

PLÍNIO CONTE DE FARIA JÚNIOR

A INTER-RELAÇÃO DAS SIALOMUCINAS

(antígenos Tn e Stn) COM O ADENOCARCINOMA

NO EPITÉLIO DE BARRETT

9387040008

CAMPINAS

2002



PLÍNIO CONTE DE FARIA JÚNIOR

***A INTER-RELAÇÃO DAS SIALOMUCINAS
(antígenos Tn e Stn) COM O ADENOCARCINOMA
NO EPITÉLIO DE BARRETT***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do título de
Mestre em Cirurgia, área de Cirurgia.*

ORIENTADOR: PROF. DR. NELSON ADAMI ANDREOLLO

CAMPINAS

2002

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. NELSON ADAMI ANDREOLLO

Membros Titulares:

-
1. Prof. Dr. NELSON ADAMI ANDREOLLO

 2. Prof. Dr. NELSON ARY BRANDALISE

 3. Prof. Dr. IVAN CECCONELLO

 4. Prof. Dr. JOSÉ LUÍS BRAGA DE AQUINO

Membros Suplentes:

-
1. Prof. Dr. CIRILO PARDO MEO MURARO

 2. Prof. Dr. LUIZ ROBERTO LOPES

Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data:18/12/2002

DEDICATÓRIA

*À minha mãe, Glafira (in memoriam),
e a meu pai, Plínio,
por terem me mostrado o caminho.*

Ao meu orientador, Professor Doutor Nelson Adami Andreollo, quem aprendi a admirar pela disponibilidade constante e orientação segura na elaboração deste estudo.

À Professora Doutora Miriam Aparecida da Silva Trevisan, pela revisão das lâminas, além da orientação capaz e fundamental, para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor José Luis Braga de Aquino, pelos ensinamentos desde os tempos da residência, sempre amigo e pronto a nos incentivar.

Ao Professor Doutor Marcelo Alvarenga, Chefe do Laboratório de Patologia Experimental do CAISM-UNICAMP e do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital e Maternidade Celso Pierro da PUC-Campinas, por ter autorizado a liberação das lâminas e a utilização do laboratório para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Glauce Aparecida Pinto, Coordenadora do Laboratório de Patologia Experimental do CAISM-UNICAMP, pelo apoio na realização do estudo imunoistoquímico.

À bióloga Marisa de Almeida Matsura, Técnica do Laboratório de Patologia Experimental do CAISM-UNICAMP, pela aplicação da técnica de imunoistoquímica.

Ao Professor Doutor Konradin Metze, Coordenador do Laboratório de Anatomia Patológica Experimental - Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da FCM-UNICAMP, por ter autorizado que as lâminas fossem preparadas no laboratório.

À técnica Gisele Clotilde Ferreira, do Laboratório de Anatomia Patológica Experimental - Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da FCM-UNICAMP, pela preparação das lâminas para o estudo imunoistoquímico.

Ao Sr. Lourival Marques, responsável pelo setor de arquivo do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da PUC-Campinas.

Ao amigo, Doutor Lix Alfredo Reis de Oliveira, médico endoscopista, pela contribuição na casuística, para a realização deste trabalho.

À Doutora Rosângela Deliza, médica patologista, que nos auxiliou no estudo anatomopatológico.

Aos Professores Doutores José Alfredo dos Reis Neto, Cirilo Pardo Meo Muraro, Flávio Antonio Quilici, Fernando Cordeiro e demais docentes do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da PUC-Campinas, pelo apoio e incentivo.

Aos Doutores Pedro de Castro Neto, Maristela Hipólito, Alice D'Attoma, e demais colegas do Serviço de Endoscopia do Hospital e Maternidade Celso Pierro da PUC-Campinas.

Aos meus filhos, Lucas e André, razão maior para que busquemos sempre novos desafios.

E, em especial,

À minha querida esposa, Professora Doutora Antonia Paula Marques de Faria, por seu carinho, amizade, conhecimento e, principalmente, tolerância e lucidez, sem os quais não teria sido possível a conclusão deste trabalho.

	PÁG.
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
1- INTRODUÇÃO	18
1.1- Histórico do esôfago de Barrett.....	19
1.2- Conceito atual de esôfago de Barrett.....	22
1.3- Etiologia.....	22
1.4- Epidemiologia do epitélio de Barrett	24
1.5- Diagnóstico do epitélio de Barrett.....	26
1.5.1- História clínica.....	26
1.5.2- Endoscopia.....	26
1.5.2.1- Cromoscopia no epitélio de Barrett	27
1.5.3- Estudo manométrico e pHmetria de 24h.....	30
1.6- Adenocarcinoma e epitélio de Barrett.....	31
1.7- Marcadores para progressão neoplásica no epitélio de Barrett.....	33
1.7.1- Anormalidades do ciclo e proliferação celular e da constituição cromossômica.....	33
1.7.2- Genes de supressão tumoral.....	36
1.7.3- Enzima mucosas.....	37
1.7.4- Antígeno carcinoembriogênico.....	38
1.7.5- Fatores de regulação do crescimento celular.....	38
1.7.6- Expressão de E-Cadherin.....	38
1.7.7- Mucinas.....	39

2- OBJETIVOS.....	44
3- CASUÍSTICA.....	46
4- METODOLOGIA.....	51
4.1- Padronização para obtenção das biópsias endoscópicas.....	52
4.2- Estudo histopatológico.....	54
4.3- Estudo imunoistoquímico.....	55
4.4- Análise final das lâminas.....	56
5- RESULTADOS.....	57
5.1- Grupo I – Doentes com EB.....	58
5.2- Pacientes com adenocarcinoma no epitélio de Barrett	61
5.3- Indivíduos normais.....	62
6- DISCUSSÃO.....	63
6.1- Epitélio de Barrett e Adenocarcinoma.....	64
6.2- Estudo do muco.....	68
7- CONCLUSÕES.....	71
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E TÍTULOS

%	Valores percentuais.
°C	Graus centígrados.
AA	Azul de Alcian.
CEA	Antígeno carcino-embriogênico.
DAB	Diaminobenzidina.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DNA	Ácido Desoxirribonucléico.
DRGE	Doença do Refluxo Gastroesofágico.
EB	Epitélio de Barrett.
EGF	Fator de crescimento epidérmico.
EGF-R	Receptores do fator de crescimento epidérmico.
Hab	Habitantes.
HE	Hematoxilina-eosina.
ODC	Descarboxilase de ornitina.
PAS	Ácido periódico de Schiff.
PBS	Tampão fosfato de sódio.
Stn	Antígeno carboidrato tipo-mucina orto-ligado a proteínas com resíduo de ácido siálico.
TEG	Transição esôfago-gástrica.
TGF-α	Fator de transformação de crescimento.
TGI	Trato gastrointestinal.
Tn	Antígeno carboidrato tipo-mucina orto-ligado a proteínas

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Positividade dos antígenos Stn e Tn nas células calciformes e colunares nos portadores de EB.....	60
Tabela 2- Incidência de adenocarcinoma em EB - Estudos retrospectivos.....	66
Tabela 3- Incidência de adenocarcinoma em EB - Estudos prospectivos.....	67

	<i>PÁG.</i>
Figura 1- Métodos histoquímicos utilizados para identificação de mucinas	40
Figura 2- Esôfago com EB ao exame endoscópico.....	48
Figura 3- Adenocarcinoma no EB ao exame endoscópico.....	49
Figura 4- Esôfago normal ao exame endoscópico.....	50
Figura 5- Esôfago com EB (cromoscopia com lugol).....	52
Figura 6- Esôfago com EB (cromoscopia com azul de metileno).....	53
Figura 7- Esôfago com EB (corte histológico corado com azul de Alcian) (x 10).....	54
Figura 8- Esôfago com EB (coloração imunoistoquímica específica para antígeno Stn) (x 40).....	58
Figura 9- Esôfago com EB (coloração imunoistoquímica específica para antígeno Tn) (x 40).....	59

	<i>PÁG.</i>
Gráfico 1- Sialomucinas (Tn e Stn): Grupo controle e epitélio de Barrett.....	60
Gráfico 2- Sialomucinas (Tn e Stn): Adenocarcinoma no epitélio de Barrett...	61



RESUMO

O esôfago de Barrett é uma complicação da doença do refluxo gastro-esofágico crônico, caracterizado pela substituição do epitélio próprio do órgão por epitélio colunar especializado, com células caliciformes demonstradas pela coloração com o azul de Alcian, em pH 2,5, sendo considerado um fator de risco primário para o desenvolvimento de adenocarcinoma, estimado em cerca de 30 a 125 vezes maior do que na população geral. O melhor método para o estudo macroscópico do esôfago é a esofagogastroduodenoscopia que, com o auxílio de corantes como o lugol e o azul de metileno, possibilita a realização de biópsias nos locais mais adequados, porém não dispensando a confirmação anatomopatológica posterior. Por ser doença letal, vários marcadores para a progressão neoplásica no epitélio de Barrett têm sido estudados, como o antígeno carcino-embriogênico (CEA), genes de supressão tumoral (p53), fatores de regulação do crescimento epidérmico, entre outros. O estudo do muco, em especial das mucinas ácidas representadas pelas sialomucinas presentes nas células caliciformes que caracterizam o EB, mostrou que na metaplasia do tipo intestinal, freqüente no trato digestório, o epitélio original do órgão passa a expressar outros antígenos associados ao muco e métodos imunistoquímicos têm possibilitado a realização de estudos mais detalhados a esse respeito. Os antígenos Tn e Stn já foram analisados em tumores gástricos e de cólon, porém na literatura consultada não foram verificadas referências à utilização destes antígenos no EB. Diante disso, estudou-se 36 doentes com EB, sete acometidos por adenocarcinoma no EB, além de oito indivíduos com epitélio esofágico normal ao exame endoscópico, quanto à expressão das sialomucinas representadas pelos antígenos Tn e Stn, utilizando métodos imunistoquímicos. Entre os doentes que apresentavam somente o EB, foram observados, nas células caliciformes, positividade para Stn em 100% dos casos e para Tn em 48% dos casos. Já nas células colunares, o Stn foi sempre negativo, enquanto o Tn foi positivo em 100% dos casos. Nos portadores de adenocarcinoma no EB, a positividade para ambos os antígenos foi de 100%. Em vista dos resultados obtidos, é possível que o grupo de 14 doentes em que ocorreu positividade para o Tn nas células caliciformes, à semelhança do ocorrido quanto à positividade do mesmo

antígeno nos portadores de adenocarcinoma, sejam aqueles com maior suscetibilidade para ocorrência futura de câncer.



ABSTRACT

Barrett's esophagus is considered a sequela of chronic gastroesophageal reflux disease. It is characterized by the substitution of the esophageal epithelium for an abnormal columnar epithelium, with goblet cells, which are demonstrated by alcian blue stain in pH 2,5, being considered a primary risk factor for the adenocarcinoma development, with an estimated incidence from one in 152 to one in 441 cases per patient year, or a 30- to 125- fold excess risk. Endoscopy is the best method for the macroscopic study of the esophagus and with the use of stains like lugol and methylene blue, it allows biopsies to be performed at the most adequate areas, though not disregarding, posterior histopathological confirmation. As a possible lethal disease, several markers for the neoplastic progression at the Barrett's epithelium have been studied, such as the carcinoembryonic antigen (CEA), tumor supressor genes(p53), epidermal growth factors(EGF), among others. The mucin's study, specially the sialomucins, found in the goblet cells that characterize Barrett's epithelium, showed that in the intestinal type metaplasia, frequent in digestive tract, the original epithelium starts showing other mucus related antigens, and immunohistochemical techniques, have been allowing realization to more detailed studies concerning this matter. Stn and Tn antigens have already been found at both gastric and colon adenocarcinomas, on the other hand, at the consulted sources, references related to this specific antigens on Barrett's epithelium were not found. Taking into account these facts, 36 patients were studied, 7 of them with adenocarcinoma in Barrett's epithelium, besides 8 individuals with normal esophagus verified at endoscopy, concerning the presence of sialomucins represented both by Stn and Tn antigens immunohistochemically. Among the patients presented only Barrett's epithelium was verified at goblet cells, positivity for Stn on 100% of cases and 48% for Tn antigen. At the columnar cells Stn was without inception, negative, while Tn was positive on all cases. On Barrett's epithelium patients with adenocarcinoma, all had both antigens. In view of the obtained results, it is possible that, in the group of 14 diseased one's, on which was found positivity of Tn on goblet cells, the similarity relating the positivity of the same antigens in the patients with adenocarcinoma at Barrett's epithelium are the patients that can probably in the future have cancer.



1- INTRODUÇÃO

1.1- HISTÓRICO DO ESÔFAGO DE BARRETT

Em 1950, Norman Barrett definia o esôfago como a parte do intestino primitivo distal ao músculo cricofaríngeo revestida por epitélio escamoso (BARRETT, 1950). Nos dias atuais, ironicamente, o segmento de esôfago revestido por epitélio do tipo colunar é chamado de esôfago de Barrett (SPECHLER, 1994). Em 1906, Tileston, médico patologista, relatou vários casos de pacientes com 'úlceras de esôfago', ressaltando a semelhança entre a membrana mucosa dessas lesões com aquela normalmente encontrada no estômago (SPECHLER e GOYAL, 1996).

Nas quatro décadas subseqüentes, foram registradas situações semelhantes, ou seja, indivíduos com ulcerações pépticas do esôfago em locais revestidos por epitélio colunar do tipo gástrico, sendo sugerido que o órgão com tais ulcerações não era o esôfago, mas sim um segmento tubular do estômago trazido para o tórax, como resultado de um encurtamento congênito do esôfago, teoria essa proposta por Barrett (1950). Apesar de não haver concordância quanto à origem do epitélio intratorácico em questão, se esofágico ou gástrico, todos aceitavam o fato de o mesmo ser do tipo colunar (SPECHLER e GOYAL, 1996). Entretanto, nessa época, nenhum dos pesquisadores, inclusive Barrett, descreviam o epitélio colunar com características de epitélio intestinal, isto é, com células caliciformes.

Segundo a revisão de Spechler e Goyal (1996), a primeira referência à presença de células caliciformes no epitélio colunar que revestia o esôfago distal foi a de Bosher e Taylor que, em 1951, relataram tais achados em uma paciente que apresentava um longo segmento esofágico revestido por mucosa do tipo gástrico, composto por glândulas contendo células caliciformes, mas sem células parietais. Em 1952, Morson e Belcher também publicaram o caso de um indivíduo com adenocarcinoma de esôfago, cuja mucosa apresentava alterações atróficas e aspecto sugestivo de mucosa do tipo intestinal com células caliciformes. No ano seguinte, Allison e Johnstone (1953) provaram que a estrutura intratorácica revestida por epitélio do tipo colunar, designada por Barrett (1950) como estômago intratorácico era, na realidade, o esôfago pois, diferentemente do estômago, não era revestida por peritônio, apresentava numerosas ilhotas de mucosa do tipo escamoso e glândulas na submucosa, assim como a camada muscular era característica do esôfago. Assim, esses autores propuseram que as ulcerações encontradas no esôfago revestido por

epitélio do tipo colunar deveriam ser chamadas a partir de então de 'úlceras de Barrett' (SPECHLER e GOYAL, 1996).

Em 1957, Barrett mudou de opinião e aceitou o fato de que o órgão revestido por epitélio colunar era mesmo o esôfago, sugerindo a denominação de “esôfago distal revestido por epitélio colunar” . Entretanto, ele não fez referência a que o epitélio poderia ser do tipo intestinal, como também não propôs uma extensão mínima necessária para estabelecer esse diagnóstico (BARRETT, 1957).

A controvérsia relacionada sobre os aspectos histológicos e a patogenicidade do epitélio colunar do esôfago distal permanecia, e muitos autores, interessados no estudo dessa condição nos anos 50, inclusive Barrett e Allison, reconheciam a associação desse tipo de epitélio com hérnia hiatal e esofagite por refluxo. Contudo, apesar dessas evidências, a maioria ainda defendia a hipótese de a mucosa ser revestida por epitélio colunar de origem congênita até 1959, quando Moersch et al.¹ sugeriram que tal revestimento poderia ser adquirido como seqüela de esofagite por refluxo (SPECHLER e GOYAL, 1996).

Vale mencionar ainda que Hayward², em 1961, publicou um tratado sobre o assunto, questionando o fato de que se o epitélio escamoso do esôfago se fundia com o do fundo gástrico, que é ácido secretor, o primeiro poderia ser digerido pelo segundo e, sendo assim, deveria haver uma zona intermediária, na junção dos epitélios, que não secretaria ácido nem pepsina, porém seria resistente a eles. Hayward (1961) defendia a idéia de que o esôfago normal não seria revestido em toda a sua extensão por epitélio do tipo escamoso, mas nos últimos 1,0 ou 2,0 cm deveria existir um revestimento do tipo colunar que se estenderia em direção ao estômago e produziria uma espécie de muco sem sucos digestivos, o qual dividiria com os epitélios fúndico e pilórico a capacidade de resistir à secreção ácido péptica (SPECHLER e GOYAL, 1996).

¹ MOERSCH RN. et al (1959) *apud* SPECHLER, SJ; GOYAL, KR. The columnar-lined esophagus, intestinal metaplasia, and Norman Barrett. **Gastroenterology**, 110:614-621, 1996.

² HAYWARD (1961) *apud* SPECHLER, SJ; GOYAL, KR. The columnar-lined esophagus, intestinal metaplasia, and Norman Barrett. **Gastroenterology**, 110:614-621, 1996.

Durante os anos 60 e 70, ainda não havia consenso quanto aos aspectos histológicos descritos para o esôfago revestido por epitélio colunar. Contudo, Paull et al. (1976) publicaram os resultados de um estudo com 11 pacientes que apresentavam a alteração já designada pela comunidade científica de esôfago de Barrett, submetidos a biópsias do epitélio colunar em diferentes níveis, com o auxílio da manometria esofágica, demonstrando que possuíam pelo menos um ou a combinação de 3 tipos de epitélio colunar revestindo o esôfago distal, classificados como:

- a) Epitélio tipo juncional: que lembra o epitélio normal da cárdia, com fovéolas e presença quase exclusiva de células muco-secretoras;
- b) Epitélio gástrico tipo fúndico: caracterizado por apresentar células mucosas na superfície e células principais e parietais na parte mais profunda das glândulas;
- c) Epitélio intestinal especializado: com vilosidades na superfície, células colunares e caliciformes, glândulas produtoras de muco claro, células enterocromafins e, por vezes, células de Paneth, nas camadas mais profundas da mucosa.

Os primeiros dois epitélios eram virtualmente indistinguíveis do epitélio em geral encontrado no estômago, porém o terceiro, o epitélio intestinal metaplásico, era de pronto reconhecido (PAULL et al., 1976).

O desenvolvimento da endoscopia digestiva como especialidade médica, com endoscópios menos calibrosos e drogas mais eficazes propiciando exames mais seguros, além de desconforto reduzido e resolutividade alta, contribuiu de forma significativa para o diagnóstico do epitélio de Barrett (EB).

Desde o início dos anos 70 estava clara a associação entre a epitelização colunar do esôfago distal e a doença do refluxo gastro-esofágico (DRGE), sendo notados, com bastante frequência, hérnias hiatais e processos inflamatórios extensos, dificultando ao médico endoscopista a determinação do local correspondente ao término do esôfago e o início do epitélio colunar gástrico. Com isso, se o endoscopista, inadvertidamente, obtivesse fragmentos de epitélio gástrico, seria inevitável o diagnóstico incorreto de EB (SPECHLER e GOYAL, 1986).

Quanto à extensão necessária para definir o diagnóstico endoscópico de EB, existem trabalhos incluindo somente pacientes que tivessem mais de 3 cm de epitélio colunar especializado no esôfago distal, enquanto outros consideravam o limite de 2 cm e outros ainda de 5 cm. Admitido o critério de extensão de, no mínimo, 2 cm, o problema de falso-positivo estaria resolvido, apesar da possibilidade de pequenos segmentos de epitélio metaplásico não serem identificados (SPECHLER e GOYAL, 1996).

1.2- CONCEITO ATUAL DE ESÔFAGO DE BARRETT

Nos dias de hoje, Norman Barrett certamente se surpreenderia com o interesse e o grande número de trabalhos científicos que enfocam a condição que leva o seu nome. Ficaria intrigado, também, com a definição que se dá para o que hoje denominamos esôfago de Barrett, uma vez que o conceito por ele defendido nos anos 50 era o de que esôfago curto congênito traria o estômago para o interior da cavidade torácica. Contudo, naquela época, úlceras profundas e extensas no epitélio colunar, associadas por vezes a estenoses, eram os problemas que necessitavam soluções.

Atualmente, o foco da questão está no binômio displasia-carcinoma, e o epitélio colunar, que era considerado como epitélio gástrico, hoje é denominado epitélio colunar especializado, ou metaplasia do tipo intestinal, podendo ser demonstrado pela reação do PAS e a coloração com Azul de Alcian em pH 2,5. Define-se, portanto, o EB como uma alteração do epitélio esofágico, de qualquer extensão, reconhecida pelo exame endoscópico e confirmada a presença de metaplasia do tipo intestinal pelo exame histopatológico (OBERG et al., 1998; SAMPLINER, 1998).

1.3- ETIOLOGIA

Presentemente, admite-se que o EB é uma condição adquirida, sendo encontrado, na maioria das vezes, na porção distal do esôfago, corroborando o fato de que o refluxo do material gastroduodenal é fundamental para o seu desenvolvimento. Foi demonstrado que a incidência de EB aumenta em doenças associadas com DRGE graves,

como pode ocorrer em indivíduos com esclerodermia ou naqueles submetidos a miotomia do esfíncter inferior do esôfago para tratamento da acalasia (WANG, 1994).

Em nosso meio, POLLARA (1981) estudando a reepitelização do esôfago terminal em ambiente ácido, em cortes histológicos de 14 cães submetidos à ressecção da mucosa do terço inferior do esôfago, demonstrou que a regeneração, na presença de refluxo gastroesofágico, ocorria com o aparecimento de epitélio cilíndrico originário da própria mucosa gástrica e dos ductos das glândulas submucosas do esôfago. Além disso, verificou, a partir de biópsias feitas ao acaso, que o epitélio regenerado era heterogêneo, com características ora mais simples e formado por uma única camada de células, ora mais complexas, assemelhando-se ao intestinal ou gástrico.

Vários agentes têm sido implicados na predisposição ao desenvolvimento do EB. A secreção ácida talvez seja a mais comumente envolvida, apesar de estudos relativos à produção ácida terem demonstrado que a quantidade de ácido presente no EB é semelhante àquela encontrada nas esofagites graves por refluxo.

A secreção duodenal e a alcalinização do esôfago distal têm sido também relacionadas ao EB, a partir de estudos com animais e em pacientes submetidos a gastrectomia total, confirmando estudos que associaram pH alcalino no esôfago distal a esofagites tão intensas quanto aquelas produzidas pelo ácido e foi, inclusive, demonstrado que o refluxo de ácidos biliares e de enzimas pancreáticas potencializam os danos causados inicialmente pelo ácido ao epitélio esofágico.

Dados experimentais sugerem que a ação isolada do ácido não traria prejuízos à mucosa esofagiana, porém quando combinado à pepsina, os danos à mucosa seriam significativos. Atualmente, as evidências são de que o refluxo de suco gástrico não é o principal causador da metaplasia intestinal, mas pode ser responsabilizado pela metaplasia colunar e, ainda, que o suco duodenal, contendo enzimas pancreáticas, sais biliares e isolecitinas, deve desempenhar papel de destaque no desenvolvimento da metaplasia intestinal e sua eventual degeneração maligna. A ação nociva da pepsina e da tripsina sobre a mucosa esofagiana estaria relacionada às propriedades proteolíticas de ambas que, em pH apropriado, afetariam substâncias intracelulares causando danos às células epiteliais. Os

ácidos biliares comprometeriam a membrana celular e as organelas intracelulares primariamente, mas isso parece depender da presença do ácido, que atuaria ativando agentes como o pepsinogênio, ou incrementando a capacidade dos sais biliares de penetrarem a mucosa. Esse processo poderia ser compatível com o fato de que pacientes com refluxo misto, tanto ácido quanto alcalino, têm prevalência alta de lesões na mucosa esofágica. Em meio com pH neutro, os sais biliares não conjugados causam maiores danos à mucosa esofágica do que os sais biliares conjugados. A terapia para supressão de ácido permite a proliferação bacteriana, o que levaria à desconjugação dos ácidos biliares no estômago. Ácidos biliares não conjugados normalmente precipitariam em pH ácido, porém devido à supressão da produção de ácido, permaneceriam solúveis e, portanto, contribuiriam para a lesão da mucosa esofágica.(OBERG et al., 1998).

Quanto a outros agentes patogênicos, como tabaco e álcool, sabidamente envolvidos com o carcinoma epidermóide do esôfago, foi demonstrado que não há associação com o aparecimento do EB (LEVI et al.,1990)³, assim como não foi comprovado que quimioterápicos como ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluorouracil estivessem relacionados a esse processo (FALK e RICHTER, 1996).

1.4- EPIDEMIOLOGIA DO EPITÉLIO DE BARRETT

O EB incide predominantemente em homens caucasóides e é raro nos de origem africana e asiática. Ocorre na proporção de dois homens para uma mulher, e a prevalência aumenta com a idade, predominando entre a 6ª e a 7ª décadas (FALK e RICHTER, 1996).

CAMERON e LOMBAY (1992) estimaram que a idade média para o aparecimento do EB seria de 40 anos, mas o diagnóstico seria feito em torno dos 63 anos, podendo, portanto, passar mais de 20 anos sem ser reconhecido clinicamente. Talvez a dificuldade na identificação do EB se relacione ao fato de sua sintomatologia ser semelhante a da DRGE não complicada pela metaplasia colunar, e ainda que o mesmo

³ LEVI et al. (1990) *apud* WANG, KK. Barrett's esophagus: Current and future management. *Comprehensive Therapy* 20:36-43, 1994.

epitélio alterado seria o responsável direto pela diminuição dos sintomas, tendo sido registrado que 25% dos pacientes com EB não têm sensibilidade ao ácido.

A incidência de EB vem aumentando desde a década de 70, mas isso pode corresponder a um viés determinado pela utilização do exame endoscópico como método de escolha para o diagnóstico das doenças pépticas do trato digestório superior. Por outro lado, CAMERON et al. (1990) demonstraram que o EB é pouco diagnosticado, comparando as frequências obtidas a partir do diagnóstico endoscópico e estudo necroscópico, respectivamente de 23 por 100.000 e 376 por 100.000 habitantes em uma mesma comunidade.

Em um estudo multicêntrico, realizado na Itália, envolvendo 14.898 indivíduos submetidos à endoscopia digestiva por diferentes indicações, foi verificado que entre os 251 (1,7%), nos quais foram realizadas biópsias do terço inferior do esôfago, por evidência endoscópica de EB ou esofagite em seus diversos graus, em 97 (38,6%) houve suspeita endoscópica de EB, mas 111 tiveram a confirmação histológica dessa alteração, indicando que o exame endoscópico isolado pode levar a diagnósticos falso-negativos (LAPERTOSA et al., 1992).

Em nosso meio, ANDREOLLO et al.(1997) concluíram que a prevalência de EB era de 22,4/100.000 habitantes, sendo a incidência de 0,53%, o que não difere dos índices de 0,89% e 0,78% verificados por CAMERON e LOMBAY (1992) e BONELLI (1993), respectivamente.

Segundo CROOKS e LICHTENSTEIN (1996), quando o exame endoscópico foi indicado por sintomas dispépticos, a prevalência variou de 2,5% até 23,8%, com média de 9,6%, considerando o resultado de vários estudos, incluindo necroscópicos. Classificando os pacientes conforme a sintomatologia, os com queixas dispépticas vagas teriam uma prevalência de 1 a 2%, aqueles com sintomas relacionados a refluxo gastroesofágico de 8 a 12%, os com sintomatologia significativa de esofagite entre 7,5 e 20%, e naqueles já manifestando complicações da DRGE, como estenoses, a prevalência chegaria a 44%.

1.5- DIAGNÓSTICO DO EPITÉLIO DE BARRETT

1.5.1- História clínica

Os sintomas clássicos da DRGE, tais como dor e queimação retroesternal, regurgitação, disfagia e, ocasionalmente, sintomas respiratórios como asma e tosse crônica, além da ocorrência eventual de hematêmese, provavelmente em consequência de lacerações ou mesmo úlceras na mucosa esofágica, seriam as formas de apresentação clínica que nos levariam a considerar a hipótese diagnóstica de EB.

1.5.2- Endoscopia do esôfago

Objetivamente, o exame endoscópico do esôfago é o melhor método para o estudo macroscópico do órgão, pois possibilita a identificação de locais anatomicamente demarcados e de eventuais alterações de coloração, assim como permite a realização de cromoscopia, determinando com isso maior acuidade e acerto diagnóstico.

À endoscopia, o epitélio estratificado do esôfago é de coloração rosa claro, enquanto a mucosa gástrica varia de discretamente avermelhada a rosa salmão. O encontro desses dois epitélios em pessoas normais ocorre na região do esfíncter esofágico inferior. A junção é denominada de *ora serrata*, ou linha Z, e a interface entre eles pode se estender por 1 ou 2cm (REID, 1991). No EB, a linha Z se desloca no sentido proximal e representa, então, o encontro entre o epitélio escamoso proximal e o epitélio colunar especializado distal. Com esse novo posicionamento, a *ora serrata* se apresenta de forma assimétrica e é mais extensa que o normal. (PAULL et al., 1976).

Assim, é de grande importância para o diagnóstico endoscópico do EB que as distâncias entre os dentes incisivos superiores e as marcas endoscópicas *ora serrata*, ou linha Z, e pinçamento diafragmático, sejam identificados em todo exame. Em geral, os segmentos longos de EB são vistos com facilidade, mas ocasionalmente, quando o aparelho é passado às cegas no local de reposicionamento da linha Z, o diagnóstico de EB pode não ser feito. Mesmo assim, tal erro pode ser corrigido se o endoscopista estiver atento à

identificação da linha Z em sua posição habitual no esôfago distal. Por vezes, a coloração vermelho-brilhante que acomete o epitélio escamoso nos quadros de esofagite grave, pode mascarar a transição dos epitélios (REID, 1991).

Outro aspecto importante do exame endoscópico, diz respeito à necessidade de identificação das hérnias hiatais, uma vez que a grande maioria dos pacientes com EB têm tal alteração, caracterizada pela visibilização das pregas gástricas que se dirigem de forma radial pelo hiato diafragmático e tendem a desaparecer próximo à parte distal do esfíncter inferior do esôfago. A não-identificação dessas hérnias pode levar a erros diagnósticos, com as possíveis biópsias sendo realizadas na mucosa do estômago herniado. Em indivíduos normais, a região do esfíncter inferior do esôfago é reconhecida como uma roseta de mucosa que se abre facilmente à insuflação de ar. Nos pacientes com EB, a região do esfíncter inferior do esôfago poderá ser identificada na parte distal do órgão, que se apresenta um pouco mais alargada. Poderíamos então definir as hérnias do hiato diafragmático por deslizamento, as mais comuns, como bolsas delineadas por mucosa colunar de coloração laranja avermelhada, que se estendem desde o esfíncter inferior do esôfago até o pinçamento diafragmático, reconhecido à endoscopia como um estreitamento do lúmen que se fecha intermitentemente com os movimentos respiratórios (REID, 1991).

1.5.2.1- Cromoscopia no EB

Considerando-se as dificuldades encontradas para identificação endoscópica do epitélio colunar especializado, o recurso dos corantes tem permitido aos endoscopistas realizarem as biópsias nos locais mais adequados, evitando achados falso-positivos. São utilizados corantes aplicados diretamente na mucosa, por meio de cateteres introduzidos pelo canal de trabalho do aparelho, os quais são descritos a seguir:

- 1) Solução de lugol: a solução de lugol (corante vital) diluída entre 1,5 e 4%, quando em contato com a mucosa esofágica, tornará o epitélio escamoso de coloração marrom escura em poucos minutos, devido à reação entre o iodo e o glicogênio, presente em grande quantidade nessas células. Entretanto,

células inflamadas, displásicas ou mesmo já malignizadas, não serão coradas. A respeito desse método, WOOLF et al. (1989)⁴ estudaram 11 pacientes com diagnóstico de EB e 12 controles, para avaliar a acurácia do diagnóstico endoscópico realçada pela solução de lugol, comparada a dados histológicos como referência; a sensibilidade, a especificidade e a acurácia determinados pelo lugol no diagnóstico endoscópico do EB foram de 89%, 93% e 91%, respectivamente.

- 2) Azul de toluidina: o azul de toluidina (corante de absorção) cora os núcleos das células colunares, tanto as do tipo gástrico quanto intestinal. Antes de utilizá-lo, é necessário aplicar ácido acético a 1% para a lavagem do epitélio, e em seguida a solução aquosa de azul de toluidina a 1%, finalizando com nova lavagem de ácido acético a 1%. A sensibilidade é de 98% e a especificidade de 80% no diagnóstico de EB; o azul de toluidina cora as células da mucosa de tipo colunar de azul profundo, mas não discrimina o tipo de epitélio (CANTO, 1999).
- 3) Índigo carmim: o índigo carmim (corante de contraste), não é absorvido pelas células; STEVENS et al.(1994)⁵ descreveram as vantagens de sua utilização para o diagnóstico do EB na endoscopia com magnificação de imagem, procedimento ainda restrito a poucos serviços. A técnica consiste na aspersão da solução de índigo carmin a 1% sobre o epitélio colunar, após a junção escamocolunar ter sido identificada pela solução de lugol a 1,5%. Em seguida, as áreas prováveis de EB seriam examinadas com aparelhos endoscópicos que permitiriam a magnificação de imagem de 10 a 35 vezes. A visibilização de um epitélio de aspecto viliforme, parecido com a mucosa do intestino delgado, é interpretada como presença de epitélio colunar especializado, orientando então a realização das biópsias.

⁴ WOOLF, GM; RIDDELL, RH; IRVINE, EJ; HUNT, RH. (1989) *apud* CANTO, MI. Vital staining and Barrett's esophagus. **Gastrointest Endosc**, 49:S12-16, 1999.

⁵ STEVENS, PD; LIGHTDALE, CJ; GREEN, PHR. et al. (1994) *apud* CANTO, MI. Vital staining and Barrett's esophagus. **Gastrointest Endosc**, 49:S12-16, 1999.

4) Azul de metileno: o azul de metileno (corante vital), ativamente absorvido pelos epitélios dos intestinos delgado e grosso, cora também epitélios absorptivos metaplásicos, como a metaplasia intestinal gástrica, porém não promove a cromoscopia de epitélios não absorptivos como o epitélio escamoso do esôfago, o epitélio gástrico, e mesmo a metaplasia do epitélio gástrico no bulbo duodenal. Tem uma sensibilidade de 94% para a detecção de metaplasia intestinal gástrica, sendo utilizado nos pacientes com suspeita de câncer gástrico precoce, na doença celíaca do intestino delgado e também no cólon, na suspeita endoscópica de adenomas planos e mesmo de adenocarcinomas. O uso de azul de metileno envolve a aplicação prévia de agentes mucolíticos, seguido da aplicação do contraste e subsequente lavagem com água para retirada do excesso. A cromoscopia com azul de metileno no EB foi avaliada por CANTO et al (1996), em 14 pacientes portadores de EB e 12 indivíduos controle, demonstrando que essa substância cora o epitélio intestinal especializado do EB com grande acurácia e sem efeitos colaterais, sendo indicado para a realização de biópsias dirigidas, no seguimento dos pacientes com EB.

Em resumo, quanto ao uso de corantes, poder-se-ia concluir que o lugol delinea de maneira bastante clara os limites entre os epitélios escamoso e colunar, corando o primeiro de marrom escuro e o segundo permanecendo não corado pelo iodo. O azul de toluidina cora de azul o epitélio de tipo colunar, porém não faz distinção entre o epitélio gástrico e aquele com metaplasia intestinal do EB. O índigo carmim acentua o aspecto viliforme do epitélio intestinal especializado, porém para isto é necessária a utilização de aparelhos endoscópicos que propiciem a realização de magnificação de imagens. O azul de metileno parece ser o corante que apresenta a melhor acurácia para a cromoscopia seletiva do epitélio colunar especializado que objetivamente define o EB, e estaria relacionado à possibilidade de desenvolvimento de adenocarcinoma.

Apesar de todos os esforços e métodos aplicados para o diagnóstico endoscópico do EB, este somente seria comprovado mediante a realização de biópsias, preferencialmente utilizando-se pinças-jumbo nos quatro quadrantes do órgão, a cada 2 cm

do local onde o aspecto endoscópico sugere o início do epitélio colunar especializado, bem como pelo estudo anátomo-patológico dos espécimes retirados, cuja caracterização seria a superfície viliforme, com glândulas produtoras de muco e presença de células caliciformes coradas pelo azul de Alcian em pH 2,5.

1.5.3- Estudo manométrico e pHmetria de 24 hs.

Na maioria dos pacientes com EB, a pressão do esfíncter inferior do esôfago é menor do que nos portadores de DRGE isolada. Entretanto, essa característica não é exclusividade dos primeiros, variando de modo significativo em ambos os grupos de pacientes e mostrando uma considerável sobreposição de valores entre ambos. A pressão do esfíncter é menor nos indivíduos com extensas áreas de epitélio metaplásico quando comparada àqueles com o que, atualmente, se denomina de EB curto (pequenos segmentos de epitélio colunar especializado).(PHILLIPS e WONG,1991)

Anormalidades da função motora do esôfago têm sido observadas, tais como diminuição da amplitude das contrações, contrações repetitivas e mesmo aperistalse. Muitos pacientes têm função motora normal no corpo do órgão, porém as anormalidades detectadas à manometria são refletidas em distúrbios funcionais, entre os quais, episódios freqüentes de refluxo gastro-esofágico, aumento dos períodos de exposição noturna ao ácido e demora no clareamento fisiológico. Em indivíduos com EB, exposições prolongadas ao refluxo gastro-esofágico com pH inferior a 4,0, ocorrem tanto em decúbito quanto na posição ortostática. Uma razão para isso é a demora no clareamento de ácido, bastante evidente nesses pacientes, sendo sugerido que o período de exposição estaria relacionado à extensão do epitélio metaplásico. (PHILLIPS e WONG,1991)

O estudo manométrico tem importância clínica quando o esfíncter inferior do esôfago não pode ser evidenciado ao exame endoscópico, sendo fundamental para definir o local de retirada das biópsias endoscópicas. Além disso, permite a determinação da presença e da amplitude das ondas peristálticas possibilitando que, na realização da funduplicatura, sejam evitadas complicações tais como disfagia, em pacientes com função motora comprometida e(ou) portadores de esclerodermia. (PHILLIPS e WONG,1991).

A monitorização do pH de 24 horas também é importante no pré-operatório de cirurgias anti-refluxo, no sentido de quantificar a gravidade do refluxo gastro-esofágico, e mesmo no pós-operatório, caso os sintomas persistam, com o objetivo de estudar a eficácia do procedimento quanto à prevenção do refluxo (PHILLIPS e WONG,1991).

1.6- EPITÉLIO DE BARRETT E ADENOCARCINOMA

O EB é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento do adenocarcinoma de esôfago. Entretanto, não se pode falar em adenocarcinoma no EB, se não ficar esclarecido que o epitélio colunar especializado é o que apresenta potencial para que mudanças morfológicas ocorram, resultando em displasia, determinada pela maturação incompleta de um epitélio e acarretando alterações na morfologia celular e na arquitetura da mucosa (SCHMIDT et al.,1985)⁶.

Levando-se em consideração que ainda não se tem conhecimento do período de tempo necessário para que ocorra a transformação do EB em epitélio displásico, e daí para o desenvolvimento de adenocarcinoma, é aceito universalmente que se deve proceder ao seguimento endoscópico/histopatológico desses pacientes, na tentativa de detecção precoce da neoplasia maligna que pode vir a se manifestar (HAGGIT, 1992).

Atualmente, o seguimento proposto para os pacientes com EB é o que segue, segundo SAMPLINER (1998):

- a) Pacientes com EB sem displasia: endoscopia com biópsias a cada 2 ou 3 anos.
- b) Pacientes com EB e displasia de baixo grau: endoscopia com biópsias cada 6 meses no primeiro ano e a seguir anualmente.
- c) Pacientes com EB e displasia de alto grau: após confirmação do diagnóstico de displasia de alto grau por outro patologista, seguimento a cada 3 meses, se o paciente não tiver condições cirúrgicas.

⁶ SCHMIDT et al.(1985) *apud* MENKE-PLUYMERS, MBE. Risk factors for neoplastic progression in Barrett's mucosa. **European Journal of Surgical Oncology** 22:311-316, 1996.

O acompanhamento dos pacientes que desenvolveram displasia a partir do EB talvez seja o grande passo a ser dado. HAMEETEMAN et al. (1989)⁷, em estudo prospectivo, mostrou que cinco de oito pacientes que apresentaram displasia de alto grau em um primeiro exame, manifestaram adenocarcinoma durante um período de seguimento de cinco anos. O período de tempo necessário para que ocorresse a seqüência displasia-carcinoma variou entre 1,5 a 10 anos, segundo HAGGIT (1994), que entre 43 pacientes sem displasia no início do estudo observou que nove vieram a desenvolvê-la no decorrer do mesmo. Outro estudo, baseado no seguimento de 561 pacientes durante 10 anos, mostrou que 4 desenvolveram displasia de alto grau, sendo que dois desenvolveram câncer e outros dois mantiveram a displasia de alto grau. Um paciente desenvolveu adenocarcinoma sem ter tido o diagnóstico de displasia ao exame endoscópico/anátomo patológico (ROBERTSON et al., 1988).

Em outro estudo prospectivo, REID et al. (1992)⁸ demonstraram que a progressão desde o epitélio metaplásico benigno, passando para displasia de alto grau e daí para adenocarcinoma, em dois pacientes, levou 65 e 55 meses, respectivamente. O tempo médio para a progressão desde displasia de baixo grau até displasia de alto grau em sete pacientes, foi de 29 meses, com intervalo de 22 a 43 meses. A progressão da displasia de alto grau para adenocarcinoma em cinco pacientes, foi de 14 meses em média, com intervalo de 5 meses.

O adenocarcinoma de esôfago era pouco freqüente até a década de 70, mas a partir dessa época sua incidência aumentou cerca de cinco vezes (PERA et al., 1993). Trata-se de doença reconhecidamente letal, sendo a sobrevida dependente do estágio em que é feito o diagnóstico. Quando a lesão é intramucosa, a presença de metástases linfonodais encontra-se na faixa de 5% dos casos, porém quando já existe comprometimento da submucosa, o envolvimento de linfonodos atinge 24%, devido à rica

⁷ HAMEETEMAN et al. (1989) *apud* HAGGIT, RC. Barrett's esophagus dysplasia and adenocarcinoma. **Human Pathology** 25:982-992, 1994.

⁸ REID, BJ; BLOUNT, PL; RUBIN, CE. (1992) *apud* HAGGIT, RC. Barrett's esophagus dysplasia and adenocarcinoma. **Human Pathology** 25:982-992, 1994.

rede linfática presente na lâmina própria (HOLSCHER et al., 1995⁹). Nos pacientes que já se apresentam com disfagia e, ao exame endoscópico, é visibilizada lesão exofítica ocupando mais de 1/3 do lúmen do órgão, o prognóstico é bastante reservado, com sobrevida de 10% em 5 anos. Diante disso, o único meio de aumentar a sobrevida é diagnosticar a neoplasia em seu estágio mais precoce, quando ainda pode ser curável.

1.7- MARCADORES PARA PROGRESSÃO NEOPLÁSICA NO EB

A identificação de displasia no EB é, até o presente, o melhor método para se identificar os pacientes que possam estar desenvolvendo uma neoplasia, ou que estejam sob risco de serem acometidos pela doença (SAMPLINER, 1998). Entretanto, a capacidade de identificação do tecido displásico, é observador-dependente, muitas vezes não havendo concordância entre os patologistas. Diante disso, é necessário que sejam identificados métodos capazes de demonstrar precocemente o risco de progressão maligna nos pacientes com EB. Tais métodos foram analisados nas revisões de SPECHLER (1994) e MENKE-PLUYMERS (1996), e serão relacionados a seguir.

1.7.1- Anormalidades do ciclo e proliferação celular e da constituição cromossômica

O aumento da atividade proliferativa no EB tem sido demonstrada por meio de auto-radiografia, imunoistoquímica e análise do DNA celular pela citometria de fluxo. Estudos auto-radiográficos com timidina triciada constataram expansão da zona proliferativa do epitélio colunar nos pacientes com EB em áreas com displasia ou na presença de adenocarcinoma.

⁹ HÖLSCHER, AH; BOLLSCHWEILER, E; SCHNEIDER, PM; SIEWERT, JR. (1995) *apud* FALK, GH. Endoscopic surveillance of Barrett's esophagus: risk stratification and cancer risk. **Gastrointestinal Endoscopy** 49:S29-34, 1999.

Já os métodos imunoistoquímicos têm constatado haver aumento da fração proliferativa detectável por anticorpos monoclonais que reconhecem antígenos tipo Ki-67 e o antígeno de proliferação do núcleo celular. O índice de Ki-67 encontrado foi muito baixo nos epitélios de tipo juncional ou gástrico, moderado no epitélio do tipo intestinal, e muito alto nos casos de displasia ou adenocarcinoma. Índices elevados do antígeno de proliferação do núcleo celular também foram verificados em casos de adenocarcinoma e de displasia de alto grau, com valores inferiores em pacientes com displasia de baixo grau e no EB sem displasia.

Pela citometria de fluxo do conteúdo do DNA celular, foi possível demonstrar aumento da fase S e da fração G2 do ciclo celular, conforme fosse ocorrendo progressão no desenvolvimento do processo neoplásico. Pacientes nos quais os fragmentos retirados em um primeiro exame já mostrassem níveis elevados correspondentes às fases S ou G2, evidenciando aumento na atividade proliferativa, estariam sob maior risco para a progressão de displasia de alto grau para adenocarcinoma (REID, 1991).

Uma outra indicação de crescimento celular anormal corresponde às aneuploidias. A presença de diferentes populações de células aneuplóides associa-se a maior instabilidade genômica e ocorrência de displasia e adenocarcinoma no EB. A análise do conteúdo de DNA dos núcleos das células epiteliais, por meio de citometria de fluxo, produz informações objetivas sobre a ploidia e os eventos do ciclo celular em uma determinada população de células. Em várias séries, 90% das neoplasias sólidas passam por mudanças no genoma, produzindo picos de aneuploidia à citometria de fluxo (FRIEDLANDER et al., 1984¹⁰).

O estágio morfológico da carcinogênese no qual a aneuploidia se desenvolve não está ainda estabelecido, porém em lesões pré-cancerosas de variadas origens, a presença de células aneuplóides tem sido demonstrada. No EB, a aneuploidia ou o aumento da fração G2/tetraplóide, está associada não somente com o adenocarcinoma, mas também com a presença de displasia. Apesar de vários estudos demonstrarem que a prevalência de

¹⁰ FRIEDLANDER, ML; HEDLEY, DW; TAYLOR, IW. (1984) *apud* MENKE-PLUMMERS, MBE Risk factors for neoplastic progression in Barret's mucosa. **European Journal of Surgical Oncology**, 22:311-316, 1996.

células aneuplóides aumenta com a progressão de metaplasia para displasia e daí para adenocarcinoma, discordância entre os achados da citometria de fluxo e as alterações displásicas tem sido encontradas.

Aneuploidias podem ser encontradas com maior frequência do que displasia, sendo detectadas em epitélios que não apresentam essa alteração, ou ainda naqueles com displasia de baixo e alto grau. Estudos prospectivos têm indicado que aneuploidias e displasia são ambos fatores prognósticos para o desenvolvimento subsequente de adenocarcinoma em pacientes com EB (REID et al., 1992).

Quanto à presença de anomalias cromossômicas específicas entre as aneuploidias, são poucos os relatos sobre análise citogenética no EB e no adenocarcinoma que nele se desenvolve, mas descrevem cariótipos complexos e com múltiplas anomalias numéricas e estruturais. Segmentos extensos do EB podem conter clones citogeneticamente anormais durante vários anos e então progredir para displasia e daí para adenocarcinoma. A aberração cromossômica numérica mais comum em estudos citogenéticos do epitélio colunar displásico e com adenocarcinoma é a perda do cromossomo Y. Perdas dos cromossomos 4, 18 e 21 também são encontradas, assim como rearranjos estruturais envolvendo as regiões cromossômicas 1p, 3q, 11p e 22p.

Está bem demonstrado que o desenvolvimento de adenocarcinoma no EB é associado com a perda de alelos que incluem genes de supressão tumoral. A perda de alelos do cromossomo 17p ocorre em células diplóides como evento precoce, precedendo o desenvolvimento de aneuploidia, assim como outras perdas de alelos, durante a progressão da neoplasia. Fortes evidências sugerem que o alvo da perda dos alelos do cromossomo 17p é o gene de supressão tumoral p53, que se encontra ausente ou mutado em vários tumores do aparelho digestório. Perdas de alelos dos cromossomos 17p ou 5q são encontrados em populações de células aneuplóides de pacientes com EB que apresentam câncer ou displasia de alto grau. A perda do alelo do cromossomo 17p é encontrada em 92% dos adenocarcinomas que se desenvolvem do EB e a do 5q em 77% dos casos, sendo demonstrado que a perda do 17p precede a do 5q na progressão neoplásica do EB.

A instabilidade de microssatélites é uma outra forma de alteração genômica encontrada no EB e em pacientes com adenocarcinoma. Microssatélites são pequenas seqüências repetidas de nucleotídeos interpostas no genoma humano. Em certos tumores, erros no reparo do DNA podem ocorrer, determinando comprimentos alterados das seqüências de DNA nessas regiões. A instabilidade dos microssatélites pode se desenvolver como um evento precoce nas células metaplásicas e tumorais diplóides, antes que apareçam as aneuplóides. Secundariamente, alterações dos microssatélites têm sido evidenciadas em DNA aneuplóide, o que de certa forma sugere que essas anormalidades se acumulem simultaneamente com o desenvolvimento do processo neoplásico.

1.7.2- Genes de supressão tumoral

O *p53* é um componente da transdução celular que responde a danos no DNA celular, impedindo que o ciclo celular avance além de G1. Células que perdem o *p53* atingem a fase S de maneira inadequada e estariam predispostas à instabilidade genômica. Mutações do gene *p53* normalmente prolongam a vida média de seu produto, a proteína *p53*, cuja detecção é possível por meio de estudos imunoistoquímicos ou citometria de fluxo.

A identificação da proteína *p53* no adenocarcinoma de esôfago varia de 53% a 87%. RAMEL et al.(1992) demonstraram aumento progressivo da porcentagem de pacientes com acentuação da expressão do *p53* conforme o risco histológico de malignidade, tendo observado que somente 5% dos pacientes com EB sem alterações displásicas mostraram expressão da proteína *p53*, verificada em 15% dos indivíduos com displasia de baixo grau, 45% dos com displasia de alto grau e em 53% daqueles com adenocarcinoma.

A prevalência da expressão da proteína *p53* é maior nas populações de células aneuplóides, quando comparadas às populações de células diplóides com displasia de alto grau, ou ainda no adenocarcinoma do EB. FLEJOU et al.(1993) demonstraram que a expressão do *p53* estaria limitada aos adenocarcinomas e às displasias de alto grau,

sugerindo que sua expressão seria um evento tardio na transformação neoplásica do EB. Sua importância como marcador associado a risco elevado para desenvolvimento de adenocarcinoma em pacientes com EB ainda não está definitivamente comprovada, tendo em vista o fato de que nem todos os pacientes com aumento da expressão da proteína p53 no epitélio metaplásico desenvolverão neoplasia e ainda que, inversamente, um grupo de pacientes poderá desenvolver adenocarcinoma apesar de não ser demonstrada a coloração imunohistoquímica para a proteína p53.

A expressão do proto-oncogene c-erbB2, que codifica o receptor denominado transmembrana-tirosina-cinase, homólogo ao EGF-R, tem sido demonstrada na mucosa de Barrett e no adenocarcinoma que aí se desenvolve. Fragmentos de EB com displasia de alto grau, demonstraram aumento da expressão da proteína c-erbB2 na membrana celular.

Os oncogenes tipo Ras exercem importante papel no crescimento e na diferenciação celular. Mutações no oncogene H-ras estão fortemente associadas à mucosa de Barrett displásica ou com adenocarcinoma, porém não são encontradas no epitélio sem displasia. Entretanto, os resultados ainda são considerados insuficientes na determinação do real valor prognóstico, sendo sugeridas avaliações complementares em estudos prospectivos

1.7.3- Enzima mucosas

A descarboxilase de ornitina (ODC) é uma enzima chave na biossíntese das poliaminas e tem grande importância na proliferação e na diferenciação celular. No EB, a atividade da ODC está elevada em muitos casos de displasia, mas uma relação direta entre tal atividade e o conteúdo de poliaminas não pode ser demonstrado. Além disso, não é possível a distinção entre o epitélio colunar normal e o displásico, simplesmente pela mensuração do conteúdo de poliaminas.

1.7.4- Antígeno Carcinoembriogênico (CEA)

O antígeno carcinoembriogênico tem sido identificado como uma glicoproteína presente no intestino do feto, na mucosa colônica e em várias neoplasias, especialmente as do trato gastrointestinal. A expressão do CEA tem sido verificada no EB, porém não foi ainda demonstrada relação direta com o desenvolvimento de adenocarcinoma.

1.7.5- Fatores de regulação do crescimento celular

A mucosa do trato gastrointestinal sintetiza o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de transformação do crescimento (TGF- α), os quais se ligam aos receptores do fator de crescimento epidérmico(EGF-R) e podem atuar como fatores de crescimento autócrinos, parácrinos ou humorais, na regulação do crescimento e da diferenciação do trato gastrointestinal. Tem sido observado que a expressão dos fatores de crescimento e de seus receptores está relacionada ao grau de displasia, e também com a ocorrência de adenocarcinoma de esôfago. A co-expressão de EGF ou TGF- α e EGF-R está associada à regulação de crescimento autócrino das células esofágicas carcinomatosas. No EB displásico, o aumento da expressão de TGF- α e EGF-R são indicativos da possível regulação de crescimento por via autócrina. A expressão de TGF- α e de EGF-R mostrou-se baixa nos epitélios de tipo juncional e gástrico, e elevada no epitélio intestinal especializado, com displasia de alto grau, ou com adenocarcinoma.

1.7.6- Expressão de E-Cadherin

As caderinas formam uma família de glicoproteínas cálcio-dependentes envolvidas na adesão intercelular. A E-Cadherin parece ser o primeiro mediador na interação célula-célula das células epiteliais. Estudos tanto *in vivo* quanto *in vitro* sugerem que a baixa atividade da E-Cadherin favorece o processo de invasão e metastização dos tumores. Em geral, neoplasias esofágicas bem diferenciadas apresentam expressão preservada de E-Cadherin, enquanto os tumores indiferenciados mostram desorganização,

ou mesmo redução do padrão de coloração. O epitélio intestinal especializado, assim como o juncional e o tipo fúndico, tem a coloração da E-Cadherin preservada, o mesmo não ocorrendo nos casos de displasia. Portanto, alterações no padrão de coloração da E-Cadherin no EB podem sugerir que mudanças no mecanismo de adesão célula-célula correspondam a um evento precoce na gênese tumoral, porém o mecanismo de adesão celular não está completamente elucidado, assim como sua associação com a neoplasia não está totalmente esclarecida.

1.7.7- Mucinas

O estudo dos constituintes do muco do sistema digestório tem mostrado variações que poderiam ser utilizadas como fatores prognósticos em lesões consideradas como pré-neoplásicas.

As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular, contendo mais de 85% de carboidratos, produzidas pelas células epiteliais do trato gastrointestinal, exercendo papel de proteção sobre a mucosa intestinal. Histoquimicamente, são classificadas como ácidas ou neutras. As mucinas ácidas são subdivididas em sialomucinas e sulfomucinas, de acordo com a presença de ácido siálico ou grupos sulfato. As sialomucinas, por sua vez, são caracterizadas conforme a proporção existente de moléculas de N-acetil ou de O-acetil, derivadas do ácido siálico. As regiões produtoras de mucinas neutras são identificadas pela reação do PAS, enquanto o corante azul de Alcian identifica as ácidas, especialmente as sialomucinas, presentes nas células caliciformes (metaplásicas ou não), de acordo com o esquema apresentado na figura 1 (CHEJFEC et al., 1992):

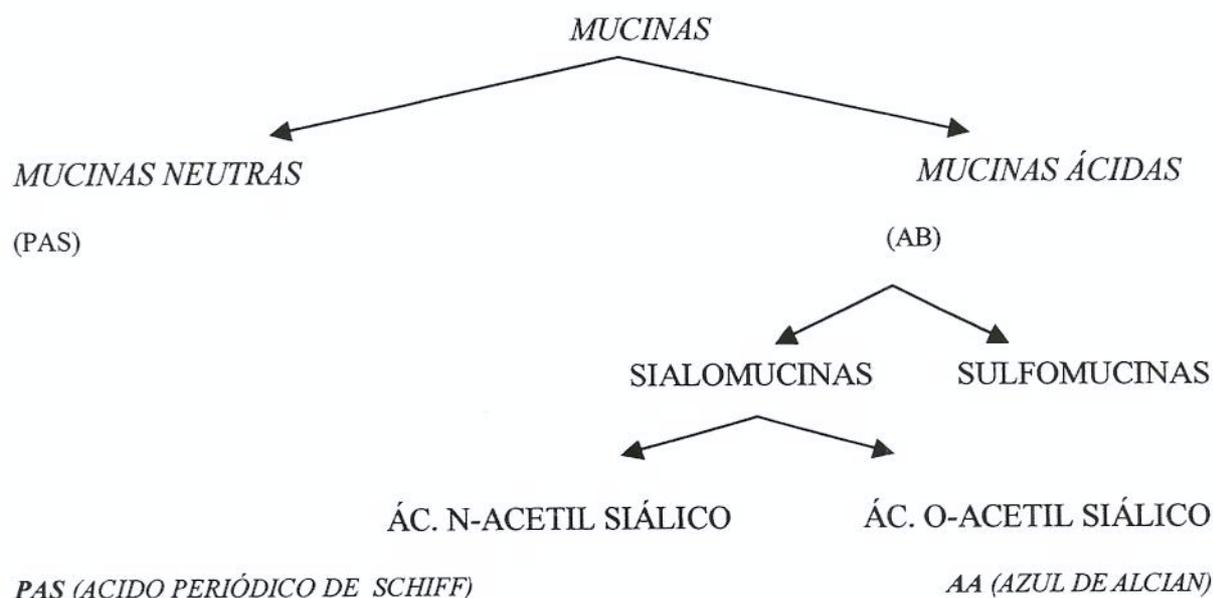


Figura 1- Métodos histoquímicos utilizados para identificação das mucinas (CHEJFEC et al., 1992)

Na metaplasia intestinal, de ocorrência freqüente no trato gastrointestinal, o epitélio original do órgão passa a expressar outros antígenos associados ao muco, devido à modificação de suas células. Técnicas imunoistoquímicas permitiram um maior detalhamento do estudo do muco, a partir da detecção da expressão de oligossacarídeos, ou carboidratos, ligados às mucinas, tanto no epitélio original como no metaplásico.

Extensamente estudada no estômago, a metaplasia intestinal pode ser classificada de forma simples, com base na identificação e na distribuição do muco nas células do epitélio metaplásico, segundo JASS et al. (1980):

Tipo I ou Completa: reproduz o epitélio do intestino delgado com células caliciformes positivas à coloração com o azul de Alcian, além de células absortivas positivas à reação do PAS na bordadura em escova.

Tipo II ou Incompleta IIa: mostra células caliciformes hipotróficas e azul de Alcian positivas, contendo quase exclusivamente ácido N-acetil-siálico. Tais células se dispõem entre as colunares ainda dispostas paralelamente, sem bordadura em escova e PAS positivas no terço superficial do citoplasma.

Tipo III ou Incompleta IIb: possuem células caliciformes azul de Alcian positivas e que contém ácido O-acetil-siálico, observadas entre células colunares em disposição mais densa, quase pseudo-estratificação. Estas últimas têm o terço apical do citoplasma positivo à reação do PAS e também contém sulfomucinas em condições normais. Este tipo de metaplasia é chamado por alguns autores de 'colônica'.

Os carcinomas gástricos estão associados à metaplasia intestinal do tipo III, com sulfomucinas sendo encontradas tanto nas células displásicas quanto nas neoplásicas, assim como no tecido adjacente. De maneira similar aos achados nos adenomas e carcinomas de cólon, as sialomucinas O-acetiladas estão ausentes (CHEJFEC et al., 1992).

No EB e nas neoplasias a ele associadas são encontradas sulfomucinas. Entretanto, foi demonstrado de maneira conclusiva não haver correlação estatística entre o diagnóstico histopatológico de displasia-carcinoma e a presença ou ausência de sulfomucinas (HAGGITT et al., 1988¹¹).

Estudos histoquímicos do EB demonstraram a presença de sialomucinas O-acetiladas nas metaplasias dos tipos I e IIb (III). Contudo, próximo às células malignas, apenas sulfomucinas estavam presentes, estando ausentes as sialomucinas orto-acetiladas (CHEFEC et al., 1992). Achados semelhantes foram encontrados na mucosa adjacente aos adenocarcinomas de cólon, que mostraram a presença marcante de sialomucinas N-acetiladas e redução tanto das sulfomucinas, quanto das sialomucinas O-acetiladas. Além disso, nos carcinomas gástricos e na mucosa metaplásica adjacente (tipo IIb ou III) ficou demonstrada a presença de sulfomucinas e praticamente a ausência de mucinas O-acetiladas (JASS, 1980).

¹¹ HAGGITT, RC; REID, BJ; RABINOVITCH, PS; RUBIN, CE. (1988) *apud* CHEJFEC, G; SCHNELL, T; SONTAG, S. Barrett's esophagus: A preneoplastic disorder. **American Journal of Clinical Pathology**, 98:5-7, 1992.

LAPERTOSA et al. (1992) demonstraram que o padrão secretório das mucinas no epitélio displásico/carcinomatoso que se desenvolve no EB é similar ao encontrado no carcinoma gástrico, sugerindo com esses achados que a diminuição e mesmo a ausência de enzimas O-acetiladas, estaria implicada na imaturidade celular.

CHEJFEC et al. (1992) afirmam que, independentemente do subtipo da metaplasia encontrada no Barrett, as sulfomucinas são encontradas na maioria dos casos, bem como nas neoplasias associadas. Na TEG, as alterações observadas são diferentes das encontradas nos demais locais do organismo. Aliás, o próprio epitélio expressa positividade para citoqueratina de forma diferente dos demais epitélios do trato gastrointestinal (GOLDBLUM, 2002).

O que ocorre no EB é a presença de metaplasia intestinal re-epitelizando um trecho ulcerado do esôfago terminal/transição esôfago-gástrica. Contudo, será uma metaplasia padrão, como as do estômago ou terá características próprias? As reações histoquímicas habituais nada acrescentam nesse sentido, mas por meio de reações imunoistoquímicas se espera avançar um pouco na interpretação dessa entidade tão discutida nos dias de hoje, se possível identificando marcadores prognósticos para as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas.

Conforme já mencionado, sendo glicoproteínas, as mucinas são compostas basicamente por uma cadeia proteica à qual cadeias laterais de oligossacarídeos heterogêneos estão unidos por ligações covalentes. Cada uma dessas cadeias laterais é conectada a resíduos de serina ou treonina pelo açúcar GalNAc. Tal processo, conhecido como glicosilação, determina a formação do chamado antígeno Tn. Uma vez sintetizado, o antígeno Tn pode ser novamente glicosilado pela adição de açúcares específicos, sob a ação da enzima glicosiltransferase. A adição do ácido siálico forma o antígeno sialosil-Tn, produto final que não sofre nova glicosilação. Ambos os antígenos são considerados 'antígenos associados a tumor' e seu acúmulo identificaria a glicosilação aberrante, um fenômeno associado ao câncer (ITZKOWITZ et al., 1990).

Tendo em vista o exposto, incluindo a constatação de que há controvérsia quanto à interpretação dos resultados relativos aos diversos marcadores para progressão neoplásica no EB, e ainda considerando que em revisão bibliográfica não foi encontrada referência à análise das sialomucinas (antígenos Tn e Stn) em indivíduos com tal alteração, achamos oportuno realizar este estudo (DUCHATELLE et al., 1989; ITZKOWITZ et al., 1990; DAVID et al., 1992; JASS et al., 1995).



2- OBJETIVOS

Os objetivos da presente pesquisa foram:

2.1- Avaliar, por meio de métodos imunistoquímicos, a presença dos antígenos Tn e Stn em cortes histológicos obtidos em dois grupos de doentes:

- Grupo I: Doentes com epitélio de Barrett.
- Grupo II: Doentes com epitélio de Barrett associado ao adenocarcinoma.

2.2- Comparar os resultados obtidos nestes grupos aos de indivíduos normais, sem DRGE.



3- CASUÍSTICA

Os pacientes selecionados para o presente estudo eram acompanhados no ambulatório de Moléstias do Aparelho Digestório do Hospital de Clínicas da UNICAMP, ou do Hospital e Maternidade Celso Pierro da PUC-Campinas, ou foram encaminhados aos respectivos Serviços para realização de exame endoscópico devido a queixas relacionadas à DRGE.

Foram incluídos 44 indivíduos, classificados em três grupos, segundo critérios clínicos, endoscópicos e histopatológicos apresentados a seguir:

- Grupo I – Doentes com EB (n=29): Foram selecionados 20 pacientes do sexo masculino e nove do sexo feminino, com média de idade de 56,1 anos, variando entre 37 e 70 anos, submetidos a exame endoscópico devido a sintomas da DRGE como queimação retroesternal e regurgitação de secreção ácida por período prolongado.

Ao exame endoscópico, apresentavam mucosa com características de EB (fig. 2), com extensão de pelo menos 2 cm., não necessitando, porém, ser circunferencial, tendo sido retirados fragmentos das áreas suspeitas, com laudo histopatológico confirmando o diagnóstico de epitélio intestinal especializado ao HE, comprovado pela coloração com o azul de Alcian em pH 2,5.

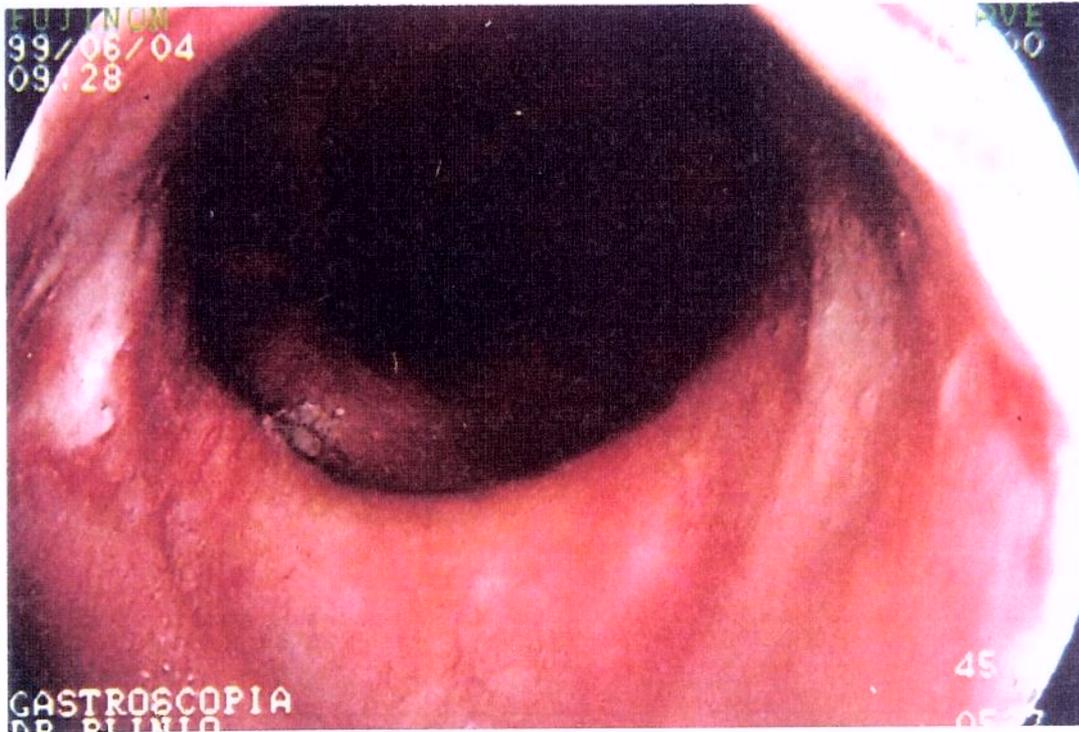


Figura 2- Esôfago com EB ao exame endoscópico

- Grupo II: Doentes com adenocarcinoma no epitélio de Barrett (n=7): composto de sete pacientes, todos do sexo masculino, com média de idade de 65,3 anos, variando entre 54 e 76 anos, submetidos ao exame endoscópico por sintomas relacionados à DRGE, sendo que três apresentavam sintomas como disfagia, odinofagia e emagrecimento significativo, com perda ponderal de aproximadamente 10 quilos nos três meses anteriores.

Desse grupo, cinco pacientes tinham EB comprovado histologicamente e faziam acompanhamento no ambulatório de moléstias do aparelho digestório. Os outros dois pacientes tiveram o diagnóstico de câncer feito no primeiro exame endoscópico, sendo que o endoscopista observou que a mucosa adjacente à lesão neoplásica, apresentava características de EB (fig 3), tendo sido esta impressão confirmada através da realização de biópsias da mucosa adjacente ao tumor.

Em todos os pacientes foi realizada cromoscopia, ou com lugol para delimitação entre os epitélios escamosos e cilíndrico, e(ou) com azul de metileno, para identificação do epitélio metaplásico cujas células do tipo absortivas se coram intensamente, exceção feita a um doente cuja lesão causava obstrução do lúmen do órgão, impedindo a progressão do aparelho. Vários fragmentos foram retirados (mínimo de seis) tanto da lesão neoplásica quanto do tecido circunjacente, colocados em frascos separados e enviados para estudo anátomo-patológico.



Figura 3- Adenocarcinoma no EB ao exame endoscópico, aonde se observa o epitélio metaplásico de forma circunferencial e a neoplasia que aí se desenvolveu.

- Grupo III - Indivíduos normais (n=8) : sendo cinco pacientes do sexo masculino e três do sexo feminino, com média de idade de 37,2 anos, variando entre 27 e 38 anos, selecionados entre indivíduos submetidos a endoscopia digestiva alta por sintomas dispépticos não relacionados à DRGE, com esôfago distal de aspecto normal à endoscopia e que, ao exame histológico, não apresentavam metaplasia intestinal (fig. 4).

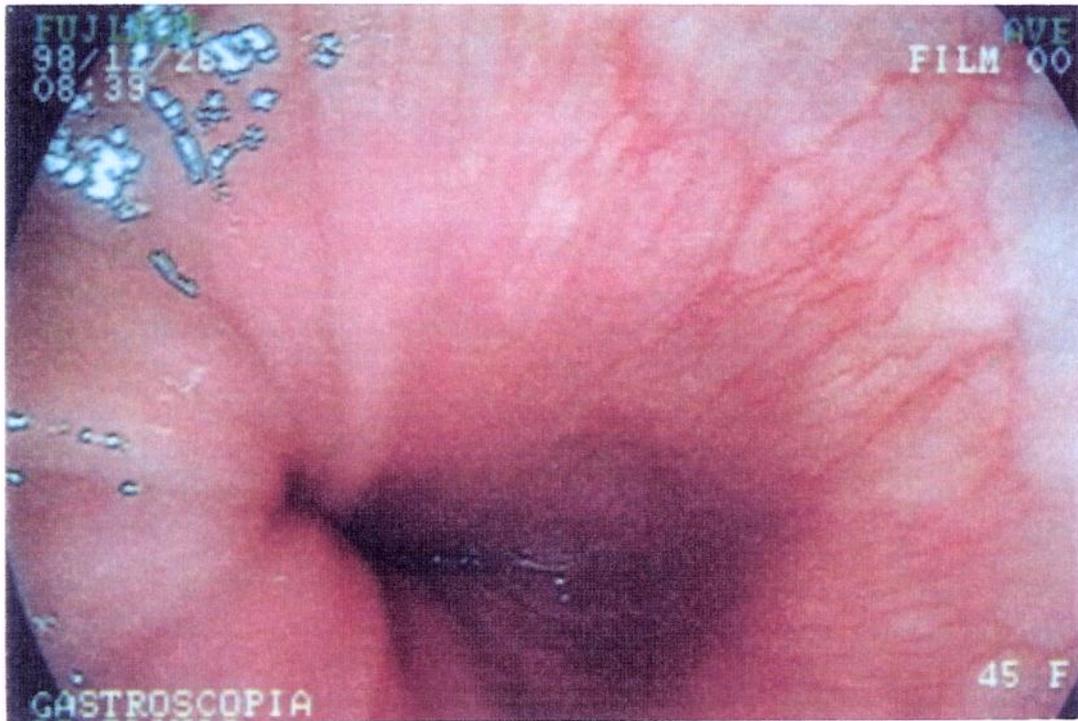


Figura 4- Esôfago distal normal ao exame endoscópico, com evidência dos vasos submucosos dispostos longitudinalmente.



4- METODOLOGIA

4.1- PADRONIZAÇÃO PARA OBTENÇÃO DAS BIÓPSIAS ENDOSCÓPICAS:

Apesar de a imagem endoscópica ser suficiente, na grande maioria das vezes, para que houvesse a suspeita de EB, mostrando, como já descrito anteriormente, uma coloração salmão semelhante a do epitélio gástrico, em todos os pacientes foi realizada cromoscopia, ou com lugol (fig. 5), que cora somente as células da mucosa esofágica (epitélio escamoso) que são ricas em grânulos de glicogênio, permanecendo a mucosa metaplásica não corada pelo iodo, ou com azul de metileno, corante que é absorvido pelo epitélio metaplásico, fazendo com que o mesmo adquira uma coloração azul de forte intensidade (fig. 6).

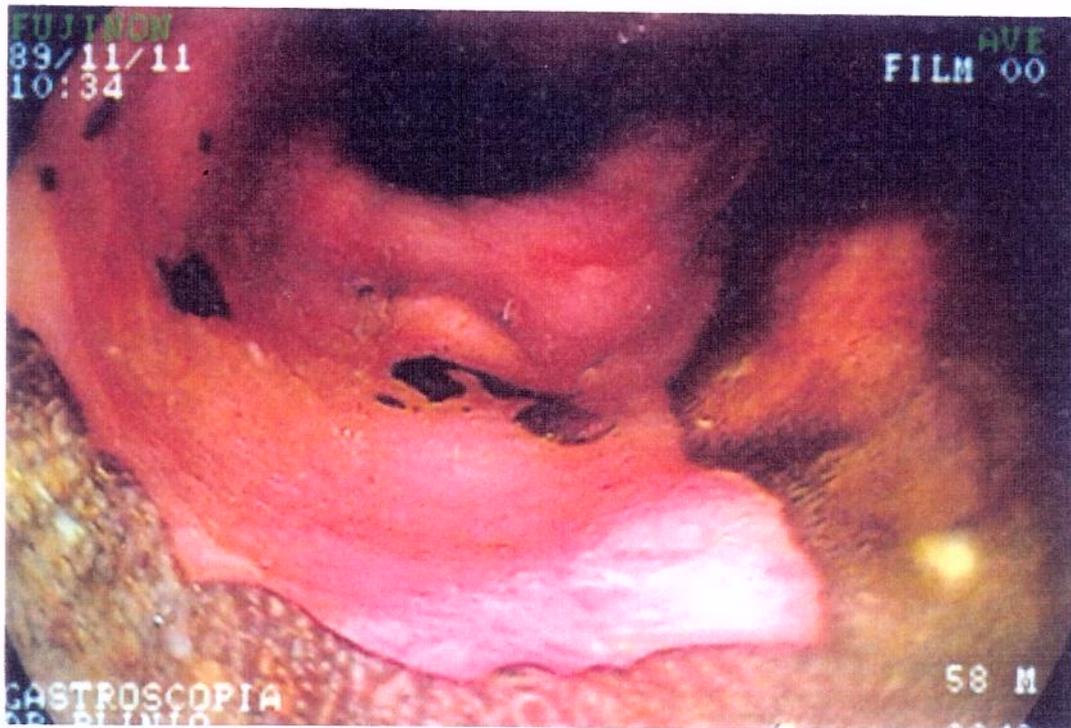


Figura 5: Esôfago com EB (cromoscopia com lugol), onde se identifica de maneira bem clara a transição dos epitélios, bem como as ilhotas de epitélio escamoso que se coram de marrom escuro pelo lugol.

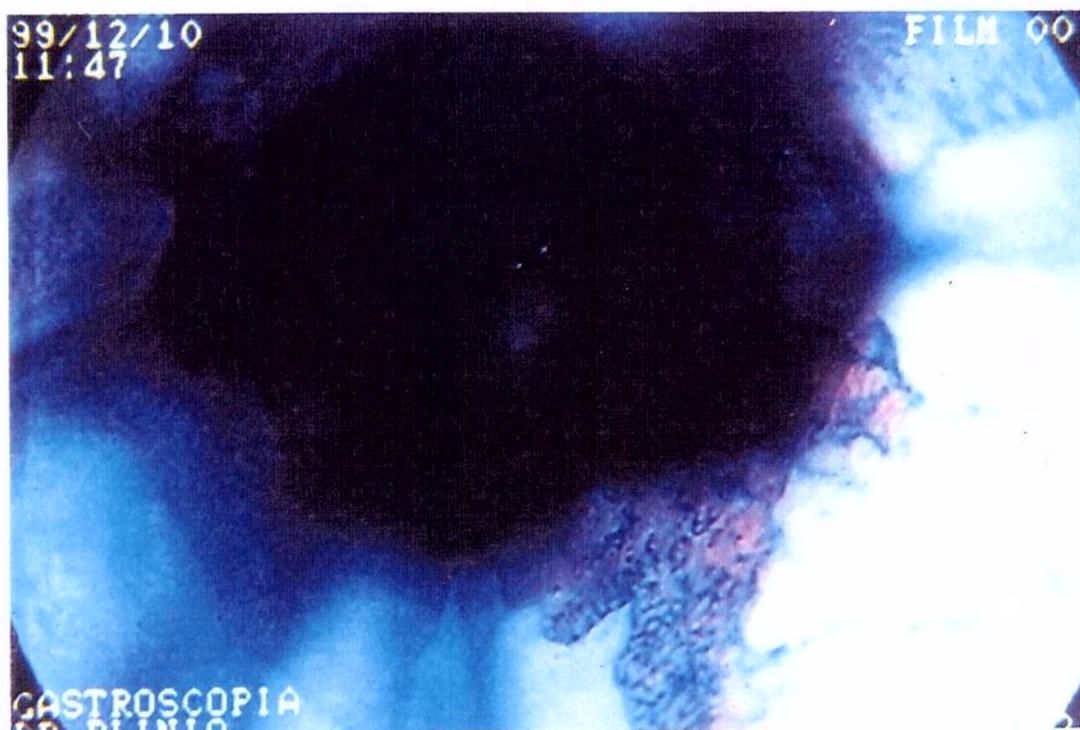
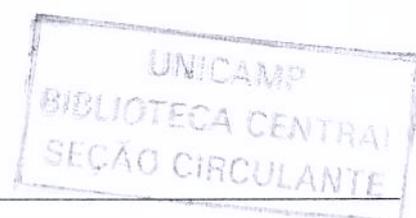


Figura 6: Esôfago com EB (cromoscopia com azul de metileno). Pode-se observar, no quadrante inferior direito, as células que se coraram intensamente pelo azul de metileno (epitélio metaplásico com células caliciformes).

Após a realização de cromoscopia foram realizadas biópsias, em número não inferior a 6 (seis), nos quatro quadrantes do órgão, a partir da margem mais distal do suposto epitélio metaplásico, a intervalos de 2,0cm, quando a extensão do mesmo assim o permitia. Quando o epitélio metaplásico não possuía extensão suficiente, eram retirados pelo menos quatro fragmentos.



4.2- ESTUDO HISTOPATOLÓGICO:

Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina e avaliados no Departamento de Anatomia Patológica da FCM-Unicamp. Todas as lâminas também foram coradas com o azul de Alcian, em pH 2,5 para confirmação da presença de células caliciformes e conseqüentemente do EB. (fig. 7)

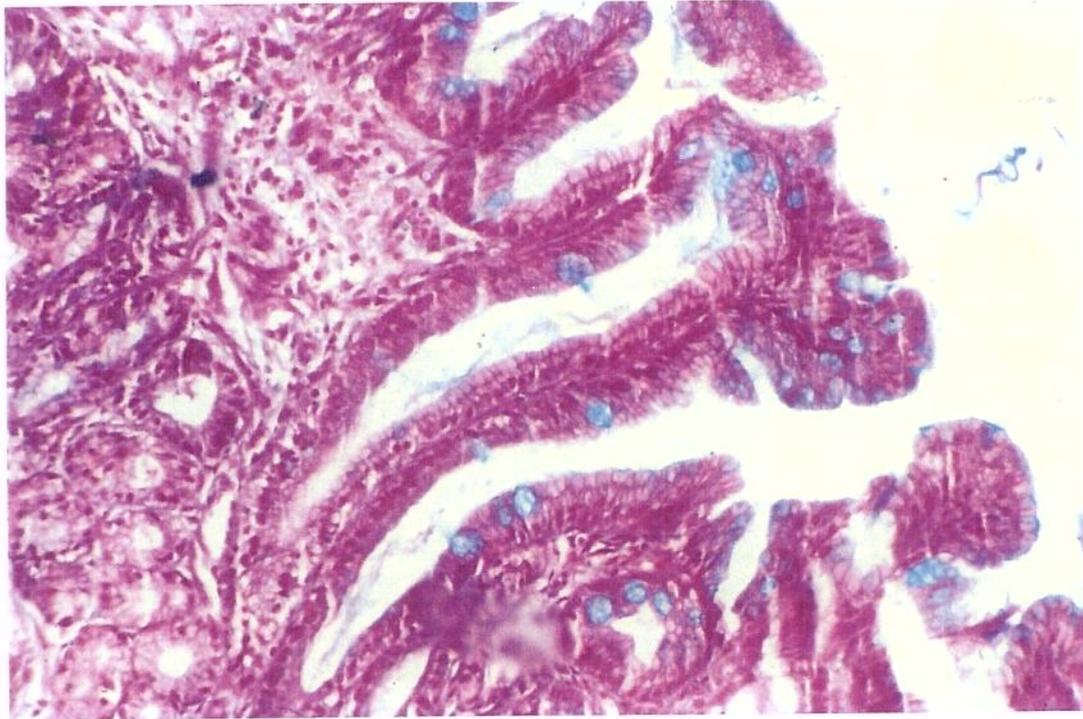


Figura 7: Esôfago com EB (corte histológico corado com azul de Alcian) (x 10). Observar que as células caliciformes se coram de azul.

4.3- ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

Os estudos foram realizados no Laboratório de Patologia Experimental do CAISM-UNICAMP (Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher). A reação imunoistoquímica foi realizada seguindo as etapas descritas a seguir:

REAÇÃO DE ROTINA PARA IMUNOPEROXIDASE

1ª ETAPA: Desparafinização

- 1) Coloca-se o xilol I em estufa a 110°C por cerca de 30 minutos; realizadas várias lavagens.
- 2) Xilol II e III em temperatura ambiente; realizadas várias lavagens.
- 3) Álcool absoluto I, II, III em temperatura ambiente; realizadas várias lavagens.
- 4) Lavagem em água corrente e destilada
- 5) Bloqueio da peroxidase endógena: 3 trocas de 5 minutos cada, com H₂O₂ a 10%
- 6) Lavagem em água corrente e destilada.
- 7) Recuperação antigênica: 30 minutos: feita em panela a vapor por 30min., a 95°C com tampão citrato 10mM pH6,0. Deixar esfriar por 15min.
- 8) Pingar os anticorpos primários específicos (diluídos em soro albumina bovina).
- 9) Incubar em câmara úmida durante 30 min., a 37°C.
- 10) Colocar em geladeira por uma noite.

2ª ETAPA: Coloração

- 11) Retirar as lâminas da incubação com o anticorpo primário e fazer 3 lavagens, no agitador, em PBS de 5min. cada, em temperatura ambiente.
- 12) Secar com papel de filtro e pingar os anticorpos secundários especificados abaixo, seguido de incubação por uma hora na estufa a 37°C.
- 13) Anticorpo policlonal e monoclonal – Anticorpo secundário Envision.
- 14) Terminado o tempo de incubação, fazer três lavagens, no agitador, em PBS de 5min. cada, em temperatura ambiente.
- 15) Colocar as lâminas em 100ml de tampão fosfato de sódio (PBS) e preparar 60 mg de diaminobenzidina (DAB). Deixar o PBS pré aquecido a 37°C; dissolver DAB, acrescentando 500µl de H₂O₂ a 30% e 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Misturar a solução e corar as lâminas por 5 min., a 37°C.
- 16) Lavar em água corrente e passar em água destilada.
- 17) Contra-corar com Hematoxilina de Mayer por 30 a 60 seg. de acordo com sua concentração e lavar novamente.
- 18) Passar por alguns segundos em água amoniacal e após em água corrente e destilada.
- 19) Desidratar e montar.

Obs.: Todas as séries incluíram controles positivos.

4.4- ANÁLISE FINAL DAS LÂMINAS

Uma vez preparadas todas as lâminas nas colorações HE, PAS e Azul de Alcian e após aplicação das técnicas imunoistoquímicas, as mesmas foram revisadas e analisadas pela Prof. Dra. Miriam A. S. Trevisan.



5- RESULTADOS

5.1- GRUPO I - DOENTES COM EB

Nos 29 doentes com EB, foi observada diferença na expressão das mucinas das células caliciformes. Em todos houve positividade para Stn (fig.8) e em 14 houve positividade concomitante para Tn (fig. 9). As células colunares foram muito constantes nas reações e com expressão exatamente igual a das células colunares da TEG, isto é, todas positivas para Tn (fig. 9) e negativas para Stn. Tais achados estão discriminados na tabela 1 e representados no gráfico 1.

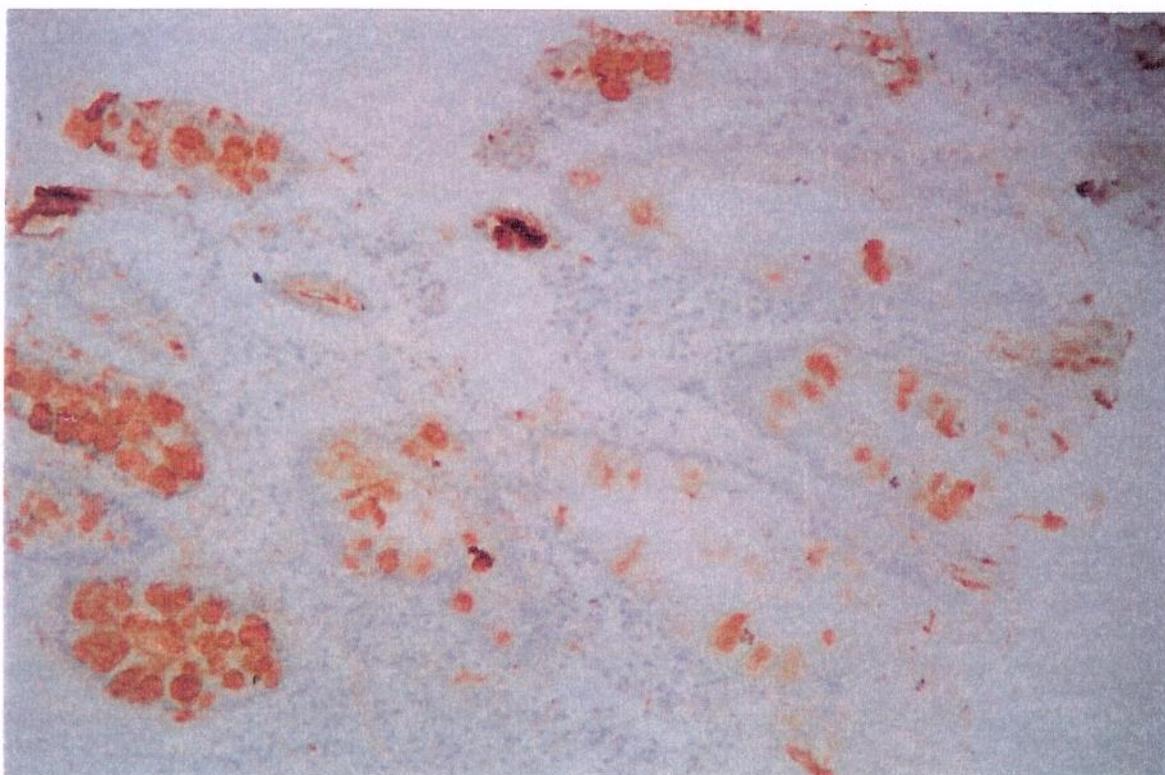


Figura 8: Esôfago com EB (coloração imunoistoquímica específica para antígeno Stn) (x 40). As células arredondadas, de tamanhos variados, correspondem às células caliciformes positivas para o antígeno Stn.

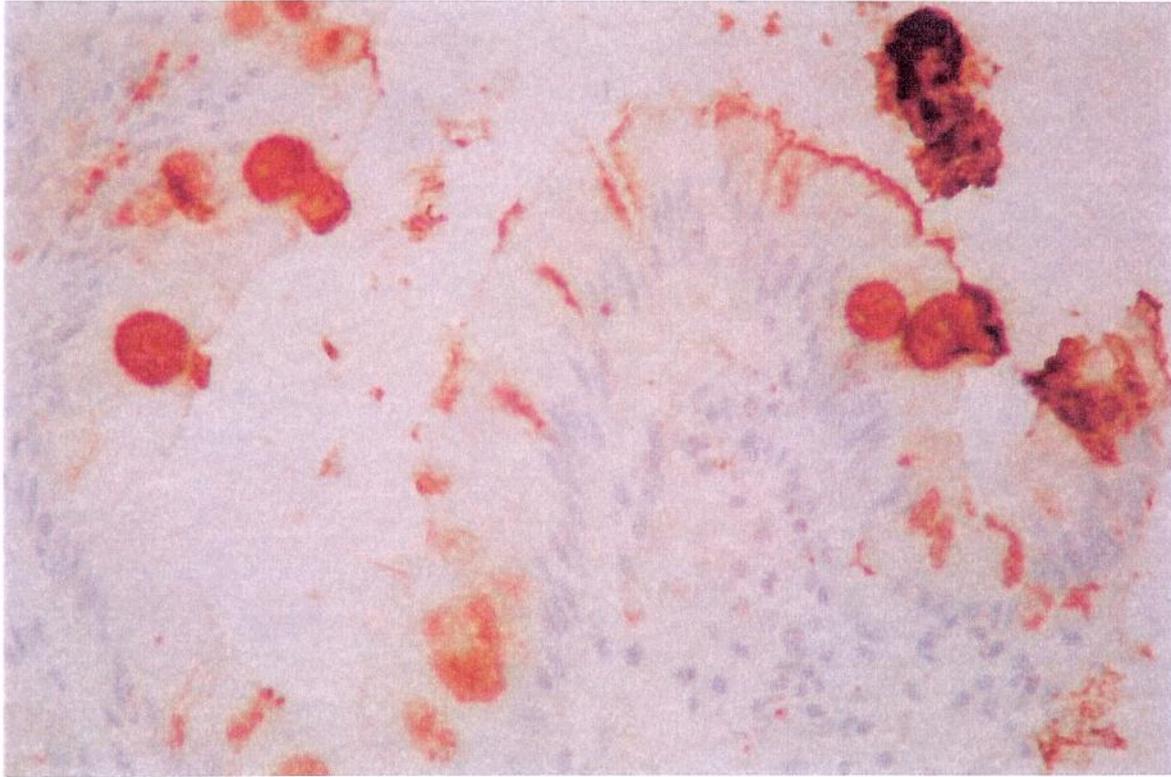


Figura 9: Esôfago com EB (coloração imunoistoquímica específica para antígeno Tn) (x 40). A positividade ao antígeno Tn se faz presente na parte apical das células colunares e também nas células caliciformes (48% dos casos).

Tabela 1- Positividade dos antígenos Stn e Tn nas células caliciformes e colunares, nos portadores de EB

	Células caliciformes	Células colunares
Stn	29/29 - (100%)	0/29 - (0%)
Tn	14/29 - (48,2%)	29/29 - (100%)

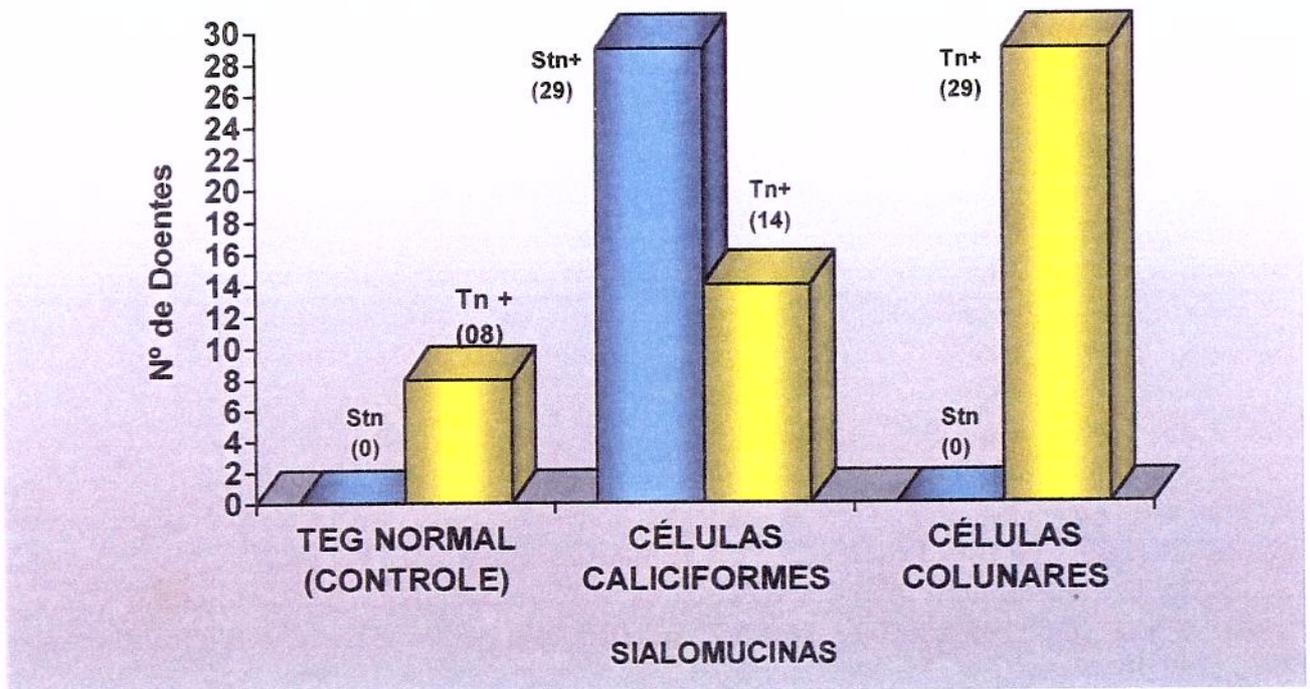


Gráfico 1- Grupo Controle e Epitélio de Barrett.

A reação do PAS nas células colunares dos doentes com EB demonstrou a presença de mucinas neutras em 17 casos, com distribuição semelhante a do tipo II da metaplasia intestinal, segundo JASS et al. (1980). Em quatro casos foi semelhante ao foveolar gástrico e, em nove, o padrão foi misto, com bordadura em escova, epitélio tipo foveolar e metaplasia intestinal tipo II.

5.2- PACIENTES COM EPITÉLIO DE BARRETT E ADENOCARCINOMA

Os sete casos de adenocarcinoma originados no EB mostraram positividade citoplasmática difusa e de membrana ao Stn e ao Tn. Um deles mostrou uma porção superficial vilosa mais diferenciada, na qual a reação para Stn foi negativa, porém na profundidade, a positividade foi nítida (gráfico 2).

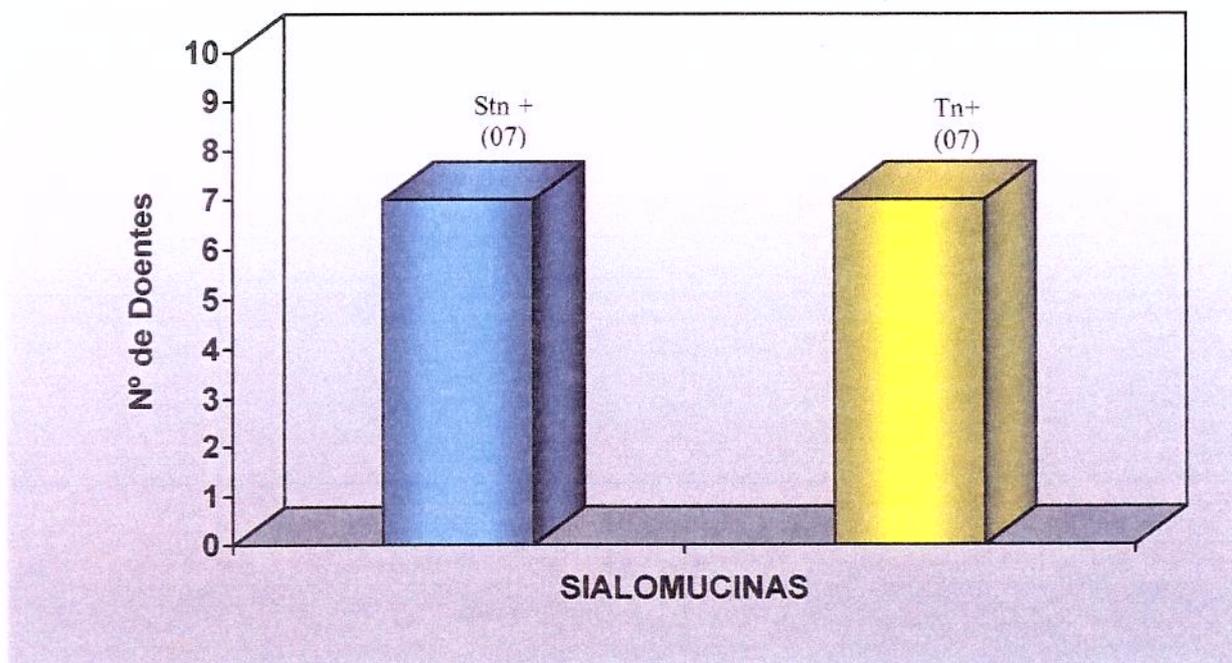


Gráfico 2- Ocorreu positividade tanto para o Stn quanto para o Tn nos pacientes com epitélio de Barrett que desenvolveram adenocarcinoma (7 pacientes).

5.3- INDIVÍDUOS NORMAIS

Nos oito indivíduos com TEG normal, as células colunares foram consistentemente negativas para Stn e positivas para Tn, sendo que nestas últimas foi verificada a presença de grânulos supranucleares.



6- DISCUSSÃO

6.1- EPITÉLIO DE BARRETT E ADENOCARCINOMA

Nos doentes com EB, estima-se que a incidência de adenocarcinoma seja de 30 a 125 vezes maior do que na população geral, com uma incidência de 0,2 a 2,1% ao ano, ou de 1:52 a 1:441 pacientes novos por ano de seguimento. Em tais casos, o risco de degeneração maligna parece estar relacionado à maior extensão do epitélio metaplásico, não significando, porém, que os pacientes com segmentos curtos de EB também não estejam sob risco de desenvolverem neoplasia (FALK, 1994; DREWITZ et al., 1997).

No trabalho de NAEF et al. (1975)¹², em 1225 indivíduos submetidos à endoscopia por sintomas de esofagite péptica, foram encontrados 140 pacientes com EB, entre os quais 12 já eram portadores de adenocarcinoma de esôfago, com uma prevalência de 8,6%. Esses dados estão de acordo com várias outras séries de pacientes estudados, que estimam a prevalência de adenocarcinoma em 7,8%, variando de 0 a 14,8% (PEUCHMAUR et al., 1984; REID, 1991).

Entretanto, outros estudos apontam possíveis desvios de averiguação, levando a sub ou superestimativas da prevalência de adenocarcinoma no EB. Uma das razões para isso seria o fato de que somente o epitélio intestinal especializado está associado ao risco de os pacientes adquirirem câncer. Assim, em uma classificação equivocada, incluindo como portadores de EB indivíduos que ao exame histológico apresentassem epitélio de tipo fúndico ou cárdico, certamente haveria uma baixa prevalência de adenocarcinoma. O estudo de SPECHLER et al. (1984) mostrou uma prevalência de 7% de adenocarcinoma de esôfago, ou oito em 115 pacientes, sendo que somente 77 desses 115 eram portadores de epitélio intestinal especializado, e todos os adenocarcinomas foram detectados nesses indivíduos, levando a uma prevalência de 10,4% (8 em 77 pacientes), e não de 7%. O adenocarcinoma que se desenvolve no EB também pode ser subestimado se, por falta de critérios objetivos, adenocarcinomas que envolvam os 10 cm distais do esôfago forem classificados como de origem gástrica. Por outro lado, superestimativas podem ocorrer, uma vez que pacientes com câncer, manifestam sintomas que os levam a procurar auxílio

¹² NAEF, AP; SAVARY, M; OZZELO, L.. (1975) *apud* REID, BJ. Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. **Gastroenterology Clinics of North America**, 102:1212-1219, 1991.

médico com indicação de exame endoscópico. Em um estudo prospectivo, SCHNELL et al. (1985)¹³ estimaram a prevalência de adenocarcinoma de esôfago em pacientes com EB que não manifestavam sintomas de câncer, mas somente sintomas relacionados com DRGE como regurgitação, queimação retroesternal ou que faziam uso freqüente de antiácidos, tendo verificado a presença de adenocarcinoma em dois entre 54 pacientes, com uma prevalência de 3,7%, portanto.

A incidência real de adenocarcinoma em doentes com EB é mais difícil de ser determinada, embora vários estudos demonstrem que a freqüência de adenocarcinoma esofágico e da cárdia tem aumentado nos Estados Unidos nas últimas duas décadas, mais que qualquer outro tipo de câncer.(BLOT et al. 1991)

Estudos retrospectivos demonstraram que a incidência de adenocarcinoma no EB variou de 1:55 a 1:441 (Tabela 2), enquanto em estudos prospectivos, foi de 1:52 a 1:208 (Tabela 3). Como pode ser verificado na tabela 2, houve grande variação com valores desde 1:55 até incidências tão baixas quanto 1:441 pacientes por ano de seguimento, justificadas por diversas razões, relacionadas a seguir:

- a) Os estudos muitas vezes incluíram pacientes que tinham somente epitélio ou de tipo fúndico ou cárdico, ou seja, que não teriam risco aumentado de desenvolverem adenocarcinoma.
- b) A maioria corresponde a estudos retrospectivos,
- c) Os trabalhos relacionados foram realizados em serviços de referência para o estudo de adenocarcinoma se desenvolvendo no EB, com maior probabilidade de receberem pacientes com suspeita de displasia do que em hospitais/serviços gerais.

Sendo assim, para a obtenção de dados mais fiéis com relação à incidência de adenocarcinoma nos pacientes com EB, seria mais adequada a realização de estudos prospectivos em um número maior de pacientes com biópsias endoscópicas do epitélio colunar especializado, que por ocasião da inclusão para análise ainda não sejam portadores de adenocarcinoma de esôfago.(REID, 1991).

¹³ SCHNELL, T. et al. (1985) *apud* REID, B.J. Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. **Gastroenterology Clinics of North America**, 102:1212-1219, 1991.

É de grande importância que seja estabelecida a incidência de câncer no EB, também para que se possa definir o tipo de seguimento a ser adotado, uma vez que os custos envolvidos são elevados, havendo uma estimativa de U\$ 62.000 e perda de 78 dias de trabalho, para cada caso de câncer diagnosticado, segundo o estudo de ACHKAR e CAREY (1988), revisto por SEABROOK et al. (1992).

Tabela 2- Incidência de adenocarcinoma em EB - Estudos retrospectivos. (SEABROOK et al., 1992; DREWITZ et al., 1997).

Referência	n	Incidência	Seguimento*	Incidência†
OVASKA et al.	32	3	166	1:55
WILLIAMSON et al	176	5	487	1:99
ACHKAR e CAREY	62	1	166	1:166
VAN DER VEEN et al.	166	4	681	1:170
SPECHLER et al.	105	2	350	1:175
CAMERON et al.	104	2	882	1:441
TOTAL	645	17	2732	1:161

* Em meses

† Em anos de seguimento

Tabela 3- Incidência de adenocarcinoma em EB - Estudos prospectivos. (DREWITZ et al., 1997).

Referência	n	Metaplasia intestinal	Incid.	Seguimento*	Incidência†
HAMMEETEMAN et al.	50	68	5	260	1:52
BONELLI et al.	71	100	2	110	1:55
ROBERTSON et al.	56	89	4	224	1:56
MIROS et al.	81	78	3	289	1:96
IFTIKHAR et al.	102	ND	4	462	1:115
DREWITZ et al.	170	100	4	834	1:208
TOTAL	530		21	2179	1:104

Dados epidemiológicos sugerem que, a despeito do aumento da incidência do adenocarcinoma de esôfago, a maioria dos indivíduos com EB não desenvolverão neoplasia, o que coloca em cheque os atuais protocolos de seguimento (FALK, 1999), que recomendam um exame endoscópico com biópsia dos quatro quadrantes do órgão a cada 2,0 cm da mucosa com aspecto metaplásico à macroscopia, a cada dois anos para os pacientes sem evidência histológica de displasia e a cada 6 a 12 meses para pacientes com displasia de baixo grau. E, naqueles pacientes com displasia de alto grau, o diagnóstico deve ser confirmado por pelo menos mais um patologista experiente, assim como indicada a ressecção cirúrgica do órgão, ou a realização de exame endoscópico com biópsias a cada 3 meses, na tentativa de diagnosticar uma eventual neoplasia o mais precocemente possível (SAMPLINER, 1998).

* Em meses

† Em anos de seguimento

6.2- ESTUDO DO MUCO

UMPLEBY et al. (1985) demonstraram que uma das características importantes dos tumores de cólon seria a sua capacidade de produção de muco, que estaria relacionada, inclusive, com o comportamento biológico da neoplasia, sendo que por muitos anos, os carcinomas mucinosos, que representam de 15 a 20% dos carcinomas colo-retais, foram considerados os de pior prognóstico, apresentando altas taxas de recorrência e baixas de sobrevida, principalmente quando o componente mucinoso do tumor ocupava mais de 60% do volume do mesmo. Entretanto, estudos mais recentes não observaram diferenças estatísticas no seguimento dos tumores colo-retais mucinosos e não mucinosos, demonstrando que o grupo controle composto de carcinomas 'não mucinosos' era constituído de adenocarcinomas, muitos dos quais produtores de muco (HALVORSEN e SEIM, 1988).

Seria, portanto, pouco confiável basear-se somente na quantidade de muco produzido pelo tumor, para que avaliações quanto ao seguimento clínico pudessem ser feitas, sendo que diferenças importantes quanto ao prognóstico poderiam estar relacionadas a mudanças na qualidade do muco produzido pelo mesmo. Com o objetivo de investigar esta possibilidade ITZKOWITZ et al.(1990) estudaram as interrelações entre o prognóstico do câncer colo-retal e a expressão do antígeno sialosyl-Tn, utilizando anticorpos monoclonais, por meio de reações imuno-histoquímicas.

Além do antígeno sialosyl-Tn, analisaram também a expressão de outros dois antígenos, denominados Tn e T, demonstrando que o Tn e o Stn são altamente específicos e sensíveis em tumores do cólon. O Stn não é expresso na mucosa colo-retal normal, mas é demonstrado na maioria dos cânceres primários que venham a se desenvolver nessa mucosa. É uma variável que não depende do sexo, idade, ploidia do tumor, localização, estágio de Dukes, profundidade da invasão, ou ainda do tipo histológico, estando presente sempre nos casos de pior evolução, além de ser útil no diagnóstico, pois foi verificado em quase 80% dos casos. Relatam, também, que a associação da expressão com o pior prognóstico depende da presença do ácido siálico juntamente com o antígeno Stn.

Os resultados obtidos por ITZKOWITZ et al. (1990) indicam que a expressão de sialosyl-Tn pelas células do câncer colo-retal está fortemente associada com o prognóstico e que o grupo de doentes que não expressaram o antígeno tiveram 100% de sobrevida em cinco anos, enquanto os doentes Stn positivos somente 73%.de sobrevida.

Também DAVID et al.(1992) estudaram a expressão dos antígenos Tn, sialosyl-Tn e T, através de estudos imunoistoquímicos, utilizando anticorpos monoclonais específicos na mucosa de aspecto normal adjacente aos carcinomas gástricos (n=58), nos tumores primários (n=87), e nas metástases (linfonodais (329) e hepáticas(02)). Observaram que na mucosa de aspecto normal ocorreu expressão de Tn em todos os casos, de sialosyl-Tn em oito casos, não tendo ocorrido expressão do antígeno T. Na metaplasia intestinal da mucosa gástrica, as células caliciformes foram positivas em sua totalidade para o Stn e as células colunares apresentaram positividade granular supra nuclear para o Tn, e também para o Stn, na metade dos casos. Nas neoplasias, ambos passam a ter positividade difusa no citoplasma.

Na presente casuística de EB, as células colunares foram positivas para o Tn e negativas para o Stn nos 29 casos, da mesma forma como se comporta o epitélio normal da transição esôfago gástrica e, como foi demonstrado em células colunares de diversos epitélios, segundo dados da literatura. Já as células caliciformes foram positivas para o Stn nos 29 casos, e para o Tn em 14. Coincidentemente, em quatro dos sete casos de câncer, pôde-se estudar também a mucosa não neoplásica adjacente, e o que se observou foi a positividade concomitante para Stn e Tn nas células caliciformes, em dois desses quatro casos.

Como o Tn é encontrado em adenocarcinomas produtores de muco, deve-se procurar interpretar a presença de células caliciformes Tn positivas. Elas poderiam representar uma transformação da célula colunar em célula caliciforme, com a manutenção dos antígenos originais da célula colunar? Esta hipótese estaria de acordo com as explicações de DUCHATELLE et al.(1989), que refere a existência de uma possível "mucosa cárdica modificada", constituída por células "ball shaped", que contém muco positivo para PAS-AB, sulfomucina e anti-LIMA "large intestin mucus antigen", e que seria um epitélio intermediário entre a mucosa cárdica normal e a com metaplasia intestinal.

Por outro lado, JASS et al. (1995) demonstraram a presença de Tn em células caliciformes do cólon, após a utilização da neuroaminidase, para desmascaramento do antígeno. Porém, em nosso material, esse procedimento não foi realizado. Por isso considerou-se a possibilidade de ter-se detectado a expressão de outra mucina com sua produção desregulada (super regulada). Outra hipótese é a de que a mucina habitual possa ter perdido parte da cadeia de oligossacarídeos no processo de regeneração da mucosa, tornando-se novamente positiva para o Tn.

De qualquer forma, células caliciformes positivas ao mesmo tempo para Tn e Stn foram encontradas em metade dos doentes da presente casuística, e podem estar sinalizando, os casos que efetivamente necessitam seguimento

Nos dados de literatura consultados (DUCHATELLE et al., 1989; ITZKOWITZ et al., 1990; DAVID et al., 1992; JASS et al., 1995), notou-se ser variada a experiência dos autores com relação à positividade desses anticorpos em mucosa normal, e com alterações não-neoplásicas, como a metaplasia intestinal. Comparando os trabalhos referidos, o que foi observado, é que não são utilizados os mesmos anticorpos monoclonais. Portanto os dados não podem ser pareados. Também as correlações com reações histoquímicas são restritas, cada qual abordando apenas um pequeno segmento do problema.

Para se entender o que realmente ocorre no EB seria necessário um estudo bem mais amplo do muco e de outras alterações celulares próprias da transição esôfago-gástrica, possibilitando uma visão global do processo.

Resumindo, tendo em vista os conhecimentos atuais, o grupo de 14 doentes com positividade para Tn merece seguimento a médio e a longo prazo, com EDA e biópsias do EB, pois seriam os com maior possibilidade de desenvolvimento de neoplasia. Em um futuro próximo, a pesquisa das sialomucinas poderá ser rotineiramente utilizada, desde que outros estudos com maior número de doentes, confirmem sua importância como fator prognóstico para desenvolvimento de adenocarcinoma no EB.



7- CONCLUSÕES

As conclusões deste trabalho foram:

- 1- No grupo de doentes portadores de EB, o antígeno Tn foi positivo em todos os casos (100%) nas células colunares, e em 14 casos (48%) nas células caliciformes.
- 2- No grupo de doentes com EB, o antígeno Stn foi negativo em todos os casos nas células colunares e positivo em todos os casos (100%) nas células caliciformes.
- 3- Nos doentes com adenocarcinoma associado ao EB, houve positividade para os antígenos Tn e Stn, em todos os casos (100%).
- 4- No grupo de indivíduos normais, houve positividade para o antígeno Tn em todos os casos (100%) e negatividade para o antígeno Stn também em todos os casos.
- 5- Assim considerando, o grupo de 14 doentes em que ocorreu positividade do Tn nas células caliciformes, à semelhança do que foi encontrado quanto à positividade do mesmo antígeno nos portadores de adenocarcinoma, poderia sugerir maior suscetibilidade para a ocorrência futura de câncer.



8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHKAR, E; CAREY, W. The cost of surveillance for adenocarcinoma complicating Barrett's esophagus. **Am J Gastroenterol**, 83: 291-294, 1988.
- ANDREOLLO, NA; MICHELINO, UM; BRANDALISE, NA; LOPES, LR; TREVISAN, MAS; LEONARDI, LS. Incidência e Epidemiologia do Epitélio de Barrett no Gastrocentro – Unicamp. **Arq Gastroenterol**, 34: 22-26, 1997..
- BARRETT, NR. Chronic peptic ulcer of the esophagus and "oesophagitis". **Br J Surg**, 38:175-182, 1950.
- BARRETT, NR. The lower esophagus lined by columnar epithelium. **Surgery**;41:881-894, 1957
- BLOT, WJ; DEVESA, SS; KNELLER RW. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. **JAMA**, 265:1287, 1991.
- BONELLI, L. Barrett's esophagus: results of multicentric survey. **Endoscopy**, 25: 652, 1993.
- CAMERON, AJ; ZINSMEISTER, AR; BALLARD, DJ; CARNEY, JA. Prevalence of columnar-lined (Barrett's) esophagus. **Gastroenterology**; 99:918-922, 1990.
- CAMERON, AJ; LOMBAY, CT. Barrett's esophagus: age prevalence, and extent of columnar epithelium. **Gastroenterology**, 103:1241-1245, 1992.
- CANTO, MI; SETRAKIAN, S; PETRAS, RE; BLADES E; CHAK, A; SIVAK, MV. Methylene blue selectively stains intestinal metaplasia in Barrett's esophagus. **Gastrointest Endosc**, 44:1-7, 1996.
- CANTO MI. Vital staining and Barrett's esophagus. **Gastrointest Endosc** 1999; 49:S12-6.
- CHEJFEC, G; SCHNELL, T; SONTAG, S. Barrett's Esophagus: A Preneoplastic Disorder. **American Journal of Clinical Pathology**, 98: 5-7, 1992
- CROOKS, GW; LICHTENSTEIN, GR. Clinical Implications of Barrett's Esophagus. **Arch Intern Med**, 156:2174-2180, 1996.
- DAVID, L; NESLAND, JM; CLAUSEN, H; CARNEIRO, F; SOBRINHO-SIMÕES; M. Simple mucin-type carbohydrate antigens (Tn, Sialosyl-Tn and T) in gastric mucosa, carcinoma and metastases. **APMIS**, 27(Suppl):162-172, 1992.

- DREWITZ, DJ; SAMPLINER, RE; GAREWAL, HS. The incidence of adenocarcinoma in Barrett's Esophagus: A prospective study of 170 patients followed 4,8 years. **Am American Journal of Gastroenterology**, 92:212-215, 1997.
- DUCHATELLE, V; POTET, F; BARA, J; MA, J; GOLDFAIN, D. Mucin immunohistochemistry of the columnar epithelium of the oesophagus (Barrett's oesophagus). **Virchows Archiv A Pathol Anat**, 414:359-363, 1989.
- FALK, GW. Barrett's esophagus. **Gastrointest Endosc Clin N Am**, 4:773-89, 1994.
- FALK, GW; RICHTER, JE. Reflux Disease and Barrett Esophagus. **Endoscopy**, 28:13-21, 1996.
- FLEJOU, JF; POTET, F; MUZEAU, F; LE PELLETIER, F; FEKETE, F; HENIN, D. Overexpression of p53 protein in Barrett's syndrome with malignant transformation. **J Clin Pathol**, 46: 330-3, 1993.
- GOLDBLUM, JR. The significance and etiology of intestinal metaplasia of the esophagogastric junction. **Annals of Diagnostic Pathology**, 6:67-73, 2002.
- HAGGIT, RC: Adenocarcinoma in Barrett's esophagus: A new epidemic? **Hum Pathol**, 23:475-476, 1992.
- HAGGIT RC: Barrett's Esophagus, Dysplasia, and Adenocarcinoma. **Hum Pathol**, 25:982-93, 1994.
- HALVORSEN TB, SEIM E. Influence of mucinous componebts on survival in colorectal adenocarcinomas: A multivariate analysis. **J Clin Pathology**; 41:1068-1072, 1988.
- ITZKOWITZ, SH; BLOMM, EJ; KOKAL, WA; MODIN, G; HAKOMORI, S; KIM, YS. Sialosyl-Tn: A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients. **Cancer Res**, 66: 1960-1966, 1990.
- JASS, JR: Role of intestinal metaplasia in the histogenesis of gastric carcinoma. **J Clin Path**, 33:801-810, 1980.
- JASS, JR; ALLISON, LJ; EDGAR, SG: Distribution of syalosyl Tn and Tn antigens within normal and malignant colorectal epithelium. **J Pathol**, 176:143-149, 1995.

KATZCA, DA: Barrett's esophagus: Detection and management. **Gastroenterol Clinics North Am**, 18:339-357, 1989.

LAPERTOSA, G; BARACCHINI, P; FULCHERI, E. and The Operative Group for the Study of Esophageal Precancer. Mucin Histochemical Analysis in the interpretation of Barrett's Esophagus. **AJCP**, 98:61-66, 1992.

MENKE-PLUYMERS, MBE. Risk factors for neoplastic progression in Barrett's mucosa. **European Journal of Surgical Oncology**, 22: 311-316, 1996.

OBERG, S; CLARK, WBG; DEMEESTER, TR. Barrett's Esophagus. Update of Pathophysiology and Management. **Hepato-Gastroenterology**, 45: 1348-1356, 1998.

PAULL, A; TRIER, JS; DALTON, MD; CAMP, RC; LOEB, P; GOYAL, RK. The histologic spectrum of Barrett's esophagus. **N Engl J Med**, 295:476-480, 1976.

PERA, M; CAMERON, AJ; TRASTEK, VF; CARPENTER, HÁ; ZINSMEISTER, AR. Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. **Gastroenterology**, 104: 510-513, 1993.

PEUCHMAUR, M; POTET, F; GOLDFAIN, D. Mucin histochemistry of the columnar epithelium of the oesophagus (Barrett's oesophagus): A prospective biopsy study. **J Clin Pathol**, 37:607-610, 1984.

PHILLIPS, RW; WONG, RKH. Barrett's esophagus – Natural History, Incidence, Etiology, and Complications. **Gastroenterology Clinics of North America**; 20:791-815, 1991.

POLLARA, WM. **Regeneração da mucosa esofágiana na prevenção de refluxo gastro-esofágico. Estudo experimental.** São Paulo, 1981 (Tese de Mestrado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo)

RAMEL, S; REID, BJ; SANCHEZ, CA. Evaluations of p53 protein expression in Barrett's esophagus by two-parameter flow cytometry. **Gastroenterology**, 102:1220-1228, 1992.

REID, BJ. Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma. **Gastroenterology Clinics of North America**, 20:817-834, 1991.

- ROBERTSON, CS; MAYBERRY, JF; NICHOLSON, DA. Value of endoscopic surveillance in the detection of neoplastic change in Barrett's esophagus. **Br J Surg**, 75:760-763, 1988.
- SAMPLINER, RE. Practice guidelines on the diagnosis, surveillance, and therapy of Barrett's esophagus. **Am J Gastroenterol**, 93: 1028-1032, 1998.
- SEABROOK, M; HOLT, S; GILRANE T. Barrett's esophagus: observations on diagnosis and mangement. **Southern Medical Journal**, 85:280-288, 1992.
- SPECHLER, SJ; GOYAL, RK. Barrett's esophagus. **N Engl J Med**, 315:362-371, 1986.
- SPECHLER, SJ. Barrett's esophagus. **Semin Oncol**, 21:431-437, 1994.
- SPECHLER, SJ; GOYAL, RK. The columnar-lined esophagus, intestinal metaplasia, and Norma Barrett. **Gastroenterology**, 110:614-621, 1996.
- UMPLEBY, HC; RANSON, DL; WILLIANS, RCN. Peculiarities of mucinous colorectal carcinoma. **Br J. Surg**, 72:715-718, 1985
- WANG, KK. Barrett's esophagus: current and future management. **Gastroenterology**, 20:36-43, 1994.

