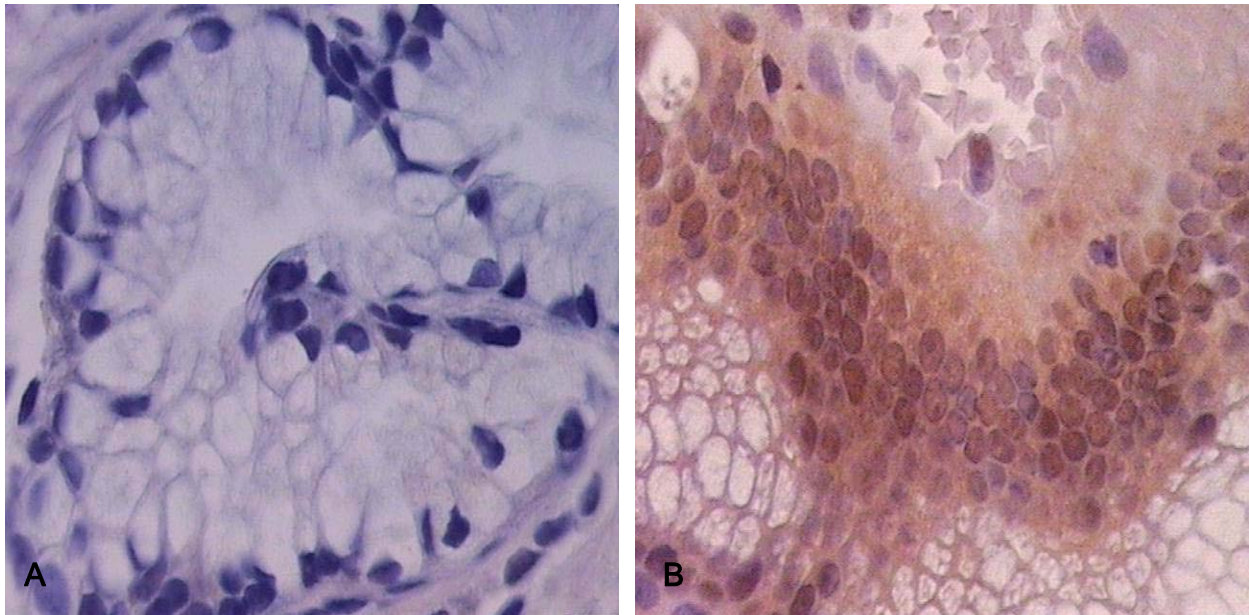


Figura 6. Escore de reatividade quanto à intensidade de coloração imunohistoquímica em campo visual de grande aumento (400x). A. Imunorreatividade ausente em paciente com EB. B. Imunorreatividade forte em paciente com EB.

Os resultados imunohistoquímicos também foram avaliados de acordo com a proporção de células positivas identificadas em grande aumento (400x), sendo graduadas de 0 a 4. Zero indicava ausência de coloração; 1 correspondia entre 1% a 10% de células positivas; 2 representava 11% a 50% de positividade; 3 referia-se a 51% a 80% e 4 quando mais de 80% das células estavam coradas (Figura 7).

O escore final da expressão do c-myc foi obtido pela multiplicação dos graus de intensidade e de proporção de positividade imunohistoquímica. Um mínimo de 10 campos visuais de grande aumento (400x) foi usado para cada avaliação IRS. Escores iguais ou menores a 2 pontos foram considerados imunopositivos fracos e não indicativos de expressão positiva do gene, enquanto que escores iguais ou maiores a 3 pontos foram considerados representativos de expressão positiva do c-myc (100).

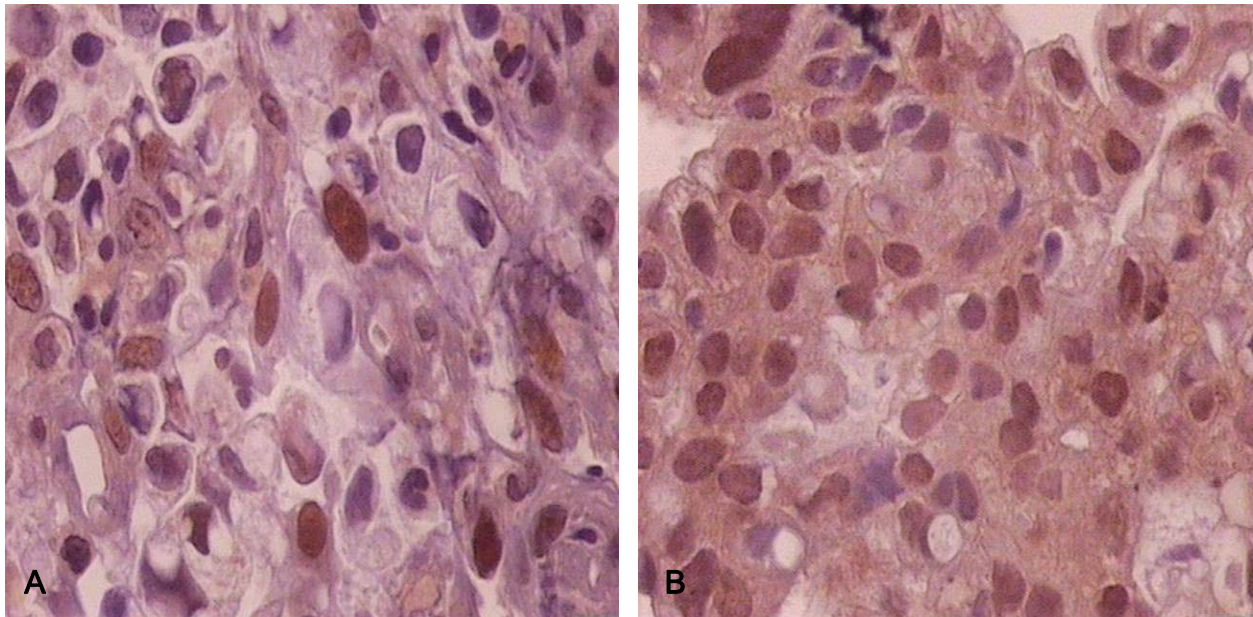


Figura 7. Escore de reatividade quanto a proporção de positividade imunohistoquímica celular em campo visual de grande aumento (400x). A. Imunorreatividade celular grau 2 (11% a 50% de células positivas) em paciente com adenocarcinoma esofágico. B. Imunorreatividade celular grau 4 (mais de 80% de células positivas) em paciente com adenocarcinoma esofágico.

A leitura das lâminas foi realizada por dois patologistas com experiência em patologia gastrointestinal, de forma independente e sem o conhecimento dos dados clínico-patológicos. Quando discordante, o escore final foi obtido por consenso entre os patologistas.

5.8 Considerações Éticas

Todo o material biológico estudado proveio de pacientes acompanhados pelo GCEEID e pelo Serviço de Endoscopia do HCPA. Os blocos de parafina com material de biópsias e peças de cirurgia foram obtidos no arquivo do Laboratório de Patologia do HCPA. As Resoluções Normativas 01/97 e 02/97 da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde foram respeitadas, uma vez que a obtenção deste material não ocasionou alterações na rotina de exame ou procedimento clínico. Além disso, o uso do Termo de Compromisso para Utilização de Dados garantiu a privacidade dos dados coletados e a manutenção anônima das amostras.

O presente estudo foi submetido à análise do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação, para a avaliação quanto às demais normas regulamentares e diretrizes éticas, tendo sido aprovado para execução sob protocolo nº 03-480.

5.9 Análise Estatística

Para a interpretação da variável idade foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student-Newman-Keuls. As demais variáveis categóricas foram analisadas através da aplicação do teste exato de Fischer e do teste qui-quadrado de Pearson. A análise comparativa da expressão do c-myc entre os grupos estudados foi realizada pelo teste qui-quadrado de Pearson associado ao teste de correção de Bonferroni. A associação linear da expressão do c-myc entre os grupos foi analisada pelo teste qui-quadrado de tendência linear, e a correlação linear desta variável foi calculada através do coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância utilizado foi $p < 0,05$ para medida de magnitude das diferenças. O programa estatístico utilizado foi o *Statistical Package for Social Science* (SPSS) versão 12.0.

6. RESULTADOS

Cento e setenta e seis pacientes foram considerados elegíveis após análise de dados clínicos e de laudos histológicos, dos quais 54 foram excluídos: 3 devido a presença de neoplasia maligna concomitante, 13 em virtude de diagnóstico não conclusivo durante revisão de lâminas, 9 pelo achado de metaplasia intestinal á biópsia da junção escamocolunar sem a visualização endoscópica de epitélio colunar esofágico, 19 por possuírem blocos de parafina com material insuficiente para confecção de lâminas, 10 por apresentarem diagnóstico de adenocarcinoma gástrico subcárdico (Tipo III), segundo classificação de Siewert (99). Assim, 122 pacientes foram finalmente incluídos no estudo e divididos em quatro grupos: 31 pacientes no grupo controle (grupo 1), 43 no grupo com EB sem displasia (grupo 2), 11 pacientes no grupo com EB com displasia (grupo 3), e 37 pacientes no grupo com ACE (grupo 4), conforme apresentado na Figura 8.

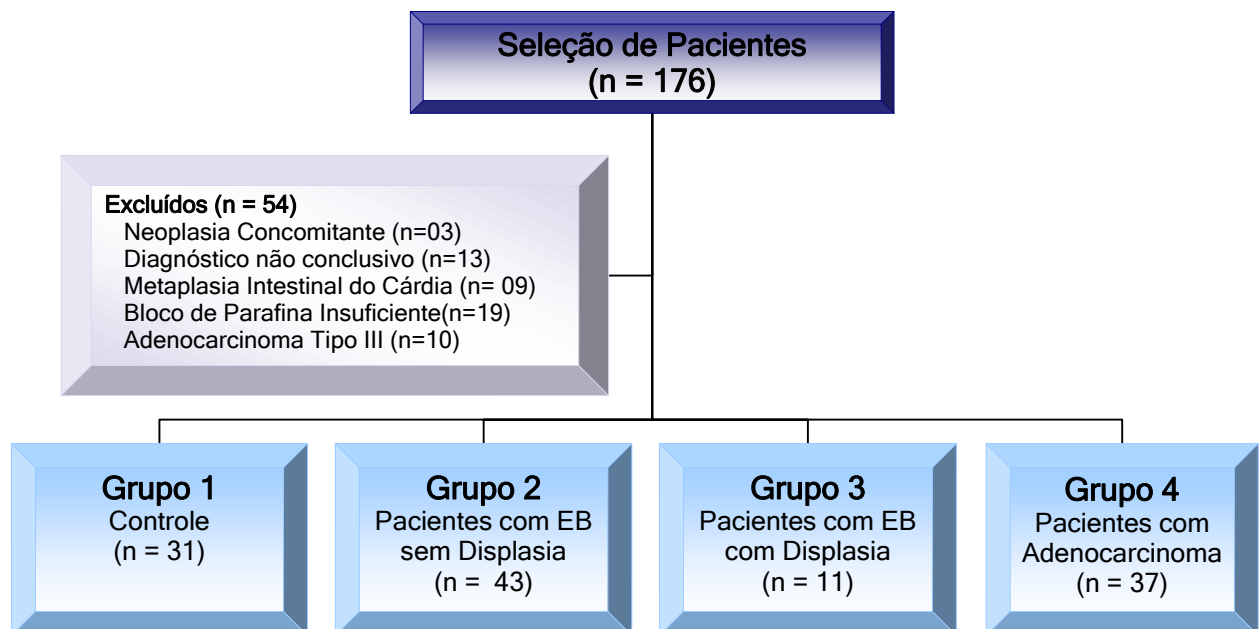


Figura 8. Fluxograma dos pacientes ao longo de sua seleção.

As características demográficas dos 122 pacientes analisados estão apresentadas na Tabela 1. A exceção de uma prevalência maior de pacientes do sexo masculino ($p=0,008$) com uma média de idade mais elevada ($p=0,02$) no grupo 4, não houve diferença significativa na comparação das demais médias ou na distribuição das variáveis entre os grupos.

Tabela 1. Características demográficas dos 122 pacientes em estudo.

	Grupo 1 n = 31	Grupo 2 n = 43	Grupo 3 n = 11	Grupo 4 n = 37	Total n = 122
Idade* (média±DP)	54,4±13,3	56,4±17,4	58,5± 15,7	63,7±11,4	58,1±15,2
Sexo[†] (%)					
Masculino	48,4	48,1	63,6	78,4	57,4
Feminino	51,6	51,9	36,4	21,6	42,6
Raça[‡] (%)					
Caucasiana	90,3	94,4	100	89,2	91,8
Negra/Mista	09,7	05,6	0	10,8	08,2

* $p=0,02$ na comparação da variável entre o Grupo 4 com os Grupos 1, 2 e 3

† $p=0,008$ na comparação da variável entre o Grupo 4 com os Grupos 1 e 2

Em relação a expressão do gene c-myc, apenas 3 (9,7%) dos 31 pacientes incluídos no estudo como grupo controle apresentaram positividade para o c-myc. Entre os 43 pacientes do grupo com metaplasia intestinal esofágica sem displasia, 16 (37,2%) mostraram-se positivos (Figura 9), e 5 (45,5%) dos 11 pacientes com metaplasia intestinal esofágica com displasia apresentaram positividade para o c-myc (Figura 10). Com relação ao grupo com adenocarcinoma, o c-myc foi positivo em 27 (73%) dos 37 pacientes (Figura 11). A análise comparativa da positividade do gene em estudo demonstrou uma diferença estatisticamente significativa dos grupos 2, 3 e 4 em relação ao grupo 1, e entre os grupos 2 e 4, como demonstra a figura 12.

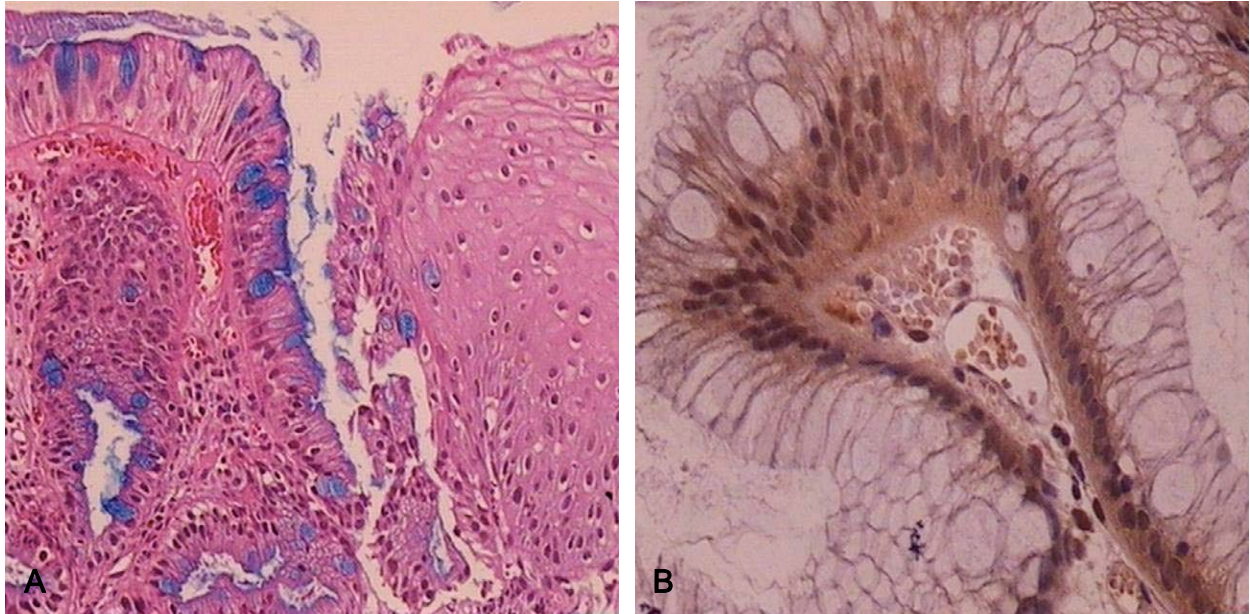


Figura 9. Aspecto histológico de EB sem displasia. A. Metaplasia intestinal em coloração com H&E e células caliciformes positivas para a coloração de Alcian Blue em aumento de 100x. B. Expressão imunohistoquímica do c-myc em aumento de 200x.

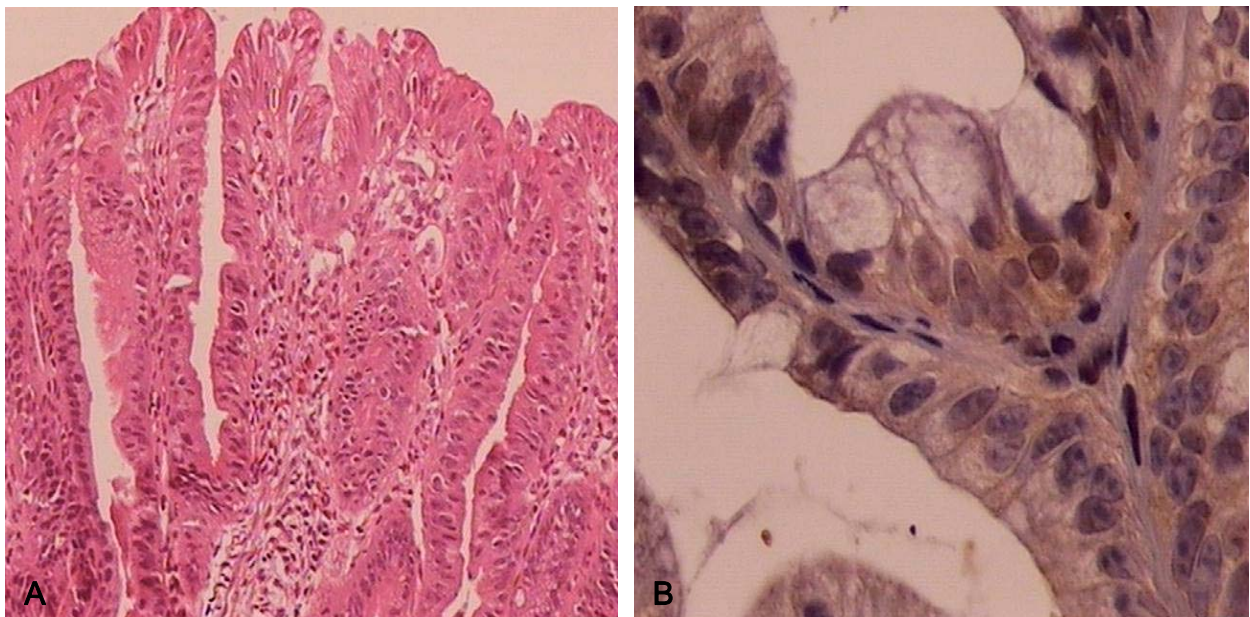


Figura 10. Aspecto histológico de EB com displasia. A. Ausência de maturação epitelial da cripta em direção a superfície em coloração com H&E em médio aumento (100x). B. Expressão imunohistoquímica do c-myc em grande aumento (400x) com observação de núcleos positivos em glândula com pseudoestratificação (setas).

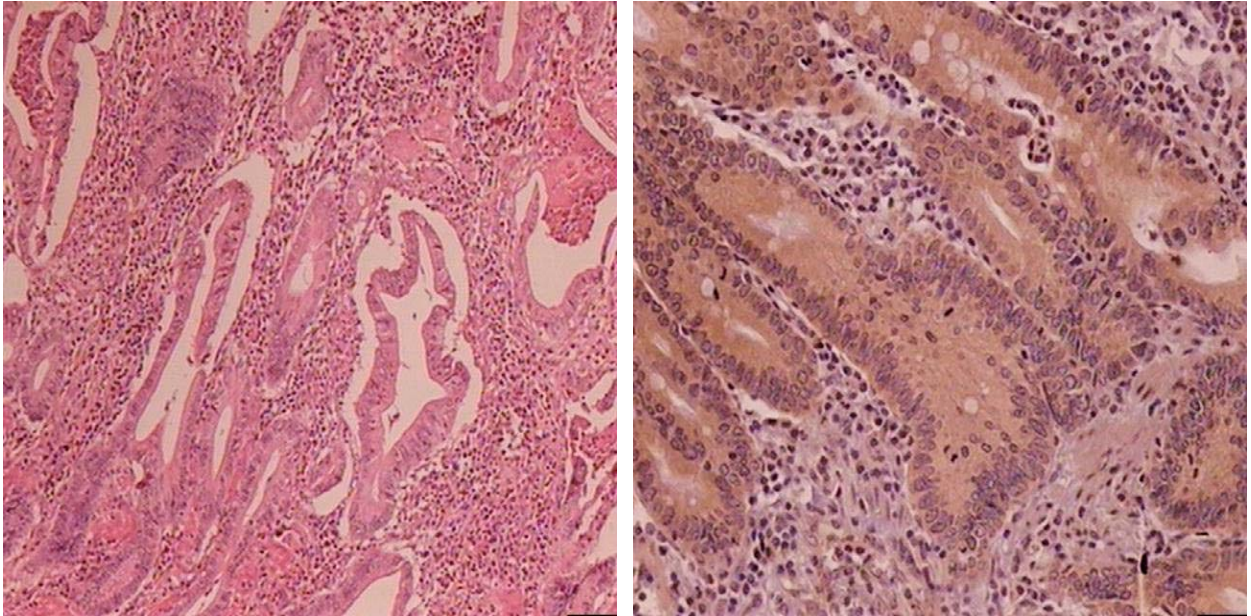


Figura 11. Aspecto histológico de adenocarcinoma. A. Adenocarcinoma esofágico em pequeno aumento (50x) em coloração com H&E. B. Expressão imunohistoquímica do c-myc em campo de médio aumento (200x).

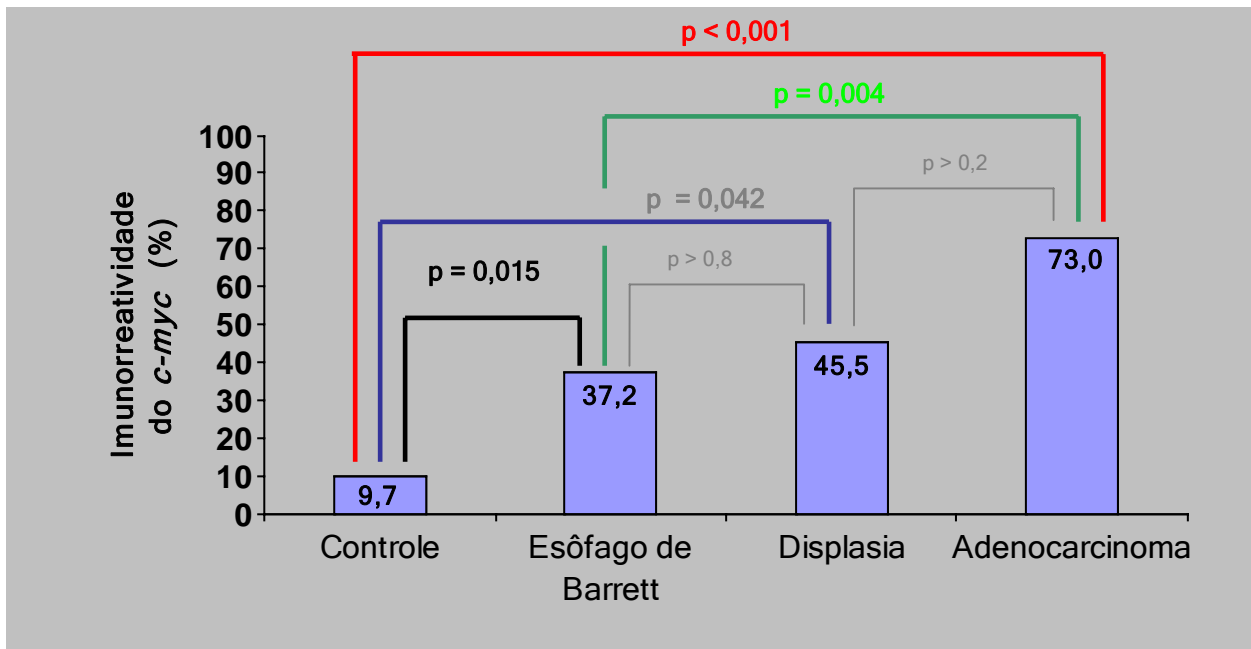


Figura 12. Correlação da positividade imunohistoquímica do c-myc entre os grupos estudados

Considerando a extensão do epitélio metaplásico entre os pacientes dos Grupos 2 e 3, estes foram subdivididos em pacientes com epitélio metaplásico menor que três centímetros, denominado EB curto, e pacientes com metaplasia intestinal igual ou maior que três centímetros, caracterizando o EB longo. Desta forma, dentre os 19 pacientes com EB curto, 7 (36,8%) mostraram-se positivos para o c-myc, enquanto que dos 35 pacientes com EB longo 14 (40%) foram positivos para o mesmo gene. Não houve diferença na positividade do c-myc entre pacientes com EB curto e EB longo ($p>0,5$).

Entretanto, analisando o comprimento do epitélio metaplásico esofágico, independente de sua categorização em curto ou longo, observou-se que 10 pacientes possuíam menos de 1 cm de epitélio metaplásico, 5 apresentavam 1 cm, 4 pacientes com 2 cm, 10 pacientes com metaplasia intestinal de uma extensão de 3 cm, e 3 pacientes com 4 cm de esôfago terminal recoberto por epitélio metaplásico. A expressão positiva do c-myc nestes cinco grupos foi de 30%, 40%, 50%, 70% e 100%, respectivamente. A análise dos dados neste subgrupo demonstrou uma associação linear entre o comprimento do epitélio metaplásico esofágico e a positividade da expressão do c-myc ($p=0,01$). Contudo, esta correlação não se confirmou ao se analisarem outros 22 pacientes com metaplasia intestinal de extensão maior que 4 cm em esôfago distal, onde a positividade para o c-myc foi de apenas 36% (Figura 13).

Entre os pacientes com neoplasia, 18 (48,6%) possuíam adenocarcinoma localizado acima da junção escamocolunar, e 19 (51,3%) foram classificados como tumores da junção esofagogástrica. A positividade do c-myc entre estes grupos foi observada em 14 (77,7%) e 13 (68,4%) pacientes, respectivamente, não sendo identificada correlação da expressão do c-myc quanto a localização tumoral ($p>0,3$).

Analisando o estadiamento dos pacientes com neoplasia através do sistema TNM, estes foram classificados como estágios I, II, III e IV. A expressão positiva do c-myc entre estes grupos foi de 75%, 75%, 90% e 50%, respectivamente, não sendo observada diferença estatística quanto a esta variável ($p>0,2$) (Figura 15).

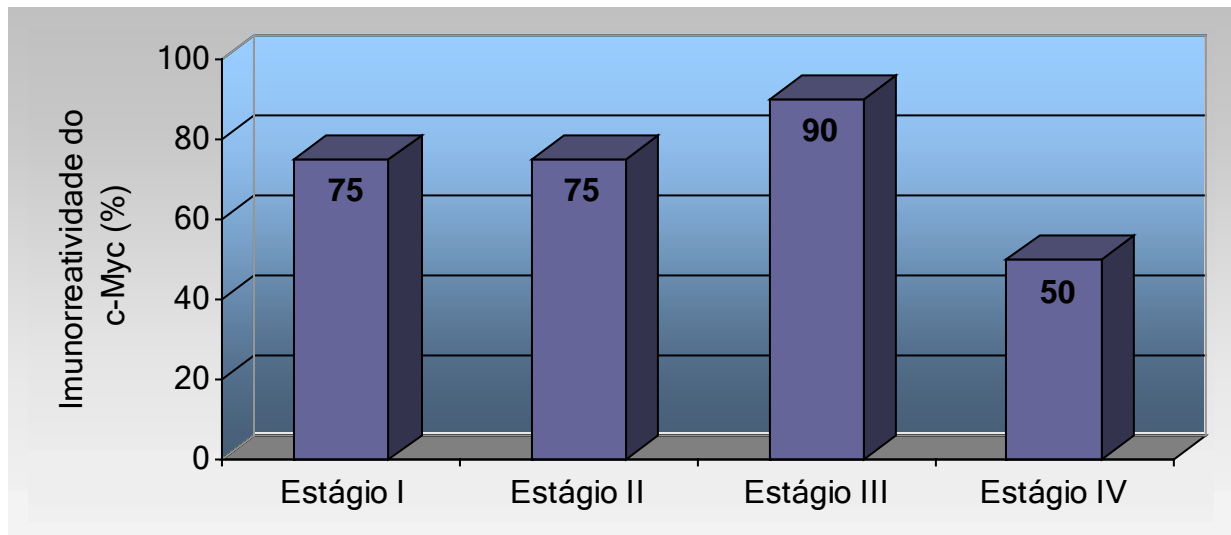


Figura 15. Imunorreatividade do c-myc X Estadiamento tumoral

Em relação ao grau de invasão tumoral (T), os pacientes foram reunidos em dois principais grupos: o primeiro com invasão tumoral entre T1 e T2 e o segundo entre T3 e T4. A positividade para o gene c-myc nestes grupos revelou ser de 70% e 92,3%, respectivamente. Quanto ao comprometimento linfonodal, 100% dos pacientes que não apresentaram metástases em linfonodos (N0) e 91,6% dos pacientes com envolvimento neoplásico linfonodal (N1) mostraram-se positivos para o c-myc. Assim, não houve diferença na expressão do c-myc quanto ao grau de invasão tumoral ($p>0,1$), nem com relação ao envolvimento linfonodal ($p>0,7$) entre os grupos estudados.

7. DISCUSSÃO

7.1 Aspectos Relacionados à Metodologia do Estudo

A técnica empregada para analisar o material em estudo foi a imunohistoquímica. Este método utiliza-se de anticorpos monoclonais para a detecção de produtos celulares ou de marcadores de superfície. Além de se mostrar útil na identificação e classificação de neoplasias, a imunohistoquímica pode ainda auxiliar na investigação de alterações moleculares tumorais.

Esta técnica vem sendo empregada já há alguns anos na investigação do papel do proto-oncogene c-myc na carcinogênese gastrintestinal (101-104). Tselepis utilizou a análise imunohistoquímica para demonstrar que a proteína que expressa o c-myc encontrava-se aumentada tanto em pacientes com EB como em pacientes com ACE (95). A imunohistoquímica genogênica, ao estabelecer uma correlação entre os padrões moleculares e histológicos, fornece índices de positividade/intensidade que se correlacionam com os graus das alterações celulares presentes.

Biópsias gástricas normais e negativas para *H. pylori*, obtidas de pacientes sem sintomas associados a DRGE, foram selecionadas para a composição do grupo controle. À semelhança de dois recentes estudos que pesquisaram a expressão do c-myc em epitélio esofagogástrico (82;95), optou-se por utilizar biópsias gástricas como controle por se tratar de epitélio colunar glandular, a exemplo do epitélio presente no EB e no ACE, que compartilha de características histológicas semelhantes às encontradas no epitélio metaplásico esofágico e no adenocarcinoma de esôfago.

Utilizando os critérios afirmados pelo Colégio Americano de Gastroenterologia (22), o diagnóstico de Esôfago de Barrett foi estabelecido através da identificação de epitélio colunar em esôfago confirmado pela análise histológica de material de biópsia endoscópica que identificou a presença de metaplasia intestinal especializada. O

achado histológico de metaplasia intestinal obtida de biópsia na junção escamocolunar, sem a visualização endoscópica de epitélio colunar em segmento esofágico, foi considerado como metaplasia intestinal do cárdia (MIC). Embora esta entidade diagnóstica possa representar o estágio inicial da transformação epitelial do que hoje se denomina EB (105), a história natural e o significado da MIC, ou metaplasia da junção esofagogástrica, ainda é desconhecido. A distinção entre estes dois diagnósticos é a identificação endoscópica de epitélio colunar no esôfago, o que acrescenta subjetividade decorrente da experiência do endoscopista no diagnóstico. Assim, os pacientes que apresentaram metaplasia intestinal à histologia, mas que não possuíam epitélio colunar em esôfago, foram excluídos do estudo.

Quanto às lesões displásicas, estas foram diagnosticadas, durante a análise do material em lâminas coradas com H&E, e classificadas como displasia ou lesão de baixo e alto grau de acordo com os padrões histológicos descritos anteriormente.

Conforme método utilizado por Cameron e colaboradores (98), que utilizava a distância entre o centro da lesão tumoral e a junção escamocolunar para classificar os adenocarcinomas de esôfago e de cárdia, e segundo a classificação proposta por Siewert (99), os pacientes com adenocarcinoma analisados no presente estudo foram classificados em três tipos. Tumores cujos centros se localizavam há mais de dois centímetros acima da junção escamocolunar foram classificados como ACE (Tipo I de Siewert). Tumores que se localizavam distantes em até dois centímetros da junção escamocolunar, cranial ou caudalmente, foram considerados adenocarcinoma da JEG (Tipo II de Siewert). Tumores localizados abaixo deste nível foram denominados carcinomas gástricos subcárdicos (Tipo III de Siewert). Foram incluídos no estudo os tumores tipo I e II. A exclusão dos tumores tipo III da análise justifica-se em virtude da sua origem possivelmente diferente do ACE e do adenocarcinoma da JEG (106).

Além de ser considerado precursor do ACE, acredita-se que o EB possa estar associado também ao desenvolvimento do adenocarcinoma de JEG, uma vez que estes dois tipos de tumores compartilhem dados epidemiológicos similares (53;98;106;107). Por sua vez, o papel da MIC no desenvolvimento de adenocarcinoma da JEG ainda é bastante questionado, não havendo nenhuma evidência que a sugira como uma possível lesão precursora (23;32;108;109).

7.2 Interpretação dos Resultados

Com relação às características demográficas dos pacientes deste estudo, observou-se uma predominância do sexo masculino no grupo 4 (78,4%) em relação aos demais grupos ($p=0,008$). Este achado vem ao encontro de dados epidemiológicos que afirmam que o ACE e o adenocarcinoma de JEG são mais prevalentes no sexo masculino, com uma razão de 7:1 em relação as mulheres (35;98;107;108). Pelo mesmo motivo a raça branca foi encontrada em 94,4% e em 89,2% dos pacientes com EB e adenocarcinoma, respectivamente.

Os pacientes dos Grupos 2 e 3 foram classificados quanto à extensão da metaplasia intestinal esofágica em EB curto, quando o epitélio metaplásico fosse menor que três centímetros, ou EB longo, quando igual ou maior que três centímetros. Pacientes com segmento curto de EB apresentam alterações manométricas e pHmétricas intermediárias entre pacientes com EB longo e pacientes normais (50;51). Além disso, o fato de existirem evidências indiretas de que o risco para a progressão tumoral está associado ao comprimento do epitélio metaplásico (110;111), poderia conferir ao EB curto um papel menos relevante na carcinogênese esofágica. Assim, objetivou-se com esta subdivisão observar a expressão do c-myc entre pacientes com EB curto e longo. No entanto, os resultados não demonstraram haver diferença entre os grupos.

De forma semelhante, correlacionou-se a expressão do c-myc ao comprimento do epitélio metaplásico, independente de sua categorização em curto e longo. Quando consideramos os pacientes com epitélio metaplásico com até quatro centímetros de extensão, observou-se uma correlação linear crescente entre o índice de positividade do c-myc e o comprimento da metaplasia ($p=0,01$). Entretanto, esta correlação não se manteve ao se incluir na análise pacientes com mais de quatro centímetros de EB.

Estudos demonstram que a incidência de displasia de baixo grau entre pacientes com EB varia entre 7% e 19% (10;40;52), enquanto que a displasia de alto grau (DBG) acomete 2% a 7%(40;112) dos pacientes com EB. Além disso, aproximadamente 30% dos pacientes com EB com diagnóstico de DAG já possuem naquele momento carcinoma invasor (113). No presente estudo, a incidência de displasia de baixo grau foi de 20,3%, e não se identificou nenhum caso de DAG.

Análises moleculares em tecido de metaplasia intestinal associado a displasia sugerem que um ou mais clones de células epiteliais possam adquirir alterações genéticas que as tornam predisponentes a malignização. Em estudo relatado por Jankowski e colaboradores, a presença de displasia de baixo grau foi acompanhada de perda do controle do processo de proliferação celular, expressão alterada de genes e de estimulação de fatores de crescimento (114). Seguindo o processo evolutivo do epitélio displásico, instabilidade de microsatélite, perda da adesão celular e aumento da aneuploidia foram alterações observadas por Reid em amostras teciduais contendo displasia de alto grau (115). Buscando identificar uma maior positividade na expressão do c-myc em pacientes com EB com displasia comparou-se o grupo de pacientes com EB sem displasia e com displasia. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos quanto à expressão do gene c-myc ($p=0,8$).

Correlações têm sido demonstradas entre a ativação do c-myc e parâmetros específicos de estágio avançado da doença neoplásica como invasividade e

comprometimento linfonodal (116). Entretanto, esta associação não pôde ser estabelecida no presente estudo em relação ao câncer de esôfago, uma vez que a positividade do c-myc quanto à invasão tumoral (T) e ao envolvimento de linfonodos (N) não evidenciou diferença estatística entre os grupos nos diferentes estágios.

Os primeiros achados sobre a ação do c-myc na tumorigênese esofágica envolveram o emprego da técnica de hibridização *in situ* para analisar 12 pacientes com EB. O estudo mostrou que a expressão aumentada do RNA mensageiro do c-myc pôde ser detectada em tecidos com displasia ou adenocarcinoma, mas não no epitélio metaplásico do esôfago (91).

De forma semelhante, estudos sobre rearranjos cromossômicos em pacientes com ACE demonstraram uma maior ampliação de seqüências genômicas na região 8q24, onde se localiza a seqüência do c-myc. Moskaluk encontrou uma amplificação do DNA nesta região em 8 dos 15 adenocarcinomas esofágico e de junção esofagogástrica (94), enquanto que Walch observou esta ampliação genética em apenas 2 dos 30 casos de ACE, e em 1 de 11 amostras de displasia de alto grau. Nenhuma alteração foi identificada em amostras contendo apenas metaplasia intestinal ou com displasia de baixo grau (94).

No presente estudo, procurou-se analisar a expressão do gene c-myc ao longo da seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma em pacientes com EB e ACE. De acordo com dados obtidos em extensa pesquisa literária, este é o segundo estudo a analisar a expressão do c-myc tanto em ACE como no epitélio metaplásico de pacientes com EB. A positividade do c-myc encontrada neste estudo de 38,8% nos pacientes com EB e de 73% entre aqueles com adenocarcinoma corroboram com os resultados obtidos por Tselepis e colaboradores que identificaram uma expressão alterada do c-myc em 50% dos pacientes com EB e em 90% das amostras de ACE estudadas (95). Realizando dissecções microscópicas de peças cirúrgicas de pacientes

com ACE submetidos a esofagectomia, Gabbet e colaboradores observaram amplificação do c-myc em 25% das amostras contendo displasia de alto grau e em 44% dos fragmentos com ACE (82).

A análise imunohistoquímica da expressão celular do c-myc identificou uma positividade da expressão do gene nos grupos controle, com EB sem displasia, EB com displasia e no grupo com adenocarcinoma de 9,7%, 37,2%, 45,5% e 73%, respectivamente. Tais resultados demonstram haver uma correlação linear da positividade do c-myc ao longo de uma cadeia que envolve pacientes sem alteração epitelial, pacientes portadores de epitélio metaplasia, displasia e pacientes com câncer. Este resultado é ainda mais fortalecido pelo número expressivo da amostra estudada e pelo alto índice de significância estatística demonstrado pelo teste qui-quadrado de tendência linear ($p < 0.001$).

A expressão alterada do c-myc ocorre em uma ampla variedade de tumores humanos. A sua freqüente associação com um prognóstico reservado destas neoplasias indica um papel importante deste oncogene na progressão tumoral. O elevado índice de positividade na expressão do c-myc encontrado nas amostras com adenocarcinoma (73%) neste estudo sugere que a expressão alterada deste gene seja um evento, entre os vários existentes, que atua de forma determinante no desenvolvimento do câncer esofágico.

Por outro lado, o alto índice de positividade identificado neste estudo entre os pacientes com EB (38,8%), e o risco relativamente baixo de progressão desta lesão precursora para o ACE (0,5% a 2%) sugere que, embora necessário para o desenvolvimento desta neoplasia, o oncogene c-myc por si só seria insuficiente para a progressão tumoral. Possivelmente, outros fatores reguladores do processo de proliferação celular e de apoptose, como o p53 e o bcl-2, atuariam sobre estas células molecularmente alteradas, impedindo a sua transformação neoplásica.

Este estudo faz parte de uma linha de pesquisa que investiga a progressão tumoral do EB até o ACE. Vários outros marcadores estão sendo analisados simultaneamente procurando desvendar os mecanismos carcinogênicos da seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma.

Os resultados do presente trabalho apontam para um importante papel do c-myc na progressão do EB para o adenocarcinoma, e certamente impulsionarão a continuidade deste estudo visando corroborar com estes achados.

8. CONCLUSÕES

8.1 A prevalência da expressão imunohistoquímica do gene c-myc em pacientes sem alteração histológica foi de 9,7%, em pacientes com EB sem displasia foi de 37,2%, em pacientes com EB com displasia foi de 45,5% e em pacientes com adenocarcinoma esofágico foi de 73%.

8.2 Houve uma correlação linear de positividade crescente na expressão imunohistoquímica do gene c-myc ao longo da seqüência que envolveu pacientes sem alteração histológica, pacientes com metaplasia intestinal esofágica, pacientes com displasia de baixo grau e em pacientes com adenocarcinoma.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

9.1 A continuidade deste estudo, através de análises moleculares poderá possibilitar uma melhor compreensão das alterações celulares presentes na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma.

9.2 O crescimento linear da expressão deste marcador, à medida que a doença evolui, abre a perspectiva de se realizarem estudos de coorte analisando o potencial prognóstico do c-myc durante o seguimento de pacientes com EB.

REFERÊNCIAS

- (1) Spechler SJ. Barrett's esophagus. *Semin Oncol* 1994; 21(4):431-437.
- (2) Blot WJ. Esophageal cancer trends and risk factors. *Semin Oncol* 1994; 21(4):403-410.
- (3) Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF, Jr. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 1991; 265(10):1287-1289.
- (4) Blot WJ, Devesa SS, Fraumeni JF, Jr. Continuing climb in rates of esophageal adenocarcinoma: an update. *JAMA* 1993; 270(11):1320.
- (5) Daly JM, Karnell LH, Menck HR. National Cancer Data Base report on esophageal carcinoma. *Cancer* 1996; 78(8):1820-1828.
- (6) Bytzer P, Christensen PB, Damkier P, Vinding K, Seersholm N. Adenocarcinoma of the esophagus and Barrett's esophagus: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(1):86-91.
- (7) Hofstetter WL, Peters JH, DeMeester TR, Hagen JA, DeMeester SR, Crookes PF et al. Long-term outcome of antireflux surgery in patients with Barrett's esophagus. *Ann Surg* 2001; 234(4):532-538.
- (8) DeMeester SR, DeMeester TR. Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus: fifty years of controversy. *Ann Surg* 2000; 231(3):303-321.
- (9) 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(8):2037-2042.
- (10) Hameeteman W, Tytgat GN, Houthoff HJ, van den Tweel JG. Barrett's esophagus: development of dysplasia and adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1989; 96(5 Pt 1):1249-1256.
- (11) 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(8):2043-2053.
- (12) Reynolds JC, Waronker M, Pacquing MS, Yassin RR. Barrett's esophagus. Reducing the risk of progression to adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28(4):917-945.
- (13) Stein HJ, Kauer WK, Feussner H, Siewert JR. Bile reflux in benign and malignant Barrett's esophagus: effect of medical acid suppression and nissen fundoplication. *J Gastrointest Surg* 1998; 2(4):333-341.
- (14) Morris CD, Armstrong GR, Bigley G, Green H, Attwood SE. Cyclooxygenase-2 expression in the Barrett's metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(4):990-996.

- (15) Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 1999; 18(19):3004-3016.
- (16) Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999; 19(1):1-11.
- (17) Barrett NR. Chronic peptic ulcer of the oesophagus and 'oesophagitis'. *Br J Surg* 1950; 38(150):175-182.
- (18) Barrett NR. The lower esophagus lined by columnar epithelium. *Surgery* 1957; 41(6):881-894.
- (19) Bremner CG, Lynch VP, Ellis FH, Jr. Barrett's esophagus: congenital or acquired? An experimental study of esophageal mucosal regeneration in the dog. *Surgery* 1970; 68(1):209-216.
- (20) Hayward J. The lower end of the oesophagus. *Thorax* 1961; 16:36-41.
- (21) Naef AP, Savary M, Ozzello L. Columnar-lined lower esophagus: an acquired lesion with malignant predisposition. Report on 140 cases of Barrett's esophagus with 12 adenocarcinomas. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1975; 70(5):826-835.
- (22) Sampliner RE. Practice guidelines on the diagnosis, surveillance, and therapy of Barrett's esophagus. The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(7):1028-1032.
- (23) Conio M, Lapertosa G, Bianchi S, Filiberti R. Barrett's esophagus: an update. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 46(2):187-206.
- (24) Neumann CS, Cooper BT. 24 hour ambulatory oesophageal pH monitoring in uncomplicated Barrett's oesophagus. *Gut* 1994; 35(10):1352-1355.
- (25) Singh P, Taylor RH, Colin-Jones DG. Esophageal motor dysfunction and acid exposure in reflux esophagitis are more severe if Barrett's metaplasia is present. *Am J Gastroenterol* 1994; 89(3):349-356.
- (26) Clark GW, Ireland AP, DeMeester TR. Dysplasia in Barrett's esophagus: diagnosis, surveillance and treatment. *Dig Dis* 1996; 14(4):213-227.
- (27) Oberg S, Ritter MP, Crookes PF, Fein M, Mason RJ, Gadensytatter M et al. Gastroesophageal reflux disease and mucosal injury with emphasis on short-segment Barrett's esophagus and duodenogastroesophageal reflux. *J Gastrointest Surg* 1998; 2(6):547-553.
- (28) Champion G, Richter JE, Vaezi MF, Singh S, Alexander R. Duodenogastroesophageal reflux: relationship to pH and importance in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1994; 107(3):747-754.
- (29) Vaezi MF, Richter JE. Role of acid and duodenogastroesophageal reflux in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 1996; 111(5):1192-1199.

- (30) Kauer WK, Peters JH, DeMeester TR, Ireland AP, Bremner CG, Hagen JA. Mixed reflux of gastric and duodenal juices is more harmful to the esophagus than gastric juice alone. The need for surgical therapy re-emphasized. *Ann Surg* 1995; 222(4):525-531.
- (31) Fitzgerald RC, Omary MB, Triadafilopoulos G. Dynamic effects of acid on Barrett's esophagus. An ex vivo proliferation and differentiation model. *J Clin Invest* 1996; 98(9):2120-2128.
- (32) Falk GW. Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1994; 4(4):773-789.
- (33) Phillips RW, Wong RK. Barrett's esophagus. Natural history, incidence, etiology, and complications. *Gastroenterol Clin North Am* 1991; 20(4):791-816.
- (34) Lord RV, Gurski RR. Surveillance and surgery for Barrett's esophagus: more results from Sweden. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(8):2136-2137.
- (35) Cameron AJ. Epidemiology of columnar-lined esophagus and adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 1997; 26(3):487-494.
- (36) Cameron AJ, Zinsmeister AR, Ballard DJ, Carney JA. Prevalence of columnar-lined (Barrett's) esophagus. Comparison of population-based clinical and autopsy findings. *Gastroenterology* 1990; 99(4):918-922.
- (37) Conio M, Cameron AJ, Romero Y, Branch CD, Schleck CD, Burgart LJ et al. Secular trends in the epidemiology and outcome of Barrett's oesophagus in Olmsted County, Minnesota. *Gut* 2001; 48(3):304-309.
- (38) Gerson LB, Shetler K, Triadafilopoulos G. Prevalence of Barrett's esophagus in asymptomatic individuals. *Gastroenterology* 2002; 123(2):461-467.
- (39) Prach AT, MacDonald TA, Hopwood DA, Johnston DA. Increasing incidence of Barrett's oesophagus: education, enthusiasm, or epidemiology? *Lancet* 1997; 350(9082):933.
- (40) Conio M, Bianchi S, Lapertosa G, Ferraris R, Sablich R, Marchi S et al. Long-term endoscopic surveillance of patients with Barrett's esophagus. Incidence of dysplasia and adenocarcinoma: a prospective study. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(9):1931-1939.
- (41) Romero Y, Cameron AJ, Schaid DJ, McDonnell SK, Burgart LJ, Hardtke CL et al. Barrett's esophagus: prevalence in symptomatic relatives. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(5):1127-1132.
- (42) Oberg S, DeMeester TR, Peters JH, Hagen JA, Nigro JJ, DeMeester SR et al. The extent of Barrett's esophagus depends on the status of the lower esophageal sphincter and the degree of esophageal acid exposure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117(3):572-580.
- (43) Cameron AJ. Barrett's esophagus: prevalence and size of hiatal hernia. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(8):2054-2059.

- (44) Mann NS, Tsai MF, Nair PK. Barrett's esophagus in patients with symptomatic reflux esophagitis. *Am J Gastroenterol* 1989; 84(12):1494-1496.
- (45) Spechler SJ. Endoscopic surveillance for patients with Barrett esophagus: does the cancer risk justify the practice? *Ann Intern Med* 1987; 106(6):902-904.
- (46) Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, Triadafilopoulos G, Geboes K, Casson AG et al. Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Pathol* 1999; 154(4):965-973.
- (47) Navaratnam RM, Winslet MC. Barrett's oesophagus. *Postgrad Med J* 1998; 74(877):653-657.
- (48) Tselepis C, Perry I, Jankowski J. Barrett's esophagus: dysregulation of cell cycling and intercellular adhesion in the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. *Digestion* 2000; 61(1):1-5.
- (49) Cameron AJ, Lomboy CT. Barrett's esophagus: age, prevalence, and extent of columnar epithelium. *Gastroenterology* 1992; 103(4):1241-1245.
- (50) Loughney T, Maydonovitch CL, Wong RK. Esophageal manometry and ambulatory 24-hour pH monitoring in patients with short and long segment Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(6):916-919.
- (51) Fass R, Hell RW, Garewal HS, Martinez P, Pulliam G, Wendel C et al. Correlation of oesophageal acid exposure with Barrett's oesophagus length. *Gut* 2001; 48(3):310-313.
- (52) Gurski RR, Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR, Bremner CG, Chandrasoma PT et al. Barrett's esophagus can and does regress after antireflux surgery: a study of prevalence and predictive features. *J Am Coll Surg* 2003; 196(5):706-712.
- (53) Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998; 83(10):2049-2053.
- (54) Armstrong RW, Borman B. Trends in incidence rates of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in New Zealand, 1978-1992. *Int J Epidemiol* 1996; 25(5):941-947.
- (55) Hansson LE, Sparen P, Nyren O. Increasing incidence of both major histological types of esophageal carcinomas among men in Sweden. *Int J Cancer* 1993; 54(3):402-407.
- (56) Hansen S, Wiig JN, Giercksky KE, Tretli S. Esophageal and gastric carcinoma in Norway 1958-1992: incidence time trend variability according to morphological subtypes and organ subsites. *Int J Cancer* 1997; 71(3):340-344.
- (57) Dolan K, Sutton R, Walker SJ, Morris AI, Campbell F, Williams EM. New classification of oesophageal and gastric carcinomas derived from changing patterns in epidemiology. *Br J Cancer* 1999; 80(5-6):834-842.

- (58) Lagergren J, Bergstrom R, Nyren O. Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Ann Intern Med* 1999; 130(11):883-890.
- (59) Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340(11):825-831.
- (60) Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001; 233(3):322-337.
- (61) Cameron AJ, Ott BJ, Payne WS. The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus. *N Engl J Med* 1985; 313(14):857-859.
- (62) Menke-Pluymers MB, Hop WC, Dees J, van Blankenstein M, Tilanus HW. Risk factors for the development of an adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett) esophagus. The Rotterdam Esophageal Tumor Study Group. *Cancer* 1993; 72(4):1155-1158.
- (63) Tytgat GN. Does endoscopic surveillance in esophageal columnar metaplasia (Barrett's esophagus) have any real value? *Endoscopy* 1995; 27(1):19-26.
- (64) Bani-Hani K, Sue-Ling H, Johnston D, Axon AT, Martin IG. Barrett's oesophagus: results from a 13-year surveillance programme. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12(6):649-654.
- (65) van der BA, Dees J, Hop WC, van Blankenstein M. Oesophageal cancer is an uncommon cause of death in patients with Barrett's oesophagus. *Gut* 1996; 39(1):5-8.
- (66) Corley DA, Levin TR, Habel LA, Weiss NS, Buffler PA. Surveillance and survival in Barrett's adenocarcinomas: a population-based study. *Gastroenterology* 2002; 122(3):633-640.
- (67) Beilstein M, Silberg D. Cellular and molecular mechanisms responsible for progression of Barrett's metaplasia to esophageal carcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31(2):461-79, ix.
- (68) Vennstrom B, Sheiness D, Zabielski J, Bishop JM. Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol* 1982; 42(3):773-779.
- (69) Eilers M, Picard D, Yamamoto KR, Bishop JM. Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature* 1989; 340(6228):66-68.
- (70) Heikkila R, Schwab G, Wickstrom E, Loke SL, Pluznik DH, Watt R et al. A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G0 to G1. *Nature* 1987; 328(6129):445-449.
- (71) Mateyak MK, Obaya AJ, Adachi S, Sedivy JM. Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ* 1997; 8(10):1039-1048.

- (72) Campisi J, Gray HE, Pardee AB, Dean M, Sonenshein GE. Cell-cycle control of c-myc but not c-ras expression is lost following chemical transformation. *Cell* 1984; 36(2):241-247.
- (73) Kelly K, Cochran BH, Stiles CD, Leder P. Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 1983; 35(3 Pt 2):603-610.
- (74) Moore JP, Hancock DC, Littlewood TD, Evan GI. A sensitive and quantitative enzyme-linked immunosorbence assay for the c-myc and N-myc oncoproteins. *Oncogene Res* 1987; 2(1):65-80.
- (75) Mao DY, Watson JD, Yan PS, Barsyte-Lovejoy D, Khosravi F, Wong WW et al. Analysis of Myc bound loci identified by CpG island arrays shows that Max is essential for Myc-dependent repression. *Curr Biol* 2003; 13(10):882-886.
- (76) Dean M, Levine RA, Campisi J. c-myc regulation during retinoic acid-induced differentiation of F9 cells is posttranscriptional and associated with growth arrest. *Mol Cell Biol* 1986; 6(2):518-524.
- (77) Dotto GP, Gilman MZ, Maruyama M, Weinberg RA. c-myc and c-fos expression in differentiating mouse primary keratinocytes. *EMBO J* 1986; 5(11):2853-2857.
- (78) Lemaitre JM, Buckle RS, Mechali M. c-Myc in the control of cell proliferation and embryonic development. *Adv Cancer Res* 1996; 70:95-144.
- (79) Barr LF, Campbell SE, Diette GB, Gabrielson EW, Kim S, Shim H et al. c-Myc suppresses the tumorigenicity of lung cancer cells and down-regulates vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* 2000; 60(1):143-149.
- (80) Dang CV. c-myc oncoprotein function. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1072(2-3):103-113.
- (81) Facchini LM, Penn LZ. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J* 1998; 12(9):633-651.
- (82) Sarbia M, Arjumand J, Wolter M, Reifenberger G, Heep H, Gabbert HE. Frequent c-myc amplification in high-grade dysplasia and adenocarcinoma in Barrett esophagus. *Am J Clin Pathol* 2001; 115(6):835-840.
- (83) Mai S, Fluri M, Siwarski D, Huppi K. Genomic instability in MycER-activated Rat1A-MycER cells. *Chromosome Res* 1996; 4(5):365-371.
- (84) Mai S, Hanley-Hyde J, Fluri M. c-Myc overexpression associated DHFR gene amplification in hamster, rat, mouse and human cell lines. *Oncogene* 1996; 12(2):277-288.
- (85) Karn J, Watson JV, Lowe AD, Green SM, Vedeckis W. Regulation of cell cycle duration by c-myc levels. *Oncogene* 1989; 4(6):773-787.
- (86) Freytag SO. Enforced expression of the c-myc oncogene inhibits cell differentiation by precluding entry into a distinct predifferentiation state in G0/G1. *Mol Cell Biol* 1988; 8(4):1614-1624.

- (87) Lee LA, Dolde C, Barrett J, Wu CS, Dang CV. A link between c-Myc-mediated transcriptional repression and neoplastic transformation. *J Clin Invest* 1996; 97(7):1687-1695.
- (88) Menssen A, Hermeking H. Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(9):6274-6279.
- (89) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57-70.
- (90) Nussenzweig MC, Schmidt EV, Shaw AC, Sinn E, Campos-Torres J, Mathey-Prevot B et al. A human immunoglobulin gene reduces the incidence of lymphomas in c-Myc-bearing transgenic mice. *Nature* 1988; 336(6198):446-450.
- (91) Abdelatif OM, Chandler FW, Mills LR, McGuire BS, Pantazis CG, Barrett JM. Differential expression of c-myc and H-ras oncogenes in Barrett's epithelium. A study using colorimetric in situ hybridization. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115(9):880-885.
- (92) Moskaluk CA, Hu J, Perlman EJ. Comparative genomic hybridization of esophageal and gastroesophageal adenocarcinomas shows consensus areas of DNA gain and loss. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 22(4):305-311.
- (93) van Dekken H, Geelen E, Dinjens WN, Wijnhoven BP, Tilanus HW, Tanke HJ et al. Comparative genomic hybridization of cancer of the gastroesophageal junction: deletion of 14Q31-32.1 discriminates between esophageal (Barrett's) and gastric cardia adenocarcinomas. *Cancer Res* 1999; 59(3):748-752.
- (94) Walch AK, Zitzelsberger HF, Bruch J, Keller G, Angermeier D, Aubele MM et al. Chromosomal imbalances in Barrett's adenocarcinoma and the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. *Am J Pathol* 2000; 156(2):555-566.
- (95) Tselepis C, Morris CD, Wakelin D, Hardy R, Perry I, Luong QT et al. Upregulation of the oncogene c-myc in Barrett's adenocarcinoma: induction of c-myc by acidified bile acid in vitro. *Gut* 2003; 52(2):174-180.
- (96) Montgomery E, Goldblum JR, Greenson JK, Haber MM, Lamps LW, Lauwers GY et al. Dysplasia as a predictive marker for invasive carcinoma in Barrett esophagus: a follow-up study based on 138 cases from a diagnostic variability study. *Hum Pathol* 2001; 32(4):379-388.
- (97) Edwards MJ, Gable DR, Lentsch AB, Richardson JD. The rationale for esophagectomy as the optimal therapy for Barrett's esophagus with high-grade dysplasia. *Ann Surg* 1996; 223(5):585-589.
- (98) Cameron AJ, Lomboy CT, Pera M, Carpenter HA. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction and Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1995; 109(5):1541-1546.
- (99) Siewert JR, Holscher AH, Becker K, Gossner W. [Cardia cancer: attempt at a therapeutically relevant classification]. *Chirurg* 1987; 58(1):25-32.

- (100) Remmele W, Schicketanz KH. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs. subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract* 1993; 189(8):862-866.
- (101) Yamamoto T, Yasui W, Ochiai A, Ito H, Abe K, Yanaihara N et al. Immunohistochemical detection of c-myc oncogene product in human gastric carcinomas: expression in tumor cells and stromal cells. *Jpn J Cancer Res* 1987; 78(11):1169-1174.
- (102) Inoue M, Shiramizu K. Immunohistochemical detection of p53 and c-myc proteins in canine mammary tumours. *J Comp Pathol* 1999; 120(2):169-175.
- (103) Agnantis NJ, Apostolikas N, Sficas C, Zolota V, Spandidos DA. Immunohistochemical detection of ras p21 and c-myc p62 in colonic adenomas and carcinomas. *Hepatogastroenterology* 1991; 38(3):239-242.
- (104) Tauchi K, Hori S, Itoh H, Osamura RY, Tokuda Y, Tajima T. Immunohistochemical studies on oncogene products (c-erbB-2, EGFR, c-myc) and estrogen receptor in benign and malignant breast lesions. With special reference to their prognostic significance in carcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1989; 416(1):65-73.
- (105) Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR. Barrett's esophagus. *J Gastrointest Surg* 2004; 8(1):1-17.
- (106) El Serag HB, Mason AC, Petersen N, Key CR. Epidemiological differences between adenocarcinoma of the oesophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia in the USA. *Gut* 2002; 50(3):368-372.
- (107) Pera M. Trends in incidence and prevalence of specialized intestinal metaplasia, barrett's esophagus, and adenocarcinoma of the gastroesophageal junction. *World J Surg* 2003; 27(9):999-1008.
- (108) Hirota WK, Loughney TM, Lazas DJ, Maydonovitch CL, Rholl V, Wong RK. Specialized intestinal metaplasia, dysplasia, and cancer of the esophagus and esophagogastric junction: prevalence and clinical data. *Gastroenterology* 1999; 116(2):277-285.
- (109) Sharma P, Weston AP, Morales T, Topalovski M, Mayo MS, Sampliner RE. Relative risk of dysplasia for patients with intestinal metaplasia in the distal oesophagus and in the gastric cardia. *Gut* 2000; 46(1):9-13.
- (110) Rudolph RE, Vaughan TL, Storer BE, Haggitt RC, Rabinovitch PS, Levine DS et al. Effect of segment length on risk for neoplastic progression in patients with Barrett esophagus. *Ann Intern Med* 2000; 132(8):612-620.
- (111) Spechler SJ. Clinical practice. Barrett's Esophagus. *N Engl J Med* 2002; 346(11):836-842.
- (112) Weston AP, Badr AS, Hassanein RS. Prospective multivariate analysis of clinical, endoscopic, and histological factors predictive of the development of

- Barrett's multifocal high-grade dysplasia or adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(12):3413-3419.
- (113) 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(1):40-50.
- (114) Jankowski J. Gene expression in Barrett's mucosa: acute and chronic adaptive responses in the oesophagus. *Gut* 1993; 34(12):1649-1650.
- (115) Reid BJ, Blount PL, Rubin CE, Levine DS, Haggitt RC, Rabinovitch PS. Flow-cytometric and histological progression to malignancy in Barrett's esophagus: prospective endoscopic surveillance of a cohort. *Gastroenterology* 1992; 102(4 Pt 1):1212-1219.
- (116) Garte SJ. The c-myc oncogene in tumor progression. *Crit Rev Oncog* 1993; 4(4):435-449.

ANEXOS

ANEXO A

Protocolo de Estudo da Expressão do c-Myc em pacientes com EB e ACE
Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA
Grupo de Cirurgia do Esôfago e Estômago e Intestino Delgado - GCEEID

Projeto GPPG Nº 03-480

Ficha Nº: ___

1. Dados Demográficos:

Nome: _____ Prontuário Nº: _____/

Data de Nascimento: ___/___/___

Sexo () 1. Masculino 2. Feminino Idade: __ anos

Cor () 1. Branco 2. Negro 3. Misto 4. Outros

2. Dados Endoscópicos:

2.1. Data da Endoscopia: ___/___/___.

2.2. Motivo de EDA:

- () Controle de H pylori
 () Sintoma dispéptico sem evidência de DRGE
 () Acompanhamento de DRGE
 () DRGE complicada clinicamente (disfagia, odinofagia)
 () Barrett em acompanhamento endoscópico
 () Suspeita de neoplasia
 () Estadiamento de Neoplasia esofágica
 () Outros: _____ .

2.3. Dados Macroscópicos:

- () Esôfago Normal
 () Estômago Normal
 () Esofagite; Classificação de Los Angeles: ____
 () Esofagite Complicada 0- Não Complicada; 1- Úlcera; 2- Estenose
 () Esôfago com Epitélio Colunar: comprimento __ cm.
 () Gastrite; Tipo: _____ .
 () Lesão Tumoral

2.4. Dados Anatômicos

- () Junção Escamocolunar: aos ___ cm da ADS;
 () Pinçamento Diafragmático: aos ___ cm da ADS;
 () Hérnia Hiatal _____ cm
 (pequena = 1 a 2 cm; moderada = 3 a 4 cm; grande = ou > 5 cm)

- () Lesão Neoplásica início: aos ___ cm da ADS
 término: aos ___ cm da ADS

- () Característica da Lesão 1. Vegetante; 2. Infiltrativa; 3. Ulcerada

2.5. *Laudo da EDA:* _____

3. Dados Histopatológicos:

3.1. *Local das Biópsias* (e quantidade correspondente) :

- () Esôfago Proximal () Fundo Gástrico
 () Esôfago Distal () Corpo Gástrico
 () Epitélio Metaplásico () Antro Gástrico
 () Junção Escamocolumar - JEC () Cárdia
 () Píloro

3.2. *Epitélio Metaplásico:*

- () Comprimento: ___ cm; () Displasia de Baixo Grau;
 () Metaplasia Intestinal Incompleta; () Displasia de Alto Grau;
 () Metaplasia Intestinal Completa; () Carcinoma

3.3. *Laudo da Biópsia:* _____.

3.4. *Diagnóstico Final:* _____.

(Proseguir com banco de dados apenas se em caso de neoplasia)

4. Dados do Estadiamento Clínico (cTMN):

T: ___ N: ___ M: ___ Estágio: ___

5. Análise Anatomopatológica da Peça Cirúrgica:

5.1. *Segmento Esofagogástrico ressecado:*

- () Esôfago Proximal () Esôfago Médio
 () Esôfago Distal () Estômago Proximal

5.2. *Localização Tumoral:*

- () Esôfago Proximal () Esôfago Médio
 () Esôfago Distal () JEC
 () Fundo Gástrico () Corpo Gástrico

5.3. *Outros achados anatomopatológicos:* _____.

5.4. *Laudo Anatomopatológico:* _____.

5.5. *Diagnóstico Final:* _____.

6. Dados do Estadiamento Patológico (pTNM):

T: ___ N: ___ M: ___ Estágio: ___

ANEXO B

Artigo científico em língua portuguesa

**PAPÉL DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO C-MYC NA
SEQÜÊNCIA METAPLASIA-DISPLASIA-ADENOCARCINOMA NO ESÔFAGO**

Marcelo KrueI Schmidt* (1), Luise Meurer (2), Bernardo Silveira Volkweis (1), Maria Isabel Edelweiss (2), Carlos Cauduro Schirmer (1), Richard Ricachenevsky Gurski (1).

Serviço de Cirurgia Geral do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (1)

Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (2)

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia

Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*Endereço para correspondência:

Dr. Marcelo KrueI Schmidt

Rua São Francisco da Califórnia, 222 Apto 705 - Higienópolis

CEP 90550-080 - Porto Alegre-RS

e-mail: mkschmidt@redemeta.com.br

telefone: 51 3342.5327

RESUMO

Introdução: O esôfago de Barrett (BE) desenvolve-se como consequência de uma agressão acentuada sobre a mucosa esofágica causada pelo refluxo gastresofágico crônico. É uma lesão pré-maligna e exerce papel importante no desenvolvimento do adenocarcinoma esofágico (ACE). Inúmeras alterações genéticas estão presentes ao longo da transformação tumoral de uma célula, sendo o c-myc um dos principais genes envolvidos na carcinogênese humana.

Objetivo: Determinar a expressão do c-myc em pacientes com EB e ACE no Grupo de Cirurgia do Esôfago, Estômago e Intestino Delgado (GCEEID) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) nos últimos seis anos, e estimar sua função na progressão da doença ao longo da seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma.

Metodologia: A expressão da proteína do c-myc foi determinada através da análise imunohistoquímica em 122 pacientes, divididos em quatro grupos: 31 pacientes controles com biópsia de tecido gástrico normal, 45 pacientes com metaplasia intestinal especializada sem displasia, 11 pacientes com EB associado à displasia e 37 pacientes com o adenocarcinoma esofágico. O material foi obtido de biópsias ou de ressecções cirúrgicas entre janeiro 1998 e fevereiro 2004. Dados demográficos e endoscópicos, e as características morfológicas e histopatológicas do tumor foram analisados. A expressão de C-myc foi avaliada usando o sistema de escore de imunoreatividade (Imunoreactive Scoring System - ISS).

Resultado: Expressão aumentada do c-myc foi encontrada em 9,7% das amostras de epitélio normal, em 37,2% dos pacientes com metaplasia de Barrett, em 45,5% das amostras de EB com displasia, e em 73% dos pacientes com ACE. Nenhuma associação foi identificada quando a expressão do c-myc foi comparada às características morfológicas e histológicas do tumor ou aos dados endoscópicos. Entretanto, uma associação linear da expressão do c-myc ao longo da seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma foi observada ($p < 0,001$).

Conclusão: O estudo demonstrou um aumento da expressão da proteína do c-myc ao longo da progressão da metaplasia no EB sugerindo que o c-myc atue de forma importante no desenvolvimento do ACE. A identificação de uma expressão aumentada da proteína do c-myc pode ajudar a identificar pacientes com risco aumentado para o desenvolvimento de adenocarcinoma, contribuindo para um melhor prognóstico no acompanhamento destes pacientes.

Palavras-Chave: Barrett, esôfago, adenocarcinoma, c-myc, imunohistoquímica.

1. INTRODUÇÃO

Até a década de 60, noventa por cento dos tumores esofágicos nos Estados Unidos eram do tipo carcinoma epidermóide (CEE) (1;2). Todavia, nas últimas duas décadas, a frequência de adenocarcinoma de esôfago (ACE) e da junção esofagogástrica (JEG) tem aumentado de tal forma que a sua ocorrência é hoje quase a mesma que a do CEE em países industrializados (3-6).

O aumento da incidência do ACE associado ao reconhecimento do Esôfago de Barrett (EB) como seu precursor pré-maligno tem estimulado pesquisas em busca de métodos de detecção precoce do ACE e sua relação com o EB. A natureza pré-maligna do EB atribui aos pacientes um risco anual de desenvolvimento de ACE de 0,5% a 2% (7-9), representando um risco 30 a 125 vezes maior que o da população geral (10-14). Embora o ACE acometa apenas 10% dos pacientes com EB, é fundamental que se consiga identificar precocemente aqueles pacientes com risco aumentado de desenvolver um carcinoma invasor, pois em alguns casos é possível reverter esta progressão (15).

A caracterização do mecanismo molecular que promove a progressão do EB pode levar à identificação de potenciais marcadores genéticos preditivos para o risco de desenvolvimento de câncer de esôfago. Anormalidades genéticas envolvendo uma variedade de oncogenes, genes supressores tumorais, moléculas de adesão celular e fatores de crescimento têm sido identificados. No entanto, o envolvimento funcional destas anormalidades no direcionamento da carcinogênese ainda está por ser definido.

O c-myc é um dos fatores envolvidos no processo de gênese tumoral, influenciando os processos de proliferação e crescimento celular e a apoptose. Sua expressão gênica alterada tem sido observada em tumores de estômago, cólon, mama, pulmão, além do linfoma de Burkitt (16;17). Entretanto, o papel do c-myc na carcinogênese do EB e do ACE ainda é pouco conhecido. A definição de marcadores celulares em pacientes com EB poderá alterar o prognóstico da evolução desta doença.

O presente estudo pretende avaliar a expressão do c-myc em pacientes com EB e ACE, discutindo a correlação desta expressão na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma.

2. PACIENTES E MÉTODOS

2.1 Pacientes

A população em estudo foi constituída de pacientes entre 16 e 90 anos que apresentavam DRGE complicada com EB ou adenocarcinoma de esôfago e da junção esofagogástrica, atendidos pelo GCEEID e pela Unidade de Endoscopia Digestiva do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) entre agosto de 1998 e fevereiro de 2004. Cento e vinte e dois pacientes foram selecionados e divididos em quatro grupos: 31 pacientes com dispepsia não decorrente de DRGE e com achado histológico normal (controle), 43 pacientes com diagnóstico de Esôfago de Barrett sem displasia (Grupo 2), 11 pacientes com Esôfago de Barrett com displasia (Grupo 3), e 37 pacientes com adenocarcinoma de esôfago e de junção esofagogástrica (Grupo 4).

Dados demográficos e endoscópicos (sexo, idade, raça, tamanho hiatal da hérnia e extensão do epitélio colunar esofágico), e as características morfológicas e histopatológicas tumorais (invasão tumoral, comprometimento linfonodal, e diferenciação histológica do tumor) foram analisados.

2.2 Análise Imunohistoquímica

Os materiais obtidos dos blocos de parafina foram então submetidos à técnica imunohistoquímica para a identificação do marcador do c-myc. Realizou-se a recuperação antigênica com forno de microondas após desparafinização, reidratação dos cortes histológicos, inativação da peroxidase endógena e bloqueio de reações inespecíficas. O anticorpo primário c-myc (DAKO, código M3570 - Mouse anti c-myc; clone 9E10), foi encubado por 6 horas, a 60°C, na diluição de 1:50. O complexo estreptavidina-biotina foi utilizado para localização do anticorpo primário, enquanto que o diaminobenzidina-tetrahidroclorofo foi empregado como cromógeno. A seguir, a contra-coloração foi realizada com Hematoxilina-Eosina (H&E). Como controle da técnica para o marcador c-myc foi utilizada uma biópsia de cólon normal com e sem anticorpo para o controle positivo e negativo, respectivamente.

A avaliação do c-myc foi realizada de acordo com o Sistema de Escore de Imunoreatividade (Imunoreactive Scoring System - IRS) utilizado por Remmele (18). Inicialmente, avaliou-se a intensidade da coloração, graduando-a de 0 a 3, onde 0 é negativa, 1 é fraca, 2 é moderada e 3 é forte.

Os resultados imunohistoquímicos também foram avaliados de acordo com a proporção de células positivas identificadas em grande aumento (400x), sendo novamente graduada de 0 a 4. Zero indicou ausência de coloração; 1 correspondia de 1 a 10% de células positivas; 2 representava de 11% a 50% de positividade; 3 de 51% a 80% e 4 quando mais de 80% das células estavam coradas.

O escore final da expressão do c-myc foi obtido da multiplicação destas duas classificações. Um mínimo de 10 campos visuais de grande aumento (400x) foi usado para cada avaliação IRS. Escores iguais ou menores a 2 pontos foram considerados imunopositivos fracos e não indicativos de expressão positiva do gene, enquanto que escores iguais ou maiores a 3 pontos foram considerados representativos de expressão positiva do c-myc (18).

A leitura das lâminas foi realizada por dois patologistas, de forma independente e sem o conhecimento dos dados clínico-patológicos.

2.3 Considerações Éticas

Todo o material biológico estudado provém de pacientes acompanhados pelo GCEEID e pelo Serviço de Endoscopia do HCPA. Os blocos de parafina com material de biópsias e peças de cirurgia foram obtidos no Laboratório de Patologia do HCPA. As Resoluções Normativas 01/97 e 02/97 da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde foram respeitadas, uma vez que a obtenção deste material não ocasionou alterações na rotina de exame ou procedimento clínico. Além disso, o uso do Termo de Compromisso para Utilização de Dados garantiu a privacidade dos dados coletados e a manutenção anônima das amostras.

O presente estudo foi submetido à análise do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação, para a avaliação quanto às demais normas regulamentares e diretrizes éticas, tendo sido aprovado para execução sob protocolo nº 03-480.

2.4 Análise Estatística

Para a interpretação da variável idade foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student-Newman-Keuls. As demais variáveis categóricas foram analisadas através da aplicação do teste de Fischer e do teste qui-quadrado de Pearson. A análise comparativa da expressão do c-myc entre os grupos estudados foi realizada pelo teste qui-quadrado de Pearson associado ao teste de correção de Bonferroni. A associação linear da expressão do c-myc entre os grupos foi analisada pelo teste qui-quadrado de tendência linear, e a correlação linear desta variável foi calculada através do coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância utilizado foi $p < 0,05$ para medida de magnitude das diferenças. O programa estatístico utilizado foi o SPSS (Statistical Package for Social Science) versão 12.0.

3. RESULTADOS

As características demográficas dos 122 pacientes analisados estão apresentadas na Tabela 1. A exceção de uma prevalência maior de pacientes do sexo masculino ($p=0,008$) com uma média de idade mais elevada ($p=0,02$) observada no grupo 4, não houve diferença significativa na comparação das demais médias ou na distribuição das variáveis entre os grupos.

Tabela 1. Características demográficas dos 122 pacientes em estudo.

	Grupo 1 n = 31	Grupo 2 n = 43	Grupo 3 n = 11	Grupo 4 n = 37	Total n = 122
Idade* (média±DP)	54,4±13,3	56,4±17,4	58,5± 15,7	63,7±11,4	58,1±15,2
Sexo[†] (%)					
Masculino	48,4	48,1	63,6	78,4	57,4
Feminino	51,6	51,9	36,4	21,6	42,6
Raça (%)					
Caucasiana	90,3	94,4	100	89,2	91,8
Negra/Mista	09,7	05,6	0	10,8	08,2

* $p=0,02$ na comparação da variável entre o Grupo 4 com os Grupos 1, 2 e 3

† $p=0,008$ na comparação da variável entre o Grupo 4 com os Grupos 1 e 2

A expressão imunohistoquímica do c-myc foi observada em apenas 3 (9,7%) das 31 amostras de tecido gástrico normal, 16 (37,2%) das 43 amostras de EB sem displasia, 5 (45,5%) das 11 amostras de EB com displasia e em 27 (73%) das 37 amostras de adenocarcinoma (Figura 1). A análise comparativa da positividade do gene em estudo demonstrou uma diferença estatisticamente significativa dos grupos 2, 3 e 4 em relação ao grupo 1, e entre os grupos 2 e 4, como demonstra a figura 2.

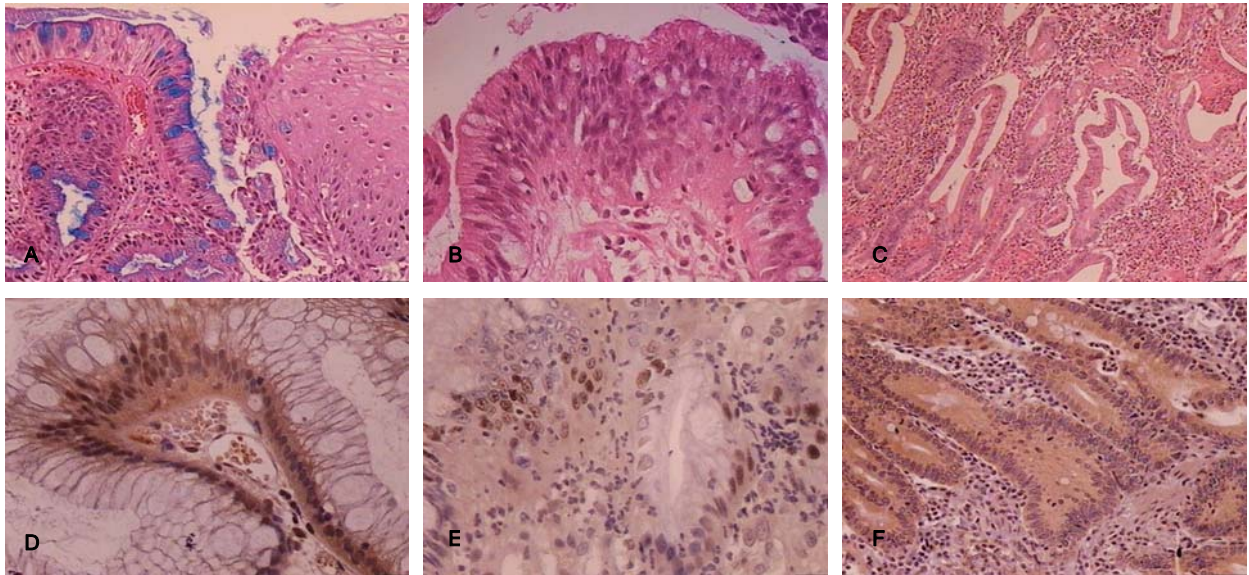


Figura 1. Aspectos histológicos na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma corados em H&E (A, B,C) e suas respectivas expressões imunohistoquímicas do c-myc (D,E,F). Corte histológico de EB sem displasia em 100x (A), em EB com displasia em 200x (B) e em adenocarcinoma em 50x (C). Imunorreatividade do c-myc em EB sem displasia em 200x (D), em EB com displasia em 200x (E) e em ACE em 100x (F).

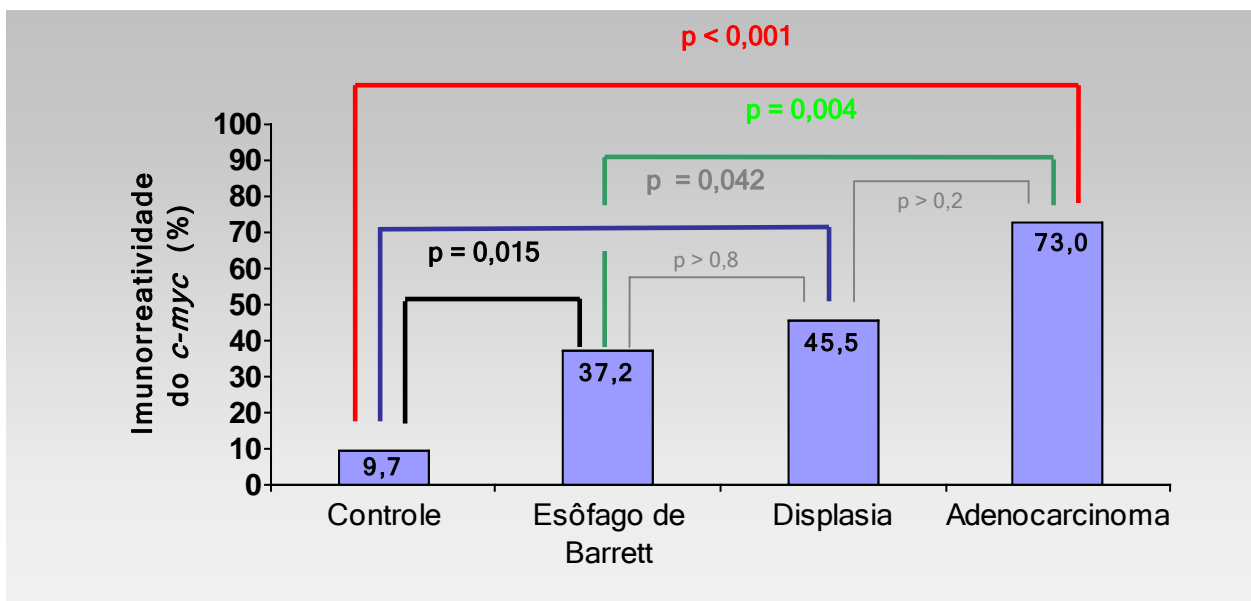


Figura 2. Correlação da positividade imunohistoquímica do *c-Myc* entre os grupos estudados

Analisando o comprimento do epitélio metaplásico esofágico, independente de sua categorização em curto ou longo, observou-se que 10 pacientes possuíam menos de 1 cm de epitélio metaplásico, 5 apresentavam 1 cm, 4 pacientes com 2 cm, 10 pacientes com metaplasia intestinal de uma extensão de 3 cm, e 3 pacientes com 4 cm de esôfago terminal recoberto por epitélio metaplásico. A expressão positiva do c-myc entre estes cinco grupos foi de 30%, 40%, 50%, 70% e 100%, respectivamente. A

análise dos dados neste subgrupo demonstrou uma associação linear entre o comprimento do epitélio metaplásico esofágico e a positividade da expressão do *c-Myc* ($p=0,01$). Contudo, esta correlação não se confirmou ao analisar outros 22 pacientes com metaplasia intestinal de extensão maior que 4 cm em esôfago distal, onde a positividade para o *c-Myc* foi de apenas 36%.

Quanto à diferenciação histológica, os tumores foram divididos em bem diferenciados ($n=4$), moderadamente diferenciados ($n=20$) e pouco diferenciados ($n=13$). A positividade para o *c-Myc* nestes grupos de 75%, 80% e 61,5%, respectivamente. Também não houve diferença na expressão do *c-myc* em relação à diferenciação tumoral ($p>0,3$)

Ao se analisar o estadiamento dos pacientes com neoplasia, através do sistema TNM, estes foram classificados como estágios I, II, III e IV. A expressão positiva do *c-Myc* entre estes grupos foi de 75%, 75%, 90% e 50%, respectivamente, não sendo observada diferença estatística quanto a esta variável ($p>0,2$).

4. DISCUSSÃO

Os primeiros achados sobre a ação do *c-Myc* na tumorigênese esofágica envolveram o emprego da técnica de hibridização para analisar 12 pacientes com EB. O estudo mostrou que a expressão aumentada do RNA mensageiro do *c-Myc* pôde ser detectada em tecidos com displasia ou adenocarcinoma, mas não no epitélio metaplásico do esôfago (19).

De forma semelhante, estudos sobre desajustes cromossômicos em pacientes com ACE demonstraram posteriormente uma maior ampliação de seqüências genômicas na região 8q24, onde se aloja a seqüência do *c-Myc*. Moskaluk encontrou uma amplificação do DNA nesta região em 8 dos 15 adenocarcinomas esofágico e de junção esofagogástrica (20), enquanto que Walch observou esta ampliação genética em apenas 2 dos 30 casos de ACE, e em 1 de 11 amostras de displasia de alto grau. Nenhuma alteração foi identificada em amostras contendo apenas metaplasia intestinal ou com displasia de baixo grau (20).

Em relação as características demográficas dos pacientes do presente estudo, observou-se uma predominância de pacientes do sexo masculino no grupo 3 (78,4%) em relação aos demais grupos ($p=0,008$). Este achado vem ao encontro de dados epidemiológicos que afirmam que o ACE e o adenocarcinoma de JEG são mais prevalentes no sexo masculino, com uma razão de 7:1 em relação as mulheres (21-24).

Pelo mesmo motivo a raça branca foi encontrada em 94,4% e em 89,2% dos pacientes com EB e adenocarcinoma, respectivamente.

Correlacionou-se a expressão do *c-Myc* ao comprimento do epitélio metaplásico, independente de sua categorização em Barrett curto, quando o epitélio metaplásico fosse menor que três centímetros, ou EB longo, quando igual ou maior que três centímetros. Esta análise foi realizada devido a evidências indiretas indicando de que o risco para a progressão tumoral está associado ao comprimento do epitélio metaplásico (25;26). Assim, quando consideramos os pacientes com epitélio metaplásico com até quatro centímetros de extensão, observou-se uma correlação crescente entre o índice de positividade do *c-Myc* e o comprimento da metaplasia ($p=0,01$). Entretanto, esta correlação não se manteve ao se incluir na análise pacientes com mais de quatro centímetros de EB.

Análises moleculares em tecido de metaplasia intestinal associado a displasia sugerem que um ou mais clones de células epiteliais podem sofrer alterações genéticas que as tornem predisponentes a malignização. Em estudo relatado por Jankowski e colaboradores, a presença de displasia de baixo grau era acompanhada de perda do controle do processo de proliferação celular, expressão alterada de genes e de estimulação de fatores de crescimento (27). Seguindo o processo evolutivo do epitélio displásico, instabilidade microsatélite, perda da adesão celular e aumento da aneuploidia foram alterações observadas por Reid em amostras teciduais contendo displasia de alto grau (28). No presente estudo buscou-se identificar uma maior positividade na expressão do *c-Myc* em pacientes com EB com displasia em relação ao grupo de pacientes com EB sem displasia. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos quanto a expressão do gene *c-Myc* ($p=0,8$).

Correlações têm sido demonstradas entre a ativação do *c-Myc* e parâmetros específicos de estágio avançado da doença neoplásica como invasividade e comprometimento linfonodal (29). Entretanto, esta associação não pôde ser estabelecida no presente estudo em relação ao câncer de esôfago, uma vez que a positividade do *c-Myc* quanto à invasão tumoral (T) e ao envolvimento de linfonodos (N) não evidenciou diferença estatística entre os grupos nos diferentes estágios.

No presente estudo, procurou-se analisar a expressão do gene *c-Myc* ao longo da seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma em pacientes com EB e ACE. De acordo com dados obtidos em pesquisa literária, este é o segundo estudo a demonstrar uma expressão aumentada do *c-Myc* tanto em ACE como no epitélio metaplásico de

pacientes com EB. A positividade do *c-Myc* encontrada neste estudo de 38,9% nos pacientes com EB e de 73% entre aqueles com adenocarcinoma corroboram com os resultados obtidos por Tselepis e colaboradores que identificaram uma expressão alterada do *c-Myc* em 50% dos pacientes com EB e em 90% das amostras de ACE estudadas (30).

A análise imunohistoquímica da expressão celular do *c-Myc* identificou uma positividade indicativa de aumento da expressão do gene nos grupos controle, com EB sem displasia, EB com displasia e no grupo com adenocarcinoma de 9,6%, 37,2%, 45,5% e 73%, respectivamente. Tais resultados demonstram haver uma correlação linear da positividade do *c-Myc* ao longo de uma cadeia que envolve pacientes sem alteração epitelial, pacientes portadores de epitélio metaplasia, displasia e pacientes com câncer. Este resultado é ainda mais fortalecido pelo número expressivo da amostra estudada e pelo alto índice de significância estatística alcançado ($p < 0.001$).

A expressão alterada do *c-Myc* ocorre em uma ampla variedade de tumores humanos. A sua freqüente associação com um prognóstico reservado destas neoplasias indica um papel importante deste oncogene na progressão tumoral. O elevado índice de positividade na expressão do *c-Myc* encontrado nas amostras com adenocarcinoma (73%) sugere que a expressão alterada deste gene seja um evento, entre os vários existentes, que atua de forma determinante no desenvolvimento do câncer esofágico.

Por outro lado, o alto índice de positividade identificado neste estudo entre os pacientes com EB (38,9%), e o risco relativamente baixo de progressão desta lesão precursora para o ACE (0,5% a 2%) sugere que, embora necessário para o desenvolvimento desta neoplasia, o oncogene *c-Myc* por si só seria insuficiente para a progressão tumoral. Possivelmente, outros fatores reguladores do processo de proliferação celular e de apoptose, como o próprio *p53* e o *bcl-2*, atuariam sobre estas células molecularmente alteradas, impedindo a sua transformação neoplásica.

A principal observação deste estudo foi a presença de uma correlação linear de positividade crescente na expressão imunohistoquímica do gene *c-myc* ao longo da seqüência que envolveu pacientes com metaplasia intestinal esofágica, pacientes com displasia de baixo grau e em pacientes com adenocarcinoma. Estes resultados apontam para um importante papel do *c-Myc* na progressão do EB na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma.

5. REFERÊNCIAS

- (1) Spechler SJ. Barrett's esophagus. *Semin Oncol* 1994; 21(4):431-437.
- (2) Blot WJ. Esophageal cancer trends and risk factors. *Semin Oncol* 1994; 21(4):403-410.
- (3) Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF, Jr. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 1991; 265(10):1287-1289.
- (4) Blot WJ, Devesa SS, Fraumeni JF, Jr. Continuing climb in rates of esophageal adenocarcinoma: an update. *JAMA* 1993; 270(11):1320.
- (5) Daly JM, Karnell LH, Menck HR. National Cancer Data Base report on esophageal carcinoma. *Cancer* 1996; 78(8):1820-1828.
- (6) Bytzer P, Christensen PB, Damkier P, Vinding K, Seersholm N. Adenocarcinoma of the esophagus and Barrett's esophagus: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(1):86-91.
- (7) Hofstetter WL, Peters JH, DeMeester TR, Hagen JA, DeMeester SR, Crookes PF et al. Long-term outcome of antireflux surgery in patients with Barrett's esophagus. *Ann Surg* 2001; 234(4):532-538.
- (8) DeMeester SR, DeMeester TR. Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus: fifty years of controversy. *Ann Surg* 2000; 231(3):303-321.
- (9) 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(8):2037-2042.
- (10) Hameeteman W, Tytgat GN, Houthoff HJ, van den Tweel JG. Barrett's esophagus: development of dysplasia and adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1989; 96(5 Pt 1):1249-1256.
- (11) 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(8):2043-2053.
- (12) Reynolds JC, Waronker M, Pacquing MS, Yassin RR. Barrett's esophagus. Reducing the risk of progression to adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28(4):917-945.
- (13) Stein HJ, Kauer WK, Feussner H, Siewert JR. Bile reflux in benign and malignant Barrett's esophagus: effect of medical acid suppression and nissen fundoplication. *J Gastrointest Surg* 1998; 2(4):333-341.
- (14) Morris CD, Armstrong GR, Bigley G, Green H, Attwood SE. Cyclooxygenase-2 expression in the Barrett's metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(4):990-996.
- (15) Gurski RR, Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR, Bremner CG, Chandrasoma PT et al. Barrett's esophagus can and does regress after antireflux surgery: a study of prevalence and predictive features. *J Am Coll Surg* 2003; 196(5):706-712.
- (16) Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 1999; 18(19):3004-3016.
- (17) Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999; 19(1):1-11.
- (18) Remmele W, Schicketanz KH. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs. subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract* 1993; 189(8):862-866.
- (19) Abdelatif OM, Chandler FW, Mills LR, McGuire BS, Pantazis CG, Barrett JM. Differential expression of c-myc and H-ras oncogenes in Barrett's epithelium. A study using colorimetric in situ hybridization. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115(9):880-885.
- (20) Walch AK, Zitzelsberger HF, Bruch J, Keller G, Angermeier D, Aubele MM et al. Chromosomal imbalances in Barrett's adenocarcinoma and the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. *Am J Pathol* 2000; 156(2):555-566.
- (21) Pera M. Trends in incidence and prevalence of specialized intestinal metaplasia, barrett's esophagus, and adenocarcinoma of the gastroesophageal junction. *World J Surg* 2003; 27(9):999-1008.
- (22) Hirota WK, Loughney TM, Lazas DJ, Maydonovitch CL, Rholl V, Wong RK. Specialized intestinal metaplasia, dysplasia, and cancer of the esophagus and esophagogastric junction: prevalence and clinical data. *Gastroenterology* 1999; 116(2):277-285.

- (23) Cameron AJ. Epidemiology of columnar-lined esophagus and adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 1997; 26(3):487-494.
- (24) Cameron AJ, Lomboy CT, Pera M, Carpenter HA. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction and Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1995; 109(5):1541-1546.
- (25) Rudolph RE, Vaughan TL, Storer BE, Haggitt RC, Rabinovitch PS, Levine DS et al. Effect of segment length on risk for neoplastic progression in patients with Barrett esophagus. *Ann Intern Med* 2000; 132(8):612-620.
- (26) Spechler SJ. Clinical practice. Barrett's Esophagus. *N Engl J Med* 2002; 346(11):836-842.
- (27) Jankowski J. Gene expression in Barrett's mucosa: acute and chronic adaptive responses in the oesophagus. *Gut* 1993; 34(12):1649-1650.
- (28) Reid BJ, Blount PL, Rubin CE, Levine DS, Haggitt RC, Rabinovitch PS. Flow-cytometric and histological progression to malignancy in Barrett's esophagus: prospective endoscopic surveillance of a cohort. *Gastroenterology* 1992; 102(4 Pt 1):1212-1219.
- (29) Garte SJ. The c-myc oncogene in tumor progression. *Crit Rev Oncog* 1993; 4(4):435-449.
- (30) Tselepis C, Morris CD, Wakelin D, Hardy R, Perry I, Luong QT et al. Upregulation of the oncogene c-myc in Barrett's adenocarcinoma: induction of c-myc by acidified bile acid in vitro. *Gut* 2003; 52(2):174-180.

ANEXO C

Artigo científico em língua inglesa

**C-MYC OVEREXPRESSION IS STRONGLY ASSOCIATED WITH
METAPLASIA-DISPLASIA-ADENOCARCINOMA SEQUENCE**

Marcelo Kruel Schmidt* (1), Luise Meurer (2), Bernardo Silveira Volkweis (1), Maria Isabel Edelweiss (2), Carlos Cauduro Schirmer (1), Richard Ricachenevsky Gurski (1).

General Surgery Department of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (1)

Pathology Department of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (2)

Graduate Course in Medicine: Surgery

School of Medicine - Federal University of Rio Grande do Sul

*Correspondence to:

Dr. Marcelo Kruel Schmidt

Rua São Francisco da Califórnia, 222 Apto 705 - Higienópolis

CEP 90550-080 - Porto Alegre, RS - Brazil

e-mail: mkschmidt@redemeta.com.br

phone: +55 51 3342-5327

ABSTRACT

Background & Aims: Barrett's esophagus (BE) develops as a result of a severe esophageal mucosa injury from gastroesophageal reflux. BE is a premalignant lesion and plays an important role in the development of esophageal adenocarcinoma. Several genetic alterations have been identified in the process that transforms a normal cell into a tumorous one. In the development of human tumors, the most important gene is the where the c-myc. The purpose of this study was to determine the expression of the c-myc in patients with BE and esophageal adenocarcinoma, and to evaluate the prevalence of such expression in relation to the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence.

Methods: The c-myc protein expression was determined by immunohistochemical analysis in four different groups. Thirty one patients with normal tissue, 43 patients with BE without dysplasia, 11 patients with dysplasia in BE and 37 patients with esophageal adenocarcinoma were studied. The material was obtained from esophageal biopsies or the dissection of esophagectomy specimens of patients from the Esophagus, Stomach and Small Bowel Surgery Group of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre from August 1998 to February 2004. Demographic and endoscopic data (sex, age, race, hiatal hernia size and intestinal metaplasia extension), and morphologic and histopathologic tumor characteristics (deep tumor invasion, lymph node status, and tumor differentiation) were analyzed. The c-myc expression was assessed using the Immunoreactive Scoring System (IRS)

Results: Overexpression of c-myc was found in only 9.6% of normal tissue specimens, 37,2% of Barrett's esophagus, 45,5% of BE patients with displasia and 73% adenocarcinoma samples, with significant statistic difference among these groups. No correlation was identified when the c-myc expression was compared with morphologic and histologic tumor features or endoscopic data. However, linear correlation of c-myc overexpression along the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence was observed.

Conclusion: The study demonstrated a significant increase of the expression of c-myc in Barrett's esophagus, dysplasia and adenocarcinoma in relation to the control group, as well as a linear progression of this gene expression in this sequence. These results point tot the importance of this marker in the development of ACE from EB. The increased expression of the c-myc in patients with EB may help to identify patients with increased risk for adenocarcinoma development, contributing to an early diagnosis of this disease.

Key-Words: Barrett's esophagus, esophageal adenocarcinoma, c-myc, immunohistochemistry, esophagus.

1. INTRODUCTION

Until the 1960s, ninety percent of esophageal tumors in the United States of America were squamous cells carcinoma (SCC)(1;2). However, in the last two decades, the frequency of esophageal and esophagogastric junction adenocarcinoma has increased such that its occurrence today is almost the same as that of SCC in developed countries (3-6).

The increased incidence of esophageal adenocarcinoma associated with the recognition of Barrett's Esophagus (BE) as a precursor to malignancy has stimulated research in methods for early detection of ACE and its relationship to BE. Through increasing degrees of dysplasia, esophageal adenocarcinoma develops from metaplasia into carcinoma. Each year, the pre-malignant nature of BE places patients at risk of developing ACE at rates ranging from 0,5% to 2% (7-9). This represents a risk 30-125 times greater than the general population (10-14). Although esophageal adenocarcinoma develops in only 10% of BE patients, it is important to identify those patients with an increased risk of developing an invasive carcinoma since, in some cases, it is possible to reverse this progression (15).

Understanding the characteristics of the molecular mechanism that promotes the progression of BE can contribute to the identification of genetic markers that predict a risk for developing esophageal cancer. Genetic abnormalities involving a variety of proto-oncogenes, tumor suppressor genes, cellular adhesion molecules and growth factors have already been identified. However, the functional evolution of these abnormalities in the carcinogenesis has yet to be defined.

The proto-oncogene c-myc plays an important role in the tumorigenesis, since it is involved in the apoptosis and cellular growth process. The mutation of c-myc has been observed in gastric, colon, breast and lung tumors and in Burkitt's lymphoma (16;17). However, little is known of the role c-myc plays in the carcinogenesis of BE and in esophageal adenocarcinoma.

The purpose of this study is to evaluate c-myc in patients with BE and esophageal adenocarcinoma, and to identify a correlation between the presence of c-myc and the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence.

2. PATIENTS and METHODS

2.1. Patients

The population of this study included one hundred twenty two subjects between the ages of 16 and 90 who presented with gastroesophageal reflux disease (GERD) complicated with BE or esophageal and esophagogastric junction adenocarcinoma from the Esophagus, Stomach and Small Bowel Surgery Group of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Thirty-one patients with normal gastric biopsy were assigned to Group 1 which became the control group. Forty-five BE patients without dysplasia were in Group 2. Eleven BE patients with dysplasia were assigned to group 3. Group 4 consisted of thirty seven patients with esophageal and esophagogastric junction adenocarcinoma. The study was bounded from August, 1998 to February , 2004. [Marcelo, if group 1 was the CONTROL group, what were groups 2, 3, and 4? Were they the EXPERIMENTAL groups? This is not clear.]

2.2 Immunohistochemistry

The paraffin blocks from biopsy or esophagectomy resection were analyzed by immunohistochemistry. Antigenic recovery was obtained after the histological material, endogenous peroxidase inactivation and unspecific reactions blockade were deparaffinized. The primary antibody c-myc (DAKO, code M3570 - Mouse anti c-myc; clone 9E10), incubated at 60°C for 6 hours at a dilution of 1:50. Streptavidine-biotin complex was used to localize the primary antibody. Diaminobenzidinetetrahydrochloroeto was used as cromogene. Normal colon biopsies with and without antibody were used for positive and negative control, respectively.

The analysis of c-myc was conducted in accordance with the Immunoreactive Scoring System developed by Remmele (18). First, the researchers recorded the intensity of the staining, rating it from 0 to 3, where 0 was negative, 1 was weak, and 2 was moderate and 3 are strong.

Next, the immunohistochemistry results were also analyzed according to the increased ratio of positive cells (400x), and scaled from 0 to 4. In this case, zero indicated no coloration; 1 corresponded to 10% of positive cells; 2 represented 11% to 50% of immunorreaction; 3 represented 51% to 80% and 4 indicated that more than 80% of the cells were stained.

The final score for the c-myc was obtained by multiplying the two classifications described above. A minimum of 10 visual fields with an increase greater than 400 times were used for each evaluation of the IRS. A score of 2 or less was considered weak immunorreagent and not indicative of a positive expression of the gene. Conversely, a score of 3 or more was considered representative of a positive expression of c-myc (18). Finally, two senior pathologists, who were experienced in gastrointestinal pathology, performed an immunohistochemical analysis.

2.3 Statistical Analysis

The variable age was interpreted according to an analysis of variance (ANOVA) and by the Student-Newman-Keuls test. The other categorical variables were analyzed by means of Fischer's exact test and Pearson's chi-square test. The comparative analysis of the expression of c-myc between the studied groups was determined by the Pearson chi-square test associated with the Bonferroni correction test. The linear association of the of c-myc between the groups was analyzed using a chi-

square test of linear trend, and the linear correlation of this variable was calculated using the Spearman correlation coefficient. *P* values less than .05 were considered significant.

3. RESULTS

Table 1 shows the demographic characteristics of the 122 patients. An over expression of c-myc was found in 3 (9,7%) of 31 normal samples, 16 (37,2%) of 43 BE without dysplasia samples, 5 (45,5%) of 11 BE with dysplasia and 27 (73,0%) of 37 adenocarcinoma samples (see Figure 1). The statistical analysis of c-myc expression demonstrated a significant difference of groups 2, 3 and 4 in relation to group 1, and between the groups 2 and 4 (see Figure 2).

Table 1. Demographic characteristics of the 122 patients of the study

	Group 1 n = 31	Group 2 n = 43	Group 3 n = 11	Group 4 n = 37	Total n = 122
Age* (media±DP)	54,4±13,3	56,4±17,4	58,5± 15,7	63,7±11,4*	58,1±15,2
Sex† (%)					
Male	48,4	48,1	63,6	78,4†	57,4
Female	51,6	51,9	36,4	21,6	42,6
Race (%)					
Caucasian	90,3	94,4	100	89,2	91,8
Black/Other	09,7	05,6	0	10,8	08,2

* p=0,02 in variable comparison between the Group 4 and the groups 1, 2 and 3

† p=0,008 in variable comparison between the Group 4 and the groups 1 and 2

According to the length of the columnar esophagus, 10 patients had less than 1 cm of columnar epithelium, 5 presented with 1 cm, 4 patients with 2 cm, 10 patients with 3 cm, and 3 patients with 4 cm. The expression of c-myc in these five groups was 30%, 40%, 50%, 70% and 100%, respectively. The analysis of this data demonstrated a linear association between the length of columnar esophageal epithelium and the expression of c-myc ($p=0,01$). However, there was no correlation among the 22 BE patients with more than 4 cm of columnar epithelium extension, and whose expression of c-myc was only 36 percent.

Following the histological differentiation, the tumors were separated in well differentiated, moderately differentiated and poorly differentiated groups. The expression of c-myc in these groups was 75%, 80% and 61.5%, respectively, and did not correlate with the degrees of histological differentiation ($p>0.3$).

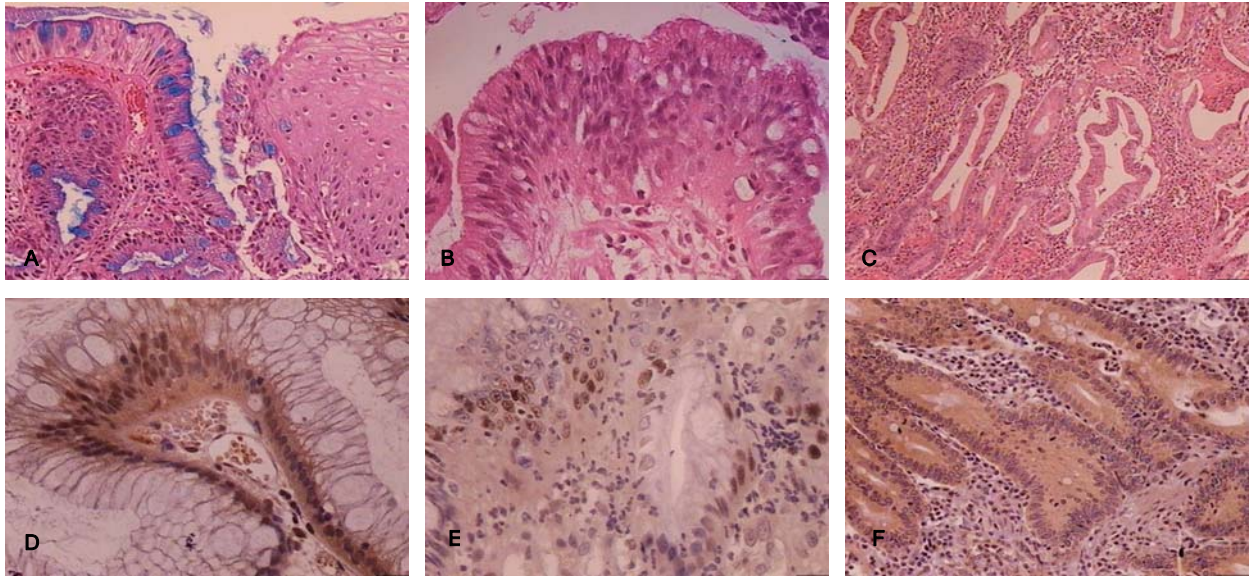


Figure 1. Histologic aspects in metaplasia-displasia-adenocarcinoma sequence in H&E stain (A, B,C) and its respective immunohistochemical expressions of c-myc (D,E, F). Histologic aspect of EB without dysplasia in 100x (A), EB with dysplasia in 200x (B) and adenocarcinoma in 50x (C). Immunoreactivity of c-myc in EB without dysplasia in 200x (D), EB with dysplasia in 200x (E) and ACE in 100x (F).

Using the TNM system, the adenocarcinoma group was classified into stages I, II, III and IV. The expression of c-myc between these groups was 75%, 75%, 90% and 50%, respectively, and no correlation was observed with this variable ($p > 0,2$).

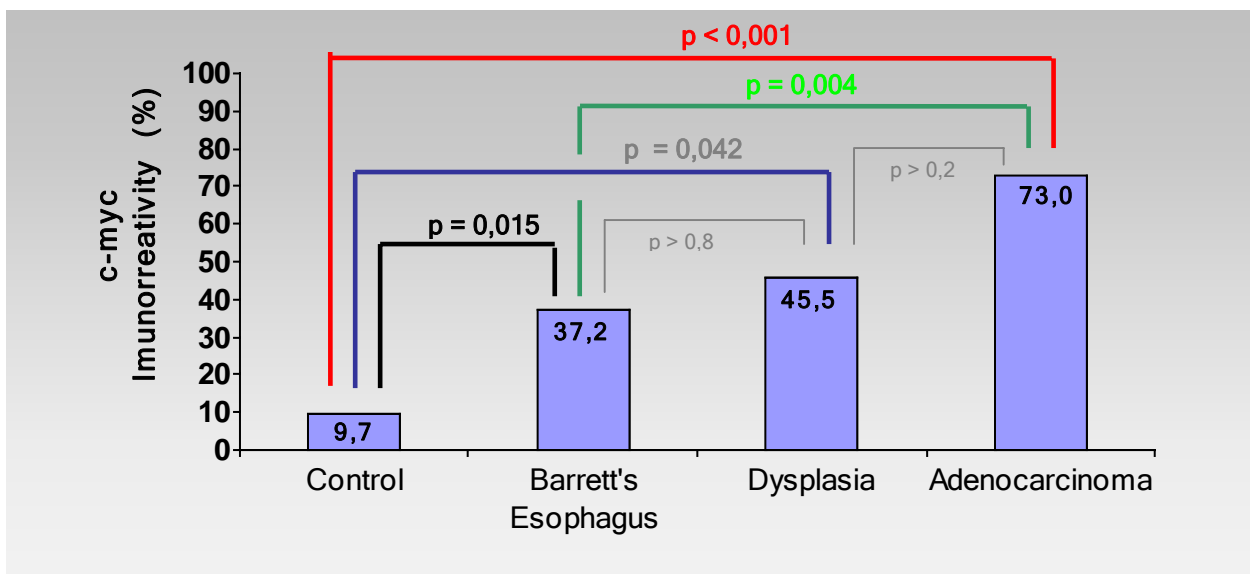


Figure 2. Correlation of immunohistochemistry expression of c-myc between the studied groups

4. DISCUSSION

The first findings relative to the action of c-myc in esophageal tumorigenesis involved the use of the *in situ* hybridization technique to analyze 12 patients with EB. The study showed that the increased expression of the messenger RNA of c-myc could be detected in tissues with dysplasia or adenocarcinoma, but not in the esophageal intestinal metaplasia (19). Similarly, studies of chromosomal imbalance in patients with ACE demonstrated an amplification in the 8q24 region, which contains the proto-oncogene c-myc. Moskaluk found an amplification of the DNA in this region in 8 of the 15 esophageal and esophagogastric junction adenocarcinoma (20), while Walch observed this same genetic alteration in only 2 of the 30 cases of esophageal adenocarcinoma, and in 1 of 11 samples of high grade dysplasia. There was no alteration identified in samples containing only intestinal metaplasia or in low grade dysplasia (20).

With relation to the demographic characteristics, the researchers observed a predominance of male patients in group 4(78,4%) in relation to the other groups ($p=0,008$). This finding is consistent with epidemiologic data showing that esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas are more prevalent in males, at rate of 7:1(21-24).

The expression of c-myc was correlated to the length of the columnar epithelium, independent of its categorization in the short segment of Barrett's esophagus (SSBE), when the columnar epithelium was less than three centimeters, or the long segment of Barrett's esophagus (LSBE), with three or more centimeters. This analysis was conducted because of indirect evidence indicating that the risk for the tumoral progression was associated with the length of the intestinal metaplasia (25;26), suggesting that a small intestinal metaplasia extension plays a less important role in esophageal carcinogenesis. Thus, when patients with intestinal metaplasia with up to four centimeters of extension were studied, the researchers observed a correlation between the index of c-myc expression and the length of the intestinal metaplasia ($p=0,01$). However, this correlation was not evident when the data from patients with more than four centimeters of EB were analyzed.

Molecular analysis in samples of intestinal metaplasia associated with dysphasia suggested that one or more clones of epithelial cells acquired genetic alterations that predisposed these cells to become malignant. Jankowski al cols

reported that the presence of low grade dysplasia was followed by a loss of control for the process of cellular proliferation, a modified expression of genes and a stimulation of growth factors (27). Following the evolutionary process of the dysplasia, micro satellite instability, a loss of the cellular adhesion and an increase of the alterations of aneuploidia were observed by Reid in samples of high grade dysplasia (28). The authors expected a greater instance of a positive expression of c-myc in patients with EB with dysplasia when compared with the group of EB patients without dysplasia. However, there was no significant difference in the gene among these groups ($p=0,8$).

Correlations were observed between the activation of c-myc and specific parameters of an advanced tumor stage such as invasiveness and linfonodal involvement (29). However, this relationship could not be established in relation to the esophagus cancer within the context of this study since the expression of c-myc did not differ according to tumoral invasion (T) and linphonodal involvement (N) between the groups.

As stated previously, the purpose of this study was to analyze the expression of c-myc in the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in patients with BE and adenocarcinoma. According to the literature, this is the second study to demonstrate an increased expression of c-myc in ACE and also in EB patients. For EB patients, the positive expressions of c-myc found in this study were 38,9% and 73% in those with adenocarcinoma. These findings corroborate those of Tselepis and collaborators who identified a modified expression of c-myc in 50% of the patients with BE and in 90% of the studied samples of adenocarcinoma (30).

The imunohistochemistry identified a cellular expression of c-myc in 9,6% of control group, 37.2% in EB patients without dysplasia, 45.5% in EB patients with dysplasia and 73% in patients with adenocarcinoma. Such results demonstrate a linear correlation of a positive c-myc throughout a chain that involves patients without epithelial alteration, carrying metaplasia, dysplasia and patients with cancer. This result is supported by the expressive number of the studied sample and by the high index of statistical significance ($p<0.001$).

The modified expression of c-myc occurs in an ample variety of human tumors. Its frequent association with a poor prognostic of neoplasias indicates an important role of this oncogene in the tumoral progression. The increased positivity rate in the expression of c-myc found in the samples with adenocarcinoma (73%) suggests that the

modified expression of this gene is an event, between others ones, that acts as a determinative form in the development of the esophagic cancer.

On the other hand, the high rate of positivity c-myc expression identified in this study among patients with EB (38,9%), and the relatively low risk of the progression of this precursory injury for the ACE (0.5% 2%) suggests that its being necessary for the development of neoplasia, oncogene c-myc by itself would be insufficient for the tumoral progression. Possibly, other regulating cellular proliferation and apoptosis process factors such as p53 and bcl-2, would act on these molecularly modified cells, thereby hindering its neoplastic transformation.

The principal finding of this study was the presence of a linear correlation of increasing positivity in the immunohistochemistry expression of the c-myc gene at the sequence that involved patients with esophageic intestinal metaplasia, patients with low-grade dysplasia and patients with adenocarcinoma. Such results point out the important role of c-myc in the progression of EB in the metaplasia-displasia-adenocarcinoma sequence.

5. REFERENCES

- (1) Spechler SJ. Barrett's esophagus. *Semin Oncol* 1994; 21(4):431-437.
- (2) Blot WJ. Esophageal cancer trends and risk factors. *Semin Oncol* 1994; 21(4):403-410.
- (3) Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF, Jr. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 1991; 265(10):1287-1289.
- (4) Blot WJ, Devesa SS, Fraumeni JF, Jr. Continuing climb in rates of esophageal adenocarcinoma: an update. *JAMA* 1993; 270(11):1320.
- (5) Daly JM, Karnell LH, Menck HR. National Cancer Data Base report on esophageal carcinoma. *Cancer* 1996; 78(8):1820-1828.
- (6) Bytzer P, Christensen PB, Damkier P, Vinding K, Seersholm N. Adenocarcinoma of the esophagus and Barrett's esophagus: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(1):86-91.
- (7) Hofstetter WL, Peters JH, DeMeester TR, Hagen JA, DeMeester SR, Crookes PF et al. Long-term outcome of antireflux surgery in patients with Barrett's esophagus. *Ann Surg* 2001; 234(4):532-538.
- (8) DeMeester SR, DeMeester TR. Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus: fifty years of controversy. *Ann Surg* 2000; 231(3):303-321.
- (9) 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(8):2037-2042.
- (10) Hameeteman W, Tytgat GN, Houthoff HJ, van den Tweel JG. Barrett's esophagus: development of dysplasia and adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1989; 96(5 Pt 1):1249-1256.
- (11) 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(8):2043-2053.
- (12) Reynolds JC, Waronker M, Pacquing MS, Yassin RR. Barrett's esophagus. Reducing the risk of progression to adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28(4):917-945.

- (13) Stein HJ, Kauer WK, Feussner H, Siewert JR. Bile reflux in benign and malignant Barrett's esophagus: effect of medical acid suppression and nissen fundoplication. *J Gastrointest Surg* 1998; 2(4):333-341.
- (14) Morris CD, Armstrong GR, Bigley G, Green H, Attwood SE. Cyclooxygenase-2 expression in the Barrett's metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(4):990-996.
- (15) Gurski RR, Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR, Bremner CG, Chandrasoma PT et al. Barrett's esophagus can and does regress after antireflux surgery: a study of prevalence and predictive features. *J Am Coll Surg* 2003; 196(5):706-712.
- (16) Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 1999; 18(19):3004-3016.
- (17) Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999; 19(1):1-11.
- (18) Remmele W, Schicketanz KH. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs. subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract* 1993; 189(8):862-866.
- (19) Abdelatif OM, Chandler FW, Mills LR, McGuire BS, Pantazis CG, Barrett JM. Differential expression of c-myc and H-ras oncogenes in Barrett's epithelium. A study using colorimetric in situ hybridization. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115(9):880-885.
- (20) Walch AK, Zitzelsberger HF, Bruch J, Keller G, Angermeier D, Aubele MM et al. Chromosomal imbalances in Barrett's adenocarcinoma and the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. *Am J Pathol* 2000; 156(2):555-566.
- (21) Pera M. Trends in incidence and prevalence of specialized intestinal metaplasia, barrett's esophagus, and adenocarcinoma of the gastroesophageal junction. *World J Surg* 2003; 27(9):999-1008.
- (22) Hirota WK, Loughney TM, Lazas DJ, Maydonovitch CL, Rholl V, Wong RK. Specialized intestinal metaplasia, dysplasia, and cancer of the esophagus and esophagogastric junction: prevalence and clinical data. *Gastroenterology* 1999; 116(2):277-285.
- (23) Cameron AJ. Epidemiology of columnar-lined esophagus and adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 1997; 26(3):487-494.
- (24) Cameron AJ, Lomboy CT, Pera M, Carpenter HA. Adenocarcinoma of the esophagogastric junction and Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1995; 109(5):1541-1546.
- (25) Rudolph RE, Vaughan TL, Storer BE, Haggitt RC, Rabinovitch PS, Levine DS et al. Effect of segment length on risk for neoplastic progression in patients with Barrett esophagus. *Ann Intern Med* 2000; 132(8):612-620.
- (26) Spechler SJ. Clinical practice. Barrett's Esophagus. *N Engl J Med* 2002; 346(11):836-842.
- (27) Jankowski J. Gene expression in Barrett's mucosa: acute and chronic adaptive responses in the oesophagus. *Gut* 1993; 34(12):1649-1650.
- (28) Reid BJ, Blount PL, Rubin CE, Levine DS, Haggitt RC, Rabinovitch PS. Flow-cytometric and histological progression to malignancy in Barrett's esophagus: prospective endoscopic surveillance of a cohort. *Gastroenterology* 1992; 102(4 Pt 1):1212-1219.
- (29) Garte SJ. The c-myc oncogene in tumor progression. *Crit Rev Oncog* 1993; 4(4):435-449.
- (30) Tselepis C, Morris CD, Wakelin D, Hardy R, Perry I, Luong QT et al. Upregulation of the oncogene c-myc in Barrett's adenocarcinoma: induction of c-myc by acidified bile acid in vitro. *Gut* 2003; 52(2):174-180.