

GLÁUCIO NÓBREGA DE SOUZA

BIOMARCADORES MOLECULARES NO ESÔFAGO DE
BARRETT

*Análise comparativa da imunoexpressão tecidual do p53, c-erbB-2,
E-caderina, COX-2 e Ki-67, na esofagite por refluxo, no esôfago de
Barrett e no adenocarcinoma associado ao esôfago de Barrett*

VIRTUS IMPAVIDA

UFPE

Recife
2006

GLÁUCIO NÓBREGA DE SOUZA



BIOMARCADORES MOLECULARES NO ESÔFAGO DE BARRETT

Análise comparativa da imunoexpressão tecidual do p53, c-erbB-2, E-caderina, COX-2 e Ki-67, na esofagite por refluxo, no esôfago de Barrett e no adenocarcinoma associado ao esôfago de Barrett.

Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e do Idoso do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte do requisito para obtenção do Título de Mestre.

ORIENTADORES

Prof. Dr. Fernando Tarcísio de Miranda Cordeiro

Prof.^a. Dr.^a. Maria Salete Trigueiro de Araújo.

**Recife
2006**

Souza, Gláucio Nóbrega de

Biomarcadores moleculares no esôfago de Barrett: Análise comparativa da imunoexpressão tecidual do p53, c-erbB-2, E-caderina, COX-2 e Ki-67, na esofagite por refluxo, no esôfago de Barrett e no adenocarcinoma associado ao esôfago de Barrett/ Gláucio Nóbrega de Souza. – Recife : O Autor, 2006.

148 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Mestrado em Medicina Interna, 2006.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Biomarcadores moleculares no esôfago de Barrett. 2. Adenocarcinoma. 3. Esofagite por refluxo. I. Título.

**616.002.771
616.127**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

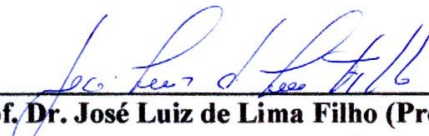
**UFPE
BC2006-062**



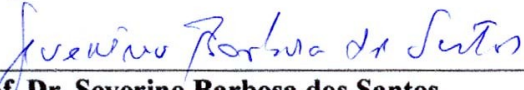
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DO ADULTO E DO IDOSO

RELATÓRIO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE GLÁUCIO NÓBREGA DE SOUZA, ALUNO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DO ADULTO E DO IDOSO, TURMA INICIADA EM 2004 (DOIS MIL E QUATRO)

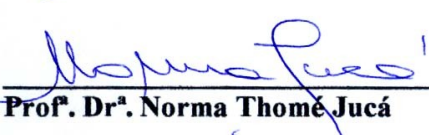
Às nove horas, do dia vinte e sete de março de dois mil e seis, na Sala Murilo La Greca - CCS, tiveram início, pelo Coordenador do Curso, Prof^o. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto, os trabalhos de Defesa de Dissertação, do mestrando Gláucio Nóbrega de Souza, para obtenção do **Grau de Mestre em Medicina Interna** do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. A Comissão Julgadora eleita pelo Colegiado do Curso e homologada pelas Câmaras de Pesquisa e Pós-Graduação foi formada pelos professores: **Dr. José Luiz de Lima Filho**, na qualidade de Presidente, do Departamento de Bioquímica e Biofísica da UFPE, **Dr. Severino Barbosa dos Santos**, do Departamento de Medicina Clínica da UPE e **Dr^a. Norma Thomé Jucá**, do Departamento de Patologia da UFPE. A Dissertação apresentada versou sobre: "Biomarcadores Moleculares no Esôfago de Barrett: Análise comparativa da imunoexpressão tecidual do p53, Ki-67, c-erbB-2, E-caderina e COX-2, na esofagite por refluxo, no esôfago de Barrett e no adenocarcinoma associado ao esôfago de Barrett", tendo como orientador o Prof. Dr. Fernando Tarciso Miranda Cordeiro, do Departamento de Medicina Clínica da UFPE. Após a explanação de 30 minutos feita pelo candidato, justificando a escolha do assunto, objetivos da Dissertação, metodologia empregada e resultados obtidos, ilustrados com diapositivos, foram realizadas as arguições pela Banca Examinadora, todos no tempo regulamentar e respondido pela candidata. Ao término das arguições, a Banca avaliou em secreto e proferiu o seguinte resultado: "Aprovado". Nada mais havendo a registrar, foram encerrados os trabalhos, do que, para constar, foi elaborado o presente relatório que vai assinado pelo Senhor Presidente e demais membros da Comissão Julgadora. Recife, 27 de março de 2006.



Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho (Presidente)



Prof. Dr. Severino Barbosa dos Santos



Prof. Dr^a. Norma Thomé Jucá

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Celso Pinto de Melo

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. José Thadeu Pinheiro

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETORA SUPERINTENDENTE

Prof^a. Heloísa Mendonça de Moraes

DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA

Prof^a. Jocelene Madruga

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA

COORDENADOR

Prof. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

VICE-COORDENADORA

Prof^a. Ana Lúcia Coutinho Domingues

CORPO DOCENTE

Prof^a. Ana Lúcia Coutinho Domingues

Prof^a. Ângela Luiza Pinto Duarte

Prof. Antônio Roberto Leite Campelo

Prof. Brivaldo Markman Filho

Prof. Edgar Guimarães Victor

Prof. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Prof. Ênio Torreão Soares Castellar

Prof. Fernando Tarcísio Miranda Cordeiro

Prof^a. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Prof. Hilton de Castro Chaves Jr.

Prof. José Ricardo Barros Pernambuco

Prof. Lurildo Cleano Ribeiro Saraiva

Prof^a. Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

“ De tudo, ficaram três coisas :
a certeza de que ele estava sempre começando,
a certeza de que era preciso continuar e
a certeza de que seria interrompido antes de
terminar.
Fazer da interrupção um caminho novo.
Fazer da queda um passo de dança, do medo
uma escada, do sono uma ponte, da procura um
encontro.”

FERNANDO SABINO

O Encontro Marcado – 1956

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, ***Olavo*** e ***Glaura***, princípio e fundamento de tudo na minha vida.

À minha esposa, ***Fabiana***, e aos nossos filhos, ***Joanna*** e ***Lucas***, pelo amor, pelo companheirismo, pelo apoio, pelo estímulo e pela compreensão nas minhas ausências dos momentos de família.

Ao amigo ***Pierre Landolt***, grande incentivador e apoiador da minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, sempre presente em mim e ao meu lado, o qual me permitiu, mais uma vez, concretizar um projeto científico-profissional.

Ao **Prof. Dr. Fernando Tarcísio de Miranda Cordeiro**, que como orientador, desde o início abraçou o projeto e me permitiu a execução, com observações e orientações pertinentes e precisas.

À **Profª Drª. Maria Salete Trigueiro de Araújo**, orientadora, que, de uma forma incansável e profissional, perseguiu, juntamente conosco, os objetivos deste trabalho.

Ao Governo do Estado da Paraíba, na pessoa do Exmº Sr. Governador, **Dr. Cássio Cunha Lima**, por acreditar, incentivar e apoiar este projeto científico.

Ao laboratório farmacêutico NOVARTIS, na pessoa do seu presidente, o **Dr. Patrice Zagamé**, pelo apoio financeiro e pelos kits de imunoistoquímica, fundamentais na viabilização e execução do nosso trabalho.

À **Dra. Norma Jucá** e ao **Dr. Guilherme Costa Guedes Pereira**, patologistas, pela disponibilidade em fornecer material e informações anatomoclínicas dos pacientes.

Aos Drs. **Carlos Alberto Fernandes Ramos** e **Álvaro Ferreira Lima Júnior**, patologistas, pela disponibilidade em nos ajudar profissionalmente no nosso projeto.

Aos **Professores das Disciplinas do Mestrado em Medicina Interna**, da Universidade Federal de Pernambuco, os quais contribuíram com o ensino e com as orientações valiosas para a conclusão deste trabalho.

Aos colegas **Clínicos e Cirurgiões** de João Pessoa e Recife, pela atenção, prestimosidade e disponibilidade em fornecer as informações clínico-cirúrgicas de alguns pacientes.

Aos **Professores Dr. José Luiz Simões Maroja e Eurípedes Sebastião Mendonça de Souza**, os quais viabilizaram e nos auxiliaram no estágio de docência na Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Ao presidente da Fundação e Hospital do Câncer Napoleão Laureano, **Dr. Antônio Carneiro Arnaud**, que, de uma forma profissional, científica e socialmente responsável, permitiu o acesso às informações anatomoclínicas dos pacientes do hospital.

Aos **Colegas de Mestrado**, com os quais tive a honra e a oportunidade de compartilhar as atividades diárias do aprendizado da pós-graduação.

Ao **Professor José Natal Figueiroa** pelo trabalho de toda a estatística desta dissertação de mestrado.

Ao **Professor Laerte Pereira da Silva** pela revisão de português do presente trabalho.

Ao **Professor John Philip Medcraft** pelos preciosos ensinamentos na língua inglesa e pela revisão do *abstract*.

Às secretárias do mestrado em Medicina Interna da UFPE, **Esmeralda, Andréa e Karita**, as quais me auxiliaram com as atividades administrativas para a execução e conclusão do nosso projeto.

Aos **Pacientes e Familiares**, que, com uma atitude altruísta, contribuíram para a busca de novos conhecimentos na Medicina.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE GRÁFICOS.....	xvii
LISTA DE FIGURAS.....	xix
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Objetivos.....	12
2. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	13
2.1 Local do estudo.....	14
2.2 Desenho do estudo.....	14
2.3 Definição de critérios.....	15
2.3.1 Critérios endoscópicos.....	15
2.3.2 Critérios anatomopatológicos.....	19
2.3.3 Critérios de inclusão.....	21
2.3.4 Critérios de exclusão.....	21
2.4 Caracterização da amostra.....	21
2.5 Procedimentos e técnicas.....	22
2.5.1 Dados clínicos.....	22
2.5.2 Procedimento endoscópico.....	22
2.5.3 Procedimento anatomopatológico.....	24
2.5.4 Técnica imunoistoquímica.....	24
2.5.5 Metodologia da descrição dos resultados.....	28
2.6 Limitações metodológicas do estudo.....	32
2.7 Aspectos Éticos do estudo.....	33
2.8 Análise estatística.....	33
3. RESULTADOS.....	34
3.1 Dados clínicos.....	35
3.2 Dados endoscópicos.....	40
3.3 Dados imunoistoquímicos.....	44
4. DISCUSSÃO.....	66
5. CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS.....	84
ANEXOS.....	110

ABREVIATURAS E SIGLAS

AGA	– American Gastroenterology Association.
cm	– centímetros.
COXs	– Ciclooxygenases.
DAB	– Diaminobenzidina.
DNA	– Ácido desoxirribonucleico.
DRGE	– Doença do refluxo gastroesofágico.
EB	– esôfago de Barrett.
EGF	– Fator de crescimento epidérmico.
EGFR	– Receptor do fator de crescimento epidérmico.
EUA	– Estados Unidos da América do Norte.
°C	– grau Celsius
HE	– Hematoxilina-Eosina.
H. pylori	– Helicobacter pylori.
IMC	– Índice de massa corpórea.
M	– Mol.
mM	– Milimol.
mRNA	– Ácido ribonucleico mensageiro.
N	– Número.
OMS	– Organização Mundial da Saúde.
OR	– Odds ratio.
PCNA	– Antígeno nuclear de proliferação celular.
SOBED	– Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva.
SBP	– Sociedade Brasileira de Patologia.
TEG	– Transição esôfago-gástrica.
TGF-alfa	– Fator de transformação do crescimento-alfa.
vs	– Versus.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados clínicos dos pacientes do grupo I (esofagite por refluxo).....	37
Tabela 2	Dados clínicos dos pacientes do grupo II (esôfago de Barrett).....	38
Tabela 3	Dados clínicos dos pacientes do grupo III (adenocarcinoma relacionado com o esôfago de Barrett).....	39
Tabela 4	Dados endoscópicos dos pacientes com esofagite por refluxo (grupo I).....	41
Tabela 5	Dados endoscópicos dos pacientes com esôfago de Barrett (grupo II)...	42
Tabela 6	Dados endoscópicos dos pacientes com adenocarcinoma esofágico relacionado com o esôfago de Barrett (grupo III).....	43
Tabela 7	Imunoexpressão tecidual do p53 em todos os grupos analisados.....	45
Tabela 8	Imunoexpressão tecidual da COX-2 em todos os grupos analisados.....	47
Tabela 9	Imunoexpressão tecidual do c-erbB-2 em todos os grupos analisados....	49
Tabela 10	Escore final da imunoexpressão tecidual do p53 em todos os grupos analisados.....	53
Tabela 11	Escore final da imunoexpressão tecidual da COX-2 em todos os grupos do estudo.....	55
Tabela 12	Escore da imunoexpressão tecidual do c-erbB-2 nos três grupos analisados.....	57
Tabela 13	Escore final da imunoexpressão tecidual do Ki-67 nos três grupos do estudo.....	61
Tabela 14	Escore final da imunoexpressão tecidual da E-caderina nos grupos do estudo.....	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Imunoexpressão tecidual do p53 em todos os grupos do estudo.....	45
Gráfico 2	Imunoexpressão tecidual da COX-2 em todos os grupos analisados.....	47
Gráfico 3	Imunoexpressão tecidual do c-erbB-2 em todos os grupos estudados.....	49
Gráfico 4	Análise agrupada da positividade tecidual dos biomarcadores p53, c-erbB-2 e COX-2, nos três grupos do estudo.....	51
Gráfico 5	Escore semiquantitativo do Ki-67 em todos os grupos de estudo.....	60
Gráfico 6	Análise do escore semiquantitativo da E-caderina em todos os grupos de estudo.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imunoexpressão fraca e focal da proteína p53 na esofagite por refluxo (400X).....	46
Figura 2	Imunomarcção do p53 no esôfago de Barrett (400X).....	46
Figura 3	Forte imunoexpressão do oncôgeno p53 no adenocarcinoma esofágico (400X).....	46
Figura 4	Imunoexpressão da COX-2 na esofagite por refluxo (400X).....	48
Figura 5	COX-2 - imunoexpressão citoplasmática no epitélio glandular do esôfago de Barrett: 100X(A) e 400X(B).....	48
Figura 6	Imunoexpressão acentuada da COX-2 no adenocarcinoma esofágico (400X), e fraca marcação no controle interno (epitélio escamoso).....	48
Figura 7	c-erbB-2 - imunoexpressão citoplasmática, sem forte marcação de membrana epitelial, no esôfago de Barrett - A(100X) e B(400X).....	50
Figura 8	Forte imunoexpressão (citoplasmática e de membrana) da oncoproteína c-erbB-2 no adenocarcinoma esofágico (400X).....	50
Figura 9	Ki-67 – atividade proliferativa da camada basal do epitélio malphigiano, na esofagite por refluxo (A–B:400X).....	59
Figura 10	Expressão nuclear do Ki-67 no esôfago de Barrett e na atividade proliferativa basal do epitélio escamoso esofágico (A-100X; B-400X)..	59
Figura 11	Ki-67 - alto índice proliferativo no adenocarcinoma esofágico (A–B:400X).....	59
Figura 12	Forte expressão de membrana da E-caderina na esofagite por refluxo (400X).....	65
Figura 13	Imunoexpressão da E-caderina no esôfago de Barrett (400X).....	65
Figura 14	Imunomarcção inconstante da E-caderina no adenocarcinoma associado com o esôfago de Barrett (A-Bulbo duodenal amplo e sem anormalidades.: 400X).....	65

RESUMO

O esôfago de Barrett, definido pela metaplasia colunar do esôfago distal, com a presença de células caliciformes, representa importante complicação da doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), e caracteriza-se como a principal lesão precursora do adenocarcinoma esofágico. Fatores clínicos e endoscópicos não apresentam a sensibilidade e especificidade necessárias à estratificação de risco para o câncer. Biomarcadores moleculares têm sido utilizados com esse objetivo. Este trabalho incluiu três grupos de pacientes, portadores de esofagite por refluxo (grupo I; N=23), esôfago de Barrett (grupo II; N=30) e adenocarcinoma esofágico associado ao esôfago de Barrett (grupo III; N=11), nos quais foram realizadas, respectivamente, análises comparativas da imunoexpressão tecidual dos seguintes biomarcadores: p53, c-erbB-2, E-caderina, COX-2 e Ki-67. As imunorreações qualitativas com p53, COX-2 e c-erbB-2 revelaram maior expressão no grupo III, contrastando com a positividade menor e decrescente dos grupos II e I ($p<0,001$; $p=0,002$; $p<0,001$, respectivamente). O escore semiquantitativo final para p53, c-erbB-2, COX-2 e Ki-67 seguiu a mesma tendência da expressão qualitativa, com os maiores índices no grupo III, e os menores no grupo I ($p<0,001$). A E-caderina apresentou um perfil inverso de imunomarcacão, com a maior positividade no grupo I ($p<0,001$). Em conclusão, constatamos uma tendência monotônica de crescimento na imunoexpressão para os biomarcadores oncogênicos e de atividade mitótica (p53, c-erbB-2, COX-2 e Ki-67) em todos os grupos analisados, com expressão máxima na doença neoplásica. Por outro lado, a preservação organizacional do tecido, revelada pela E-caderina, foi marcante na esofagite por refluxo e no esôfago de Barrett, em contraste com escassa imunorreacão no adenocarcinoma esofágico.

ABSTRACT

Barrett's esophagus, defined by the presence of columnar metaplasia of distal esophagus, and characterized by the presence of goblet cells, is an important complication of gastroesophageal reflux disease (GERD), and represents the main premalignant lesion of esophageal adenocarcinoma. Clinical and endoscopic factors do not have the sensibility and/or the specificity needed to stratify the risk of the development of cancer. Molecular biomarkers have been used with this purpose. This paper included three groups of patients, with reflux esophagitis (group I; N=23), Barrett's esophagus (group II; N=30) and Barrett associated esophageal adenocarcinoma (group III; N=11), in which were proceeded comparative analyses, respectively, of the tissues' immunoexpressions of p53, c-erbB-2, E-cadherin, COX-2 and Ki-67. Qualitative immunoreactions with p53, c-erbB-2 and COX-2, revealed high indexes of positivity in group III, contrasting with lower and decreasing levels in groups II and I ($p<0.001$; $p=0.002$; $p<0.001$, respectively). The semiquantitative final score for p53, c-erbB-2, COX-2 and Ki-67 followed the same tendency of the qualitative expression, with the highest indexes in group III and lowest in group I ($p<0.001$). E-cadherin presented an inverse profile of reactivity, with the highest immunoreaction in group I ($p<0.001$). In conclusion, we have noted a monotonic growth tendency in both the immunoexpressions of oncogenic and mitotic activity biomarkers (p53, c-erbB-2, COX-2, and Ki-67) in all analyzed groups, with maximum marking on neoplastic disease. On the other hand, the structural preservation of the tissue, revealed by E-cadherin, was marked in reflux esophagitis and Barrett's esophagus, in contrast with the sparse immunoreaction in esophageal adenocarcinoma patients ($p<0.001$).

INTRODUÇÃO

O esôfago de Barrett (EB) é definido como uma condição pré-maligna, em que se assinala a substituição do epitélio escamoso do esôfago distal por epitélio colunar, em qualquer extensão, e caracteriza-se, histologicamente, pela presença de células mucíparas caliciformes^{1,2}.

O EB representa uma importante complicação da doença mais prevalente do aparelho digestório, a doença do refluxo gastroesofágico (DRGE)³, sendo considerado, pela comunidade científica internacional, como a principal lesão precursora do adenocarcinoma esofágico.

Historicamente, atribui-se a Normann Barrett, no ano de 1950, a descrição da síndrome do esôfago recoberto por mucosa colunar⁴. Allinson & Johnstone, por sua vez, em 1953, relacionaram a DRGE com o EB⁵, e Naef et al.⁶, na sua série clássica em 1975, de uma forma definitiva, correlacionaram a DRGE com o EB e com o adenocarcinoma esofágico.

De elevada e crescente prevalência na população ocidental^{7,8}, estima-se que, atualmente, a DRGE afete 40% dos adultos nos Estados Unidos da América do Norte (EUA)⁹. No Brasil, em amplo estudo envolvendo vinte e duas cidades, com 14.000 mil indivíduos, observou-se que 7,3% da população sofrem da DRGE¹⁰. Por sua vez, supõe-se que a prevalência do EB oscile entre 0,5% a 2% dos adultos no Ocidente¹¹, podendo, no entanto, ser este percentual bem maior, uma vez que, conforme dados de autópsia, foi encontrada uma prevalência vinte e uma vezes acima daqueles casos clinicamente diagnosticados¹².

Há, também, relatos na literatura que referem ser assintomática a grande parte dos pacientes portadores de EB, de forma que a maioria dos casos permanece, assim, subdiagnosticada¹²⁻¹⁴. Esse fato poderia explicar o aumento nas taxas de incidência do adenocarcinoma do esôfago e da cárdia, nas últimas três décadas, nos países ocidentais^{15,16}.

Dos portadores de esofagite por refluxo, estima-se que 10% evoluem para o esôfago de Barrett^{12,17}. Uma vez diagnosticado o EB, observa-se a progressão para a displasia de alto

grau em 5% dos casos, em cinco anos, quando se considera, inicialmente, a presença do epitélio de Barrett sem displasia e, em 25% dos pacientes, naqueles casos com a displasia, à princípio, de baixo grau¹⁸. Nas situações de displasia de alto grau, relata-se a presença do câncer invasivo em percentual de 38% a 50% dos espécimes de biópsias¹⁹.

A DRGE, o esôfago de Barrett e o adenocarcinoma esofágico são doenças dos tempos modernos.

Ao longo destas últimas três décadas, desde os relatos iniciais de Naef et al.⁶, quando o adenocarcinoma esofágico raramente era diagnosticado, tem-se observado que esta neoplasia tem apresentado um aumento uniforme na incidência, nos EUA e na Europa, em proporções epidêmicas, com taxas que excedem as de quaisquer outras neoplasias²⁰⁻²⁴. Atualmente, três dentre cinco neoplasias malignas do esôfago diagnosticadas são adenocarcinomas²⁵.

Com a definição da DRGE crônica e a sua principal seqüela, o EB, como fatores de risco primários para o adenocarcinoma do esôfago²⁶, e considerando o EB como a única lesão precursora desta neoplasia maligna, a *American Gastroenterology Association* (AGA) tem recomendado o rastreamento endoscópico naqueles pacientes portadores de sintomas crônicos de DRGE²⁷. Indica também, em consonância com outros autores, o seguimento periódico dos pacientes reconhecidamente portadores do EB, com biópsias seriadas do epitélio metaplásico, seguido do estudo histopatológico²⁷⁻²⁹.

Objetiva-se, desse modo, detectar o câncer e as suas lesões precursoras em estágios precoces²⁶, de forma que se ofereça um melhor prognóstico aos pacientes, com a perspectiva de cura para uma patologia sabidamente letal³⁰⁻³².

Entretanto, embora o adenocarcinoma esofágico encontre-se intimamente relacionado com o EB, somente 5% dos pacientes portadores desta neoplasia têm um diagnóstico prévio do EB^{31,33,34}.

Ademais, apesar do câncer do esôfago ser uma das doenças mais letais do aparelho digestório, de pobre prognóstico, com uma sobrevida média de cinco anos em torno de 10% dos casos³⁵, e mesmo já se conhecendo a sua lesão precursora, a maioria desses cânceres ainda continua sendo diagnosticada tardiamente, quando não podem mais ser curados³⁶.

A definição dos fatores de risco que apontam essa possível progressão neoplásica, nos pacientes portadores do EB, reveste-se, portanto, de uma importância fundamental. Isto porque não só permite que se selecionem, realmente, aqueles pacientes que ingressarão em programas eficazes de seguimento e vigilância endoscópica, mas, também, possibilita que a relação custo–benefício, do seguimento desses pacientes, seja, efetivamente, positiva, já que, sabidamente, a maioria dos portadores dessa doença não evolui para o adenocarcinoma esofágico^{30,37,38}.

Não obstante, fatores de risco convencionais, clínicos e endoscópicos (sexo, idade, extensão do epitélio de Barrett, presença do refluxo duodeno-gastro-esofágico, cronicidade do refluxo, raça, índice de massa corpórea (IMC), história familiar de câncer, uso de medicamentos com efeito sobre o esfíncter inferior do esôfago, infecção pelo *Helicobacter pylori*, tabagismo e lesões no epitélio de Barrett, relacionados ao desenvolvimento do câncer no EB, não apresentam a sensibilidade e/ou a especificidade necessárias a estratificação de risco dos pacientes para o surgimento do câncer^{13,27,39-48}.

Atualmente, a presença da displasia epitelial, definida histopatologicamente, tem sido o marcador tecidual mais utilizado na estratificação de risco do EB, para o desenvolvimento do adenocarcinoma, determinando, inclusive, o período e o intervalo da vigilância endoscópica²⁹. Contempla-se, nesta abordagem, a sequência neoplásica descrita no EB, de metaplasia, displasia de baixo grau, displasia de alto grau, carcinoma *in situ* e, finalmente, câncer invasivo⁴⁹⁻⁵¹.

Contudo, há várias restrições quando se considera a displasia como o único fator preditivo do adenocarcinoma relacionado com o EB.

Variações intra e interobservadores no diagnóstico e na graduação anatomopatológica da displasia⁵², incertezas a respeito da sua história natural^{53,54}, e dificuldades na distinção entre a displasia de baixo grau e atipia regenerativa, são alguns dos fatores que têm limitado a sua aplicabilidade clínica.

Além disso, a displasia epitelial tem sido considerada um marcador imperfeito para o câncer no EB, uma vez que a neoplasia precoce já é possível de ser encontrada, aproximadamente, em um terço dos pacientes portadores de displasia de alto grau, quando são submetidos a cirurgia⁵⁵. Contrariamente, pode, também, haver a regressão do epitélio displásico, no seguimento dos pacientes portadores do EB^{56,57}.

Observa-se, ademais, que nos portadores de displasia de alto grau não ocorrerá evolução, invariavelmente, para o adenocarcinoma esofágico^{54,58,59}, e que, pode ocorrer o desenvolvimento do carcinoma do esôfago sem o diagnóstico prévio da displasia de alto grau^{60,61}. O significado clínico das displasias de baixo e alto grau permanece, portanto, ainda controverso^{2,52,53,62-64}.

Desta forma, métodos de rastreamento alternativos e de detecção precoce são necessários para a identificação efetiva destes pacientes portadores do EB, com risco de evoluírem para o câncer esofágico.

Novas estratégias têm investigado reais fatores de risco adicionais, de forma que, correlacionados com as alterações histológicas e com os dados clínico-endoscópicos, sejam capazes de prever e identificar esse subgrupo de pacientes com possibilidades concretas para o desenvolvimento do câncer esofágico.

Uma melhor compreensão dos eventos celulares e de biologia molecular, que ocorrem na evolução neoplásica do EB, dentro da seqüência metaplasia–displasia–adenocarcinoma descrita⁴⁹⁻⁵¹, tem auxiliado e permitido a busca desta abordagem.

No adenocarcinoma esofágico relacionado com o EB, tem-se observado que as células metaplásicas são predispostas a desenvolver todas as características do processo da carcinogênese em geral⁴⁹, descritas por Hanahan e Weinberg⁶⁵. Esses autores identificaram vários eventos biológicos, de forma que as células necessitam, para uma evolução neoplásica: 1) promover sinais de crescimento; 2) ignorar sinais inibitórios do crescimento; 3) evitar a apoptose; 4) replicar sem limites; 5) sustentar a angiogênese; 6) invadir e proliferar.

Nowell⁶⁶, em 1976, por sua vez, propôs que o câncer desenvolve-se como resultado de uma instabilidade genética adquirida, predispondo, assim, a evolução de um clone de células com erros genéticos acumulados. Estes clones adquirem, então, vantagens proliferativas seletivas, de forma que, eventualmente, um subclone poderá progredir para o câncer precoce.

Há evidências de que essa evolução clonal, postulada por Nowell, ocorre na maioria dos cânceres humanos, inclusive no adenocarcinoma esofágico relacionado com o EB⁶⁷⁻⁷⁰. Vários estudos têm demonstrado que nesta neoplasia ocorre este acúmulo de alterações genéticas descritas, desde as células normais às células neoplásicas invasoras^{51,71,72}, além das anormalidades cromossômicas e mutações específicas nos genes de supressão tumoral p53 e p16. Distúrbios no ciclo celular, como um aumento no número de células na fase S (correspondente à síntese do DNA) e na fase G2 (pré-mitose), têm, igualmente, sido observados e relatados⁷³.

A aneuploidia (conteúdo anormal de DNA) e uma fração maior da fase G2/M do ciclo celular das células metaplásicas, têm sido, também, demonstradas na evolução

neoplásica do epitélio esofágico normal para o epitélio de Barrett^{18,74,75}. Segundo dados da literatura, a aneuploidia é encontrada em 79 a 100% dos adenocarcinomas esofágicos^{57,75-80}.

Todo esse acúmulo de alterações genéticas relatado, pode resultar na perda da função de genes que, normalmente, bloqueiam o crescimento da célula, nos pontos de checagem do ciclo celular (genes de supressão tumoral), ou pode ativar genes dominantes que estimulam o crescimento, a diferenciação e a proliferação celular (proto-oncogenes). A ativação desses oncogenes pode ser observada pelo aumento de suas expressões protéicas no tecido, as quais são detectáveis na análise imunoistoquímica dos espécimes de biópsias.

Nesse contexto, o termo biomarcador tem sido introduzido e utilizado, aplicando-se esta denominação a qualquer medida biológica que possa evidenciar, no tecido, essa série de fatores imunoprotéicos, correspondentes às várias alterações genéticas descritas, e, por conseguinte, permita prever, com segurança, aqueles indivíduos, portadores do EB, que poderão, ou não, evoluir para o adenocarcinoma esofágico.

A literatura sobre biomarcadores moleculares no esôfago de Barrett é bastante ampla, envolvendo vários estudos, desde a pesquisa básica até estudos de base populacional. Atualmente, já existe mais do que 60 biomarcadores descritos para o EB^{81,82}.

O p53 é um gene de supressão tumoral localizado no braço curto do cromossomo 17, tendo um importante papel no crescimento e na proliferação celular. Influencia, de forma supressora, a instabilidade genômica, promovendo a apoptose e modulando a diferenciação celular. O produto de um gene p53 intacto impede a célula, com danos ao DNA, de entrar no ciclo celular na fase S, no ponto de checagem G1, conduzindo a célula ao bloqueio na progressão do ciclo, promovendo, posteriormente, reparo no DNA ou a apoptose da célula⁸³. Desse modo, a proteína p53 é considerada o “guardião do genoma”.

As mutações e as deleções do gene de supressão tumoral p53 são as lesões genéticas mais comuns dos cânceres humanos. A meia-vida prolongada da proteína p53 mutante (a

mutação estabiliza a proteína), e o aumento na sua concentração intracelular, permitem a análise imunoistoquímica.

No processo inflamatório crônico observado na DRGE, há uma sobrecarga intracelular de radicais de oxigênio, que pode levar a mutações de vários genes relacionados com o câncer, inclusive com o gene de supressão tumoral p53⁸⁴. Há evidências de que estas alterações ocorram de uma forma freqüente no adenocarcinoma esofágico, indicando, assim, que este gene está associado à degeneração maligna do epitélio de Barrett⁸⁵⁻⁸⁷.

Dados na literatura também têm demonstrado a importância do p53 na manutenção da estabilidade do genoma⁸⁸. Anormalidades deste gene precedem o desenvolvimento da aneuploidia no EB, podendo ser, desse modo, um importante marcador molecular na determinação do risco para o adenocarcinoma no EB, sobretudo se for associado com a detecção da aneuploidia⁸⁹.

No desenvolvimento e surgimento do adenocarcinoma no epitélio de Barrett, a proliferação celular é, também, considerada como uma de suas etapas mais precoces. Populações normais de células em divisão mantêm o equilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose, conservando constante o número de células. Distúrbios neste equilíbrio podem favorecer a formação e a progressão tumoral⁹⁰. Do ponto de vista imunoistoquímico, a proliferação celular pode, também, ser avaliada com o uso de anticorpos monoclonais, que reconhecem os antígenos expressos no núcleo durante esse período.

Vários estudos têm utilizado estes anticorpos relacionados com os antígenos Ki-67 e PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), para se avaliar as propriedades proliferativas do EB e do adenocarcinoma esofágico⁹¹⁻⁹³.

O estudo imunoistoquímico, combinado, da expressão do p53 e do Ki-67 pode, também, proporcionar uma visão mais aprofundada da proliferação celular na metaplasia de Barrett e na displasia associada, respectivamente, permitindo, assim, obter-se informações

sobre o potencial neoplásico desse epitélio. Ademais, estas análises objetivas e quantitativas têm permitido a reprodutibilidade das avaliações anatomopatológicas e estabelecido diferenças diagnósticas significativas, não obtidas, somente, com a avaliação microscópica, qualitativa, habitual⁹⁴.

A apoptose, considerada como um dos fatores protetores da célula, é, de forma semelhante, um dos mecanismos envolvidos na carcinogênese esofágica. Na apoptose normal, ocorre a remoção do DNA danificado e das células geneticamente alteradas, que podem interferir na função celular normal. Um aumento dos níveis de apoptose encontra-se associado com um decréscimo no crescimento celular. Contrariamente, a inibição da apoptose (um dos eventos precoces na seqüência evolutiva tumoral do epitélio de Barrett), promove um incremento na sobrevida da célula, e está diretamente relacionada com a progressão neoplásica. A análise do mecanismo da apoptose também pode ser realizada pelo estudo imunoistoquímico.

As ciclooxigenases (COXs) são enzimas-chaves relacionadas com a produção das prostaglandinas, a partir do ácido araquidônico. Altos níveis de prostaglandinas têm potente efeito imunomodulatório, como a inibição de citocinas e a proliferação de linfócitos, que têm, também, um importante papel na carcinogênese.

Estudos têm demonstrado que, a injúria contínua do refluxato gastroduodenal para o esôfago induz a síntese e a liberação de mediadores inflamatórios, inclusive as prostaglandinas e as citocinas pró-inflamatórias, que podem causar danos à mucosa esofágica, com um papel definitivo, por conseguinte, na progressão neoplásica do EB⁹⁵⁻⁹⁷.

Duas isoformas de COXs foram descritas: COX-1 e COX-2, sendo ambas reguladas por diferentes mecanismos e tendo diferentes padrões de expressão⁹⁸. A COX-1 é predominantemente constitutiva e a COX-2 está normalmente ausente na maioria dos tecidos, no entanto, esta pode ser induzida por estímulos inflamatórios, citocinas, estímulos

mitogênicos, fatores de crescimento e fatores promotores de tumores. Por outro lado, pode ser suprimida pelos genes de supressão tumoral⁹⁹⁻¹⁰³.

A COX-2 encontra-se envolvida nos vários processos necessários ao desenvolvimento das neoplasias, como a própria apoptose, a adesão celular, a invasão, a metástase e a angiogênese¹⁰⁴, relatando-se níveis aumentados em diversas neoplasias malignas^{105,106}. Pesquisas *in vitro* têm relatado que esta expressão aumentada, na seqüência carcinogênica do EB, reduz a apoptose, estimula o poder de invasão das células malignas e promove a angiogênese, mediante efeitos parácrinos e autócrinos^{104,107-114}.

Níveis elevados da COX-2 têm sido, efetivamente, relatados no esôfago de Barrett e no carcinoma epidermóide do esôfago, observando-se percentuais de expressão, no adenocarcinoma esofágico, em torno de 70% a 80%^{96,115,116}. A COX-2, com esses níveis de expressão, tem sido definida como um fator prognóstico independente na neoplasia esofágica relacionada ao EB¹¹⁷.

A E-caderina, presente à superfície de todas as células epiteliais, está ligada ao citoesqueleto por meio das cateninas, no citoplasma da célula, tendo uma importante função na adesividade e na interação das células. Quebras nessas pontes intercelulares têm, também, um papel fundamental na patogênese das neoplasias malignas¹¹⁸⁻¹²⁵.

Níveis normais da E-caderina são observados no epitélio esofágico normal, contudo, no epitélio de Barrett, à medida que se evolui na seqüência neoplásica para o adenocarcinoma esofágico, assinala-se uma redução progressiva dos índices de expressão destas moléculas. Níveis reduzidos nas imunoexpressões têm, também, sido evidenciados nos graus progressivos das displasias, encontrando-se, da mesma forma, relacionados com os mecanismos de invasão e metastatização neoplásicos^{118,119,126-128}.

Fatores de crescimento são igualmente importantes na regulação e na diferenciação celular. Expressões anormais dos fatores de crescimento, como o EGF (fator de crescimento

epidérmico), o TGF-alfa (fator de transformação do crescimento-alfa) e o EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), estão associadas com a mitogênese e com a carcinogênese.

O c-erbB-2 é um proto-oncogene que codifica uma glicoproteína altamente homóloga, porém distinta, ao EGFR e está relacionada com a diferenciação e com a proliferação celular¹²⁹. Apresenta-se superexpresso em vários adenocarcinomas, correlacionando-se com a sobrevida dos pacientes¹³⁰. Expressão aumentada do c-erbB-2 foi relatada em 11 a 73% dos carcinomas esofágicos invasivos, no entanto, foi ausente nas áreas displásicas, sugerindo ser, efetivamente, um evento tardio na sequência neoplásica do esôfago de Barrett¹³¹.

Todos estes processos moleculares descritos previamente, com os seus respectivos biomarcadores, antecedem as alterações morfológicas para o diagnóstico da displasia, e seus diferentes graus, no esôfago de Barrett.

O emprego desses marcadores moleculares, em forma de painel, ou de um perfil imunoistoquímico, no seguimento dos pacientes portadores do EB, tem-se apresentado como ferramenta clínica importante e promissora, na identificação dos pacientes realmente de risco para o desenvolvimento do adenocarcinoma esofágico. Além disso, apresentam o potencial para permitir, juntamente com os dados clínicos, endoscópicos e anatomopatológicos, a otimização e a padronização dos programas atuais de vigilância.

A combinação desses biomarcadores, validados através de um painel imunoistoquímico, tem demonstrado ser, também, um instrumento clínico-laboratorial com potencial para ser empregado na monitorização da eficácia dos tratamentos conservadores das lesões displásicas, associadas à DRGE. Ademais, oferece a perspectiva de novas estratégias terapêuticas, a exemplo da quimioprevenção, em pacientes selecionados¹³².

1.1 Objetivos

Estabelecer e comparar, por meio de técnica imunoistoquímica, o perfil da imunoexpressão tecidual dos biomarcadores moleculares p53, c-erbB-2, E-caderina, COX-2 e Ki-67, em três fases distintas do espectro da doença do refluxo gastroesofágico, respectivamente, na esofagite por refluxo, no esôfago de Barrett e no adenocarcinoma associado ao esôfago de Barrett.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

2.1 Local do estudo

O estudo foi desenvolvido na cidade de João Pessoa, na Paraíba, no Endocentro (clínica privada de gastroenterologia e endoscopia digestiva) e no Virchow (laboratório médico de patologia celular). Os dados clínico-endoscópicos de oito pacientes foram obtidos de outras instituições privadas de gastroenterologia, cirurgia do aparelho digestivo e endoscopia digestiva: em João Pessoa (Clínica Cirúrgica Dr. Gilson do Vale - 01 paciente; Centro Médico Dr. Luiz Antônio Cavalcante da Fonsêca - 02 pacientes; Centro de Cirurgia do Aparelho Digestivo-CECAD - 01 paciente; CEDIPA - Centro de Endoscopia Digestiva da Paraíba - 01 paciente; Clínica Cirúrgica Dr. Cássio Virgílio de Oliveira - 01paciente), e em Recife (EndoSabin - 02 pacientes). Os dados anatomopatológicos de 05 pacientes foram obtidos em João Pessoa, no Histo (02 pacientes), e, em Recife, no SPAC (03 pacientes), ambos laboratórios médicos de patologia celular. Todos os demais pacientes pesquisados foram provenientes do Endocentro e do Virchow. As análises imunoistoquímicas foram integralmente realizadas no laboratório Virchow em João Pessoa.

2.2 Desenho do estudo

Estudo descritivo, ambidirecional, tipo série de casos, no qual foram avaliados, simultaneamente, em três fases distintas, evolutivas, do espectro da doença do refluxo gastroesofágico, os dados clínicos, endoscópicos, anatomopatológicos e os respectivos painéis de imunoexpressão tecidual, de cinco biomarcadores moleculares selecionados.

2.3 Definição de critérios

2.3.1 Critérios endoscópicos

a) Esofagite por refluxo (grupo I)

Na definição endoscópica da esofagite por refluxo, foi utilizada a classificação de Savary-Miller modificada (Quadro 1).

b) Esôfago de Barrett (grupo II)

O critério endoscópico utilizado para a definição do esôfago de Barrett foi o estabelecido e respaldado pelo I Consenso Brasileiro da Doença do Refluxo Gastroesofágico¹³³, pelo *American College of Gastroenterology*² e pela Organização Mundial de Saúde¹³⁴, nos quais se denomina o esôfago de Barrett como a substituição do epitélio escamoso estratificado do esôfago por epitélio colunar, contendo células intestinalizadas (metaplasia intestinal), no estudo anatomopatológico, em qualquer extensão do órgão.

Com o propósito de excluir metaplasia intestinal gástrica (da cárdia), ou da transição esôfago-gástrica – TEG (metaplasia intestinal da TEG), este estudo somente utilizou epitélios de Barrett com, no mínimo, 1,0cm de extensão acima da TEG, definida, na endoscopia, como o limite máximo, cranial, da prega gástrica.

A extensão do epitélio de Barrett, estabelecida endoscopicamente, correspondeu ao segmento do esôfago recoberto pelo epitélio colunar, existente entre o limite cranial da prega gástrica e o início da junção escamo-colunar, deslocada proximalmente.

c) Adenocarcinoma esofágico associado ao esôfago de Barrett (grupo III).

A classificação macroscópica utilizada na definição endoscópica do adenocarcinoma esofágico foi definida pela Associação Japonesa do Câncer Gástrico, também aplicada para o carcinoma esofágico (Quadro 2).

Com o propósito de excluir tumores da junção esôfago-gástrica, ou tumores gástricos com invasão esofágica, este estudo somente incluiu os casos em que foi evidenciado epitélio metaplásico tipo intestinal especializado, corados com a Hematoxilina-Eosina (HE), ao lado do adenocarcinoma esofágico, independentemente da sua extensão.

Quadro 1. Classificação da esofagite por refluxo de Savary-Miller modificada.

Grau	Aspecto endoscópico
I	Uma ou mais erosões, lineares ou ovaladas, em uma única prega longitudinal.
II	Várias erosões em mais de uma prega longitudinal, confluentes ou não, mas que não ocupam toda a circunferência do órgão.
III	Erosões confluentes que ocupam toda a circunferência do órgão.
IV	Lesões crônicas : úlcera(s) e estenose(s), isoladas ou associadas às lesões dos graus I, II e III.
V	Epitélio colunar em continuidade com a linha Z: circunferencial ou não, de extensão variável, associado ou não às lesões dos graus I, II, III e IV.

Fonte: Breyer & Maguilnik¹³⁵

Quadro 2. Classificação endoscópica do adenocarcinoma esofágico, definida pela Associação Japonesa do Câncer Gástrico, também aplicada para o carcinoma esofágico.

Tipo	Aspecto endoscópico
0	Superficial : polipóide, elevado, plano, deprimido, ulcerado.
1	Avançado : polipóide de base larga.
2	Avançado : ulcerado de bordas elevadas e bem delimitadas.
3	Avançado : ulcerado, de bordas infiltrativas.
4	Avançado : infiltração difusa, sem ulceração.
5	Avançado : não-classificável.

Fonte: Maluf, Moura & Sakai¹³⁶

2.3.2 Critérios anatomopatológicos

Os critérios anatomopatológicos utilizados na definição dos distintos grupos do presente estudo foram os descritos a seguir, após coloração das lâminas com HE e exame com microscopia óptica.

a) **Esofagite por refluxo** (grupo I).

As características histológicas da esofagite por refluxo encontradas nas biópsias endoscópicas, estão demonstradas no quadro 3.

b) **Esôfago de Barrett** (grupo II)

Para a definição histológica do esôfago de Barrett, considerou-se fundamental e necessária a presença do epitélio colunar metaplásico, definido pela presença das células caliciformes no epitélio colunar, substituindo o epitélio escamoso estratificado do esôfago, em qualquer extensão do órgão, e sendo, indubitavelmente, positivas a coloração padrão com HE. Epitélios colunares com células pseudocaliciformes não foram incluídos no estudo.

c) **Adenocarcinoma esofágico associado ao esôfago de Barrett** (grupo III)

As alterações citológicas e arquiteturais definidas na microscopia óptica, após coloração com HE, foram, para o adenocarcinoma esofágico, estabelecidas pela classificação de tumores da Organização Mundial da Saúde (OMS)¹³⁴.

Quadro 3. Características histológicas das biópsias endoscópicas nos portadores de DRGE.

- **Úlceras, erosão, tecido de granulação.**
- **Dilatação e congestão de vasos papilares.**
- **Exocitose de células inflamatórias no epitélio escamoso:**
 - **Neutrófilos.**
 - **Eosinófilos.**
 - **Linfócitos.**
- **Alterações epiteliais escamosas:**
 - **Hiperplasia de células basais.**
 - **Alongamento de cones interpapilares.**

Fonte : DeNardi & Riddel¹³⁷

2.3.3 Critérios de inclusão

Foram selecionadas e incluídas no estudo as amostras das lâminas dos pacientes com os seguintes diagnósticos endoscópicos e anatomopatológicos: esofagite por refluxo (grupo I), esôfago de Barrett (grupo II) e adenocarcinoma associado ao esôfago de Barrett (grupo III), de ambos os sexos, conforme os critérios estabelecidos nos itens 2.3.1 e 2.3.2.

2.3.4 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo aqueles pacientes que se recusaram a participar, aqueles em uso de antiinflamatórios ou de inibidores da bomba de prótons, em tratamento quimioterápico ou radioterápico, e os que não se enquadraram nos critérios endoscópicos e anatomopatológicos definidos nos itens 2.3.1 e 2.3.2.

2.4 Caracterização da amostra

Os casos do presente estudo foram do Estado da Paraíba e de Pernambuco (três casos do grupo III), sendo a maioria residente na cidade de João Pessoa. Foram selecionados, entre julho de 1994 e setembro de 2005. Ao final das avaliações dos prontuários, verificou-se que 64 pacientes satisfaziam os critérios de inclusão e exclusão definidos previamente, sendo então distribuídos, segundo os objetivos do estudo, em três grupos:

- ❖ **Grupo I:** esofagite por refluxo: 23 pacientes;
- ❖ **Grupo II:** esôfago de Barrett sem displasia: 30 pacientes;

❖ **Grupo III:** adenocarcinoma esofágico associado com o esôfago de Barrett:

11 pacientes.

As análises anatomopatológicas foram inicialmente realizadas nos Laboratórios Médicos de Patologia Celular, Virchow e Histo (02 casos) em João Pessoa, e SPAC (03 casos) em Recife, no mesmo período previamente descrito. Os estudos imunoistoquímicos foram todos procedidos posteriormente no Laboratório Virchow, no período de outubro de 2005 a janeiro de 2006.

2.5 Procedimentos e técnicas

2.5.1 Dados clínicos

Dados referentes à idade, sexo, queixa principal e tempo da sintomatologia foram coletados a partir das informações dos prontuários em arquivo e registrados em protocolo próprio (Anexo 1), sendo então cruzados entre si.

2.5.2 Procedimento endoscópico

As endoscopias digestivas foram, na maioria, realizadas pelo autor deste trabalho - GNS, segundo as normas e padrões técnicos da Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva (SOBED), com videoendoscópio padrão Pentax®-EG2901 e processadora Pentax®-EPM

3000, exceto em sete casos do grupo III, que foram realizados por endoscopistas do aparelho digestório, de outras clínicas privadas de João Pessoa e Recife, respectivamente.

O exame foi procedido após jejum prévio de oito horas, com o paciente em decúbito lateral esquerdo, sob sedação venosa leve (quando assim indicada). A realização das biópsias foi efetuada com a pinça padrão da Pentax® (7mm de tamanho e fenestrada).

No grupo I (esofagite por refluxo) e no grupo III (adenocarcinoma relacionado com o esôfago de Barrett), as biópsias foram procedidas diretamente sobre a lesão. No grupo II (esôfago de Barrett), as biópsias foram realizadas cranialmente, em pontos equidistantes, iniciando às doze, três, seis e nove horas, progressivamente a cada 1,0cm, no epitélio de Barrett circunferencial, ou, diretamente, sobre a projeção parcial da mucosa tipo gástrica acima do limite cranial da prega gástrica, no epitélio de Barrett parcial, também no sentido cranial, até a neojunção escamo-colunar, em ambas as situações.

As medidas da extensão do epitélio de Barrett, e dos locais para a realização das biópsias, foram realizadas considerando-se, indiretamente, a distância do endoscópio observada na topografia dos dentes incisivos centrais.

Os espécimens de biópsias, colhidos durante o procedimento endoscópico, foram imediatamente imersos em solução tamponada de formaldeído a 10%, sendo então devidamente identificados e encaminhados para estudo histopatológico.

2.5.3 Procedimento anatomopatológico

O estudo anatomopatológico de todos os pacientes, previamente ao estudo imunoistoquímico, foi realizado pela orientadora desse trabalho, MSTA, em microscopia óptica, abrangendo técnicas histológicas convencionais. Outro patologista, AFLJ, foi convocado para uma segunda análise, de forma que os resultados finais do estudo histológico fornecessem um diagnóstico consensual.

Os espécimens de biópsias endoscópicas foram recebidos para exame, devidamente identificados e imersos em solução tamponada de formaldeído a 10%. O processamento histotécnico incluiu etapas sucessivas de desidratação e diafanização das amostras teciduais, antecedendo o emblocamento em parafina. Cortes histológicos foram efetuados no micrótomo rotativo manual, com a espessura de 3 a 4 micrômetros, perpendiculares à superfície da mucosa, e, posteriormente, submetidos a coloração por solução de HE e montagem de lâminulas em Entellan (Merck 1,07961).

2.5.4 Técnica imunoistoquímica

O estudo imunoistoquímico foi realizado pela mesma equipe de profissionais, precedentemente enunciada, que emitiu, individualmente, sua interpretação para cada imunorreação efetuada. Os casos de discordância foram reavaliados conjuntamente pelos dois patologistas, de modo a se obter pareceres consensuais, nos escores aplicados aos resultados finais.

A técnica imunoistoquímica empregada seguiu protocolo da SBP, adaptada às condições laboratoriais locais. Efetuaram-se cortes histológicos com espessura variável de 3 a 4 micrômetros, dispostos em lâminas previamente revestidas com solução a 4% de dimetiletoxissilano (Sigma A3648) e acetona. A desparafinização ocorreu em estufa a 60°C, por 24 horas, com posterior submissão do material a banhos sucessivos de imersão em xilol, álcool e água corrente. Procedida a inibição das peroxidases endógenas, em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol durante 10 minutos, todos os cortes histológicos foram submetidos ao processo de recuperação antigênica, em solução de citrato 10mM / pH 6,0, através da exposição das amostras ao calor úmido, utilizando-se banho-maria específico para esse tipo de procedimento, a uma temperatura de 96°C. Após esfriamento e lavagens em PBS (solução salina tamponada com fosfato 0,01M / pH 7,4), realizou-se incubação em câmara úmida, com o anticorpo secundário, durante 20 minutos, a uma temperatura ambiente. Subseqüentemente, procedeu-se incubação das amostras com os anticorpos monoclonais selecionados para o presente estudo, diluídos em solução PBS, conforme discriminados no quadro 4. A incubação foi realizada também em câmara úmida, *overnight*, a 4°C. No processo de revelação utilizou-se o Complexo Estreptavidina-biotina-peroxidase (Kit StrepABC-Vectastain®) e solução reveladora substrato-cromógeno DAB plus (diaminobenzidina). Controles positivos e negativos, internos e externos, atestaram a fidelidade da reação. Ao final, as lâminas foram contracoradas por hematoxilina de Harris e montadas com lamínulas em Entellan (Merck 1,07961), para leitura em microscopia óptica comum.

Os resultados foram considerados positivos quando apareceram colorações ou granulações castanho-douradas, nos citoplasmas ou núcleos celulares.

Os anticorpos utilizados, as diluições e o fabricante encontram-se sumarizados no quadro 4.

Em todas as amostras definidas para os três grupos, foi realizado, individualmente, o painel dos seguintes biomarcadores moleculares: p53, c-erbB-2, a E-caderina, o COX-2 e o Ki-67.

Quadro 4. Anticorpos monoclonais utilizados na técnica imunoistoquímica.

Anticorpo	Clone	Diluição	Origem
p53	PAb240	1:200	Dako
Ki-67	MIB 1	1:200	Dako
c-erbB-2	Produto de oncogene	1:400	Dako
E-caderina	NCH-38	1:200	Dako
COX-2	CX-294	1:100	Dako

2.5.5 Metodologia da descrição dos resultados

a) Dados clínicos e endoscópicos

Foram obtidos e tabulados para cada grupo conforme o preenchimento do modelo de ficha tipo A (Anexo 1).

b) Análise anatomopatológica

A análise histológica dos fragmentos das biópsias endoscópicas, juntamente com as informações dos laudos da endoscopia digestiva, definiram e classificaram os pacientes dentro dos três grupos de estudo, para posterior análise imunoistoquímica, conforme o modelo de ficha tipo B (Anexo 1).

c) Análise imunoistoquímica

Na análise imunoistoquímica de todos os imunomarcadores teciduais (antígeno de proliferação celular Ki-67, gene de supressão tumoral p53, E-caderina, COX-2 e o proto-oncogene c-erbB-2), foram obedecidos a metodologia de interpretação descrita a seguir, e preenchidos conforme o modelo de ficha tipo B (Anexo 1), com base nos critérios descritos em 2001, por Morris et al.¹³⁸.

1) Biomarcadores teciduais nucleares: p-53 e Ki-67

Os resultados da imunorreação em cada grupo foram definidos separadamente, mediante uma escala com nível de mensuração ordinal, baseada na intensidade da imunomarcção nuclear, com escore variável de 0+ a 4+, avaliada de forma semiquantitativa, pela qualidade da expressão antigênica em células glandulares, conforme o que está descrito a seguir:

- ❖ 0+ = Marcação negativa ou ausência de expressão;
- ❖ 1+ = Marcação positiva focal;
- ❖ 2+ = Marcação positiva multifocal;
- ❖ 3+ = Marcação positiva: moderada e difusa;
- ❖ 4+ = Marcação positiva intensa.

O padrão de expressão também foi definido, de forma semiquantitativa, por meio da média de uma análise percentual dos núcleos imunomarcados, sobre uma total de cem células, em quatro campos de grande aumento por lâmina, categorizados em escore variável de 1 a 4, conforme o que está descrito a seguir:

- ❖ 1 = <25% de núcleos imunomarcados;
- ❖ 2 = 25-50% de núcleos imunomarcados;
- ❖ 3 = >50-75% de núcleos imunomarcados;
- ❖ 4 = > 75% de núcleos imunomarcados.

2) Biomarcadores teciduais citoplasmáticos : COX-2 e E-caderina.

Os resultados da imunorreação em cada grupo foram definidos separadamente, mediante uma escala com nível de mensuração ordinal, baseada na intensidade da imunomarcção citoplasmática, com escore variável de 0+ a 4+, avaliada de forma semiquantitativa, pela qualidade da expressão antigênica em células glandulares.

- ❖ 0+ = Marcação negativa ou ausência de expressão;
- ❖ 1+ = Marcação positiva focal;
- ❖ 2+ = Marcação positiva multifocal;
- ❖ 3+ = Marcação positiva: moderada e difusa;
- ❖ 4+ = Marcação positiva intensa.

O padrão de expressão também foi definido, de forma semiquantitativa, por meio da média de uma análise percentual de células com expressão antigênica citoplasmática, sobre uma total de cem células, em quatro campos de grande aumento, por lâmina, categorizadas em escore variável de 1 a 4, conforme o que está descrito a seguir:

- ❖ 1 = <25% células com marcação citoplasmática;
- ❖ 2 = 25-50% células com marcação citoplasmática;
- ❖ 3 = >50-75% células com marcação citoplasmática;
- ❖ 4 = > 75% células com marcação citoplasmática.

A qualidade da imunomarcção (escore 0, 1, 2, 3, 4) e o escore percentual supradescrito, correspondente a 1, 2, 3 e 4, foram multiplicados entre si, de forma que se obteve um escore semiquantitativo final para os imunomarcadores descritos acima, cujos

resultados deverão variar, no mínimo de zero a, no máximo, dezesseis, obtendo-se então um escore final para cada biomarcador, com a seguinte pontuação:

- ❖ Marcação Ausente - 0 ponto;
- ❖ Marcação Fraca - 1, 2 e 3 pontos;
- ❖ Marcação Moderada - 4, 6 e 8 pontos;
- ❖ Marcação Forte - 9 , 12 e 16 pontos.

Para a validação do escore de cada lâmina, os procedimentos descritos foram efetuados por dois patologistas, objetivando identificar possíveis variações entre os observadores. Para tanto, os dados resultantes da análise histológica foram omitidos para o segundo observador, de forma que não influíssem nos resultados. Nos casos de discrepância, os resultados foram também reavaliados conjuntamente pelos dois patologistas, para que houvesse um escore consensual final.

3) Biomarcador tecidual: c-erbB-2

Os resultados da imunorreação, em cada grupo, foram definidos separadamente, por meio de uma escala com nível de mensuração ordinal, baseada na intensidade da imunomarcção de membrana citoplasmática de células glandulares, com escores variáveis de 0+ a 4+, conforme o que está descrito a seguir:

- ❖ 0+= Ausência de marcação de membrana celular ou marcação apenas citoplasmática;

- ❖ 1+= Marcação focal ou fracamente perceptível, em membranas celulares. Este padrão é, imunoistoquimicamente, reportado como negativo;
- ❖ 2+= Marcação moderada de membrana, na maioria das células;
- ❖ 3+= Forte marcação de membrana celular (superexpressão).

2.6 Limitações metodológicas do estudo

- a) Como os dados foram obtidos a partir dos prontuários médicos, algumas informações não estavam disponíveis por completo;
- b) Possíveis fontes de vieses:
 - ❖ Viés de seleção: heterogeneidade da amostra em relação ao sexo, idade, tempo de duração dos sintomas, queixas clínicas e extensão do epitélio de Barrett;
 - ❖ Viés de classificação: pacientes no grupo de esofagite por refluxo com diferentes graus de severidade de esofagite (graus: I, II, III e IV);
 - ❖ Viés de aferição e interpretação:
 - ◆ Pelo endoscopista na extensão do epitélio de Barrett;
 - ◆ Pelo anatomopatologista na análise semiquantitativa da imunorreação;
- c) Não foram identificados fatores de confusão no presente estudo.

2.7 Aspectos Éticos do estudo

O presente estudo foi realizado após a aprovação e autorização do Comitê de Ética em Pesquisa, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, com a certidão sob o número de protocolo 111/05, aprovado no dia 25 de maio de 2005 (Anexo 2).

As análises dos dados clínicos nos prontuários médicos e os exames laboratoriais, anatomopatológicos e imunoistoquímicos, só foram procedidos após os pacientes e/ou responsáveis assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 3).

2.8 Análise estatística

Todos os dados dos pacientes foram preenchidos e tabulados conforme os modelos de ficha anexos (fichas–padrão, tipo A e B) - (Anexo 1).

Os resultados da imunorreação dos biomarcadores teciduais, em cada grupo, foram definidos, separadamente, mediante uma escala com nível de mensuração ordinal. A análise comparativa entre os grupos foi realizada através do teste exato de Fisher (distribuição do sexo), do *Score test* de tendência (positividade dos biomarcadores teciduais), da análise de variância (comparação da idade) e do teste de Kruskal–Wallis (comparação do tempo de queixas e dos escores finais de imunoexpressão tecidual dos biomarcadores). As comparações pareadas foram realizadas com o teste de Marascuillo, teste de Dunn e o teste de Tukey. O teste binomial foi utilizado para verificar se entre os pacientes com adenocarcinoma esofágico, acima de 50% deles apresentavam neoplasia avançada. Igualmente, este mesmo teste foi utilizado para verificar se, no grupo III, mais de 50% dos pacientes eram do sexo masculino. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

3.1 Dados clínicos

Neste estudo foram incluídos 64 pacientes: 39 (60,9%) do sexo masculino e 25 (39,1%) do feminino, com a média de idade de 52,3 anos, variando de 13 a 87 anos. Foram distribuídos em 03 grupos, sendo 23 no grupo I, 30 no grupo II, e 11 no grupo III. Os dados referentes à distribuição por sexo, idade, queixas clínicas e duração da queixa principal, em cada grupo, encontram-se discriminados, respectivamente, nas tabelas 1, 2 e 3. Não foi possível recuperar as informações clínicas de um paciente do grupo III.

O resultado da análise da variância mostra que as médias das idades dos pacientes apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p=0,011$). O resultado do teste de comparações múltiplas de Tukey indica que só a média de idade do grupo III apresentou diferença significativa em relação às médias do grupo I ($p=0,021$) e do grupo II ($p=0,012$), respectivamente. Entre os grupos I e II não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$).

Em relação à análise comparativa entre os grupos, para distribuição do sexo, através do teste exato de Fisher, observa-se que não houve homogeneidade nas amostras ($p=0,048$). O teste de Marascuillo mostra que a proporção de homens foi significativamente maior no grupo III, em comparação com o grupo I ($p=0,030$). Em relação aos outros pares de grupos, as diferenças não foram significantes (grupo I vs grupo II: $p=0,997$; grupo II vs grupo III: $p=0,090$). O resultado do teste binomial indica que, no grupo III, a proporção de pacientes do sexo masculino foi significativamente maior do que 50,0% ($p = 0,012$).

Na análise estatística da duração das queixas, o resultado do teste de Kruskal–Wallis indica que houve diferenças significantes entre os três grupos de pacientes ($p=0,004$). As comparações pareadas, realizadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, mostraram que o grupo III apresentou uma distribuição de tempo de queixas significativamente diferente

daquelas observadas nos grupos I e II (grupo III vs grupo I: $p=0,026$; grupo III vs grupo II: $p<0,001$); entre os grupos I e II a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,172$).

Tabela 1. Dados clínicos dos pacientes do **grupo I** (esofagite por refluxo).

Dados clínicos	<i>n</i>	%
Pacientes	23	
Sexo		
Masculino	13	
Feminino	10	
Idade em anos (média)	13-86 (49,9)	
Queixa principal		
Pirose	17	73,9
Epigastralgia	11	47,8
Regurgitação	8	34,8
Vômitos	4	17,4
Sensação de entalo	4	17,4
Odinofagia	2	8,7
Dor torácica de origem	2	8,7
não-cardíaca (DTNC)		
Dor abdominal	2	8,7
Outros*	4	17,4
Tempo de história clínica		
Dias (< 30)	5	21,7
Meses (01-12)	7	30,4
Anos (> 01)	11	47,8

*Outros: náuseas, empachamento, faringite e emagrecimento.

Fonte: fichas clínicas dos pacientes (arquivo privado).

Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes do **grupo II** (esôfago de Barrett).

Dados clínicos	<i>n</i>	%
Pacientes	30	
Sexo		
Masculino	16	
Feminino	14	
Idade em anos (média)	23-77 (49,5)	
Queixa principal		
Pirose	21	70,0
Epigastralgia	13	43,3
Regurgitação	6	20,0
Plenitude gástrica	3	10,0
Tosse seca	3	10,0
Pigarro	2	6,7
Disfagia	1	3,3
Odinofagia	1	3,3
Dor torácica de origem	1	3,3
não-cardíaca (DTNC)		
Globo faríngeo	1	3,3
Tempo de história clínica		
Dias (< 30)	2	6,7
Meses (01-12)	9	30,0
Anos (> 01)	19	63,3

Fonte: fichas clínicas dos pacientes (arquivo privado).

Tabela 3. Dados clínicos dos pacientes do **grupo III** (adenocarcinoma relacionado com o esôfago de Barrett).

Dados clínicos	<i>n</i>	%
Pacientes	<i>11</i>	
Sexo		
Masculino	10	
Feminino	1	
Idade em anos (média)	45-87 (64,73)	
Queixa principal		
Disfagia	8	72,7
Emagrecimento	5	45,5
Epigastralgia	2	18,2
Vômitos	1	9,09
Hemorragia digestiva alta	1	9,09
Pirose/Regurgitação	1	9,09
Não disponível	1	9,09
Tempo de história clínica		
Dias (< 30)	5	45,45
Meses (01-12)	4	36,36
Anos (> 01)	1	9,09

Fonte: fichas clínicas dos pacientes (arquivo privado).

3.2 Dados endoscópicos

Os dados referentes aos resultados das endoscopias digestivas altas, realizadas nos três grupos do presente estudo, encontram-se discriminados nas tabelas 4, 5 e 6, respectivamente. Entre os 11 pacientes do grupo III, portadores de adenocarcinoma esofágico, 8 (72,7%) apresentaram aspecto endoscópico de lesão avançada e 3 (27,3%) de lesão superficial. O resultado do teste binomial indica que a proporção de adenocarcinoma esofágico avançado não foi significativamente maior do que 50,0% ($p=0,227$). A média da extensão do epitélio de Barrett, no grupo II, entre os 30 pacientes estudados, foi igual a 2,53cm, variando de 1 a 11cm.

Tabela 4. Dados endoscópicos dos pacientes com esofagite por refluxo (**grupo I**).

Esofagite por refluxo	<i>n</i>	%
Pacientes	23	
Grau I	12	52,2
Grau II	4	17,4
Grau III	3	13,0
Grau IV	4	17,4
Grau V	0	0

Fonte: fichas clínicas dos pacientes (arquivo privado); classificação de esofagite por refluxo de Savary-Miller modificada: Breyer & Maguilnik¹³⁵

Tabela 5. Dados endoscópicos dos pacientes com esôfago de Barrett (**grupo II**).

Esôfago de Barrett	<i>n</i>	%
Pacientes	30	
Extensão do epitélio de Barrett (cm)		
01 a 03cm	25	83,3
> 03cm	5	16,7

Fonte: fichas clínicas dos pacientes (arquivo privado).

Tabela 6. Dados endoscópicos dos pacientes com adenocarcinoma esofágico relacionado com o esôfago de Barrett (**grupo III**).

Adenocarcinoma esofágico relacionado com o esôfago de Barrett	<i>n</i>	<i>%</i>
Pacientes	<i>11</i>	
Classificação endoscópica*		
Tipo 0 Superficial (polipóide, elevado, plano, deprimido, ulcerado)	3	27,3
Tipo 1 Avançado (polipóide de base larga)	1	9,1
Tipo 3 Avançado (ulcerado, de bordas infiltrativas)	7	63,6

Fonte: fichas clínicas dos pacientes (arquivo privado); classificação endoscópica da Associação Japonesa do Câncer Gástrico também aplicada para o Carcinoma Esofágico¹⁴⁶.

3.3 Dados imunoistoquímicos

O resultado da positividade e da negatividade da imunoexpressão tecidual dos seguintes biomarcadores: p53, COX-2 e c-erbB-2, em todos os grupos de estudo do presente trabalho, encontra-se discriminado, em uma análise isolada, nas tabelas 7, 8 e 9 e nos gráficos 1, 2 e 3 e, de uma forma agrupada, no gráfico 4, respectivamente. Exemplos das imunorreações destes três biomarcadores analisados, nos três grupos do presente estudo, encontram-se ilustrados, respectivamente nas figuras 1, 2 e 3 (p53); 4, 5 e 6 (COX-2) e 7 e 8 (c-erbB-2).

Observa-se que houve uma significativa tendência monotônica de crescimento na positividade, de todos os biomarcadores, do grupo I para o grupo II e, finalmente para o grupo III [*Score test*: $p < 0,001$ (p53); $p = 0,002$ (COX-2) e $p < 0,001$ para o c-erbB-2].

Em relação ao oncogene p53, os resultados do teste de Marascuillo revelam que as diferenças de positividade entre os três grupos foram significantes (grupo I vs grupo II: $p = 0,010$; grupo I vs grupo III: $p < 0,001$; grupo II vs grupo III: $p = 0,001$). No biomarcador COX-2, só a diferença entre o grupo I e o grupo II não foi estatisticamente significativa (grupo I vs grupo II: $p = 0,431$; grupo I vs grupo III: $p < 0,001$; grupo II vs grupo III: $p = 0,005$). No que diz respeito ao c-erbB-2, as diferenças na positividade entre os três grupos foram significantes (grupo I vs grupo II: $p < 0,001$; grupo I vs grupo III: $p < 0,001$ e grupo II vs grupo III: $p = 0,001$).

Tabela 7. Imunoexpressão tecidual do p53 em todos os grupos analisados.

Grupo	n	p53 positivo		p53 negativo	
		n	%	n	%
Esofagite por refluxo – I	23	5	21,74	18	78,26
Esôfago de Barrett – II	30	19	63,33	11	36,66
Adenocarcinoma associado ao esôfago de Barrett - III	11	11	100,0	0	0

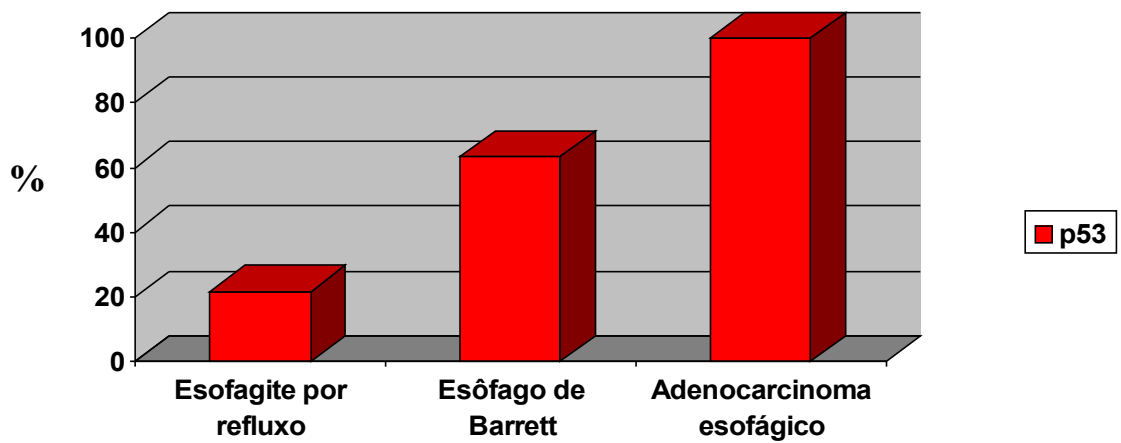


Gráfico 1. Imunoexpressão tecidual do p53 em todos os grupos do estudo.

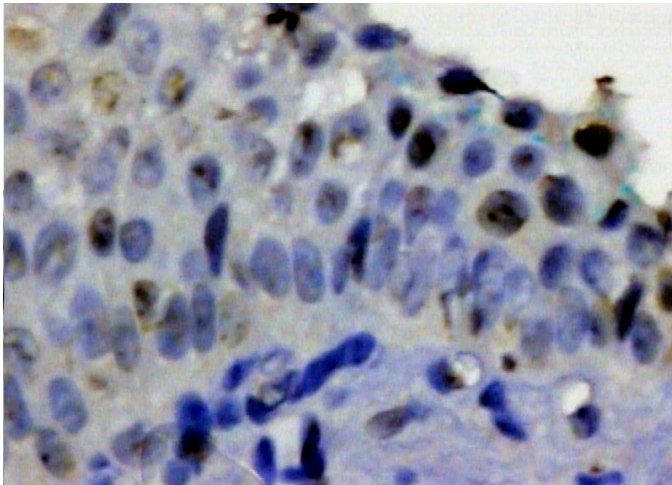


Figura 1. Imunoexpressão fraca e focal da proteína p53 na esofagite por refluxo (400X).

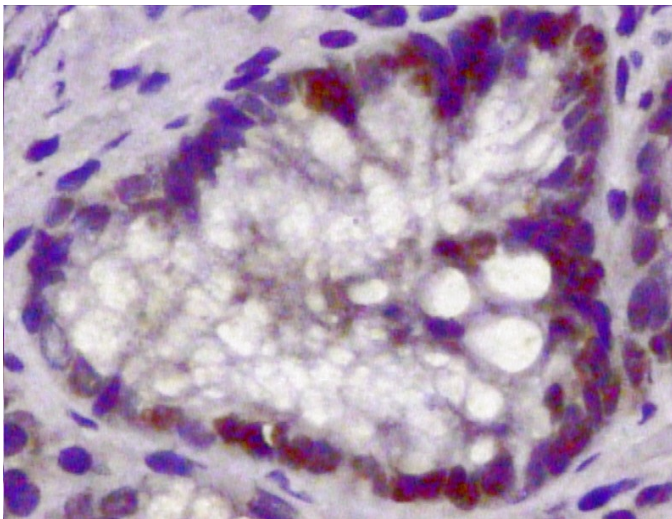


Figura 2. Imunomarcacão do p53 no esôfago de Barrett (400X).

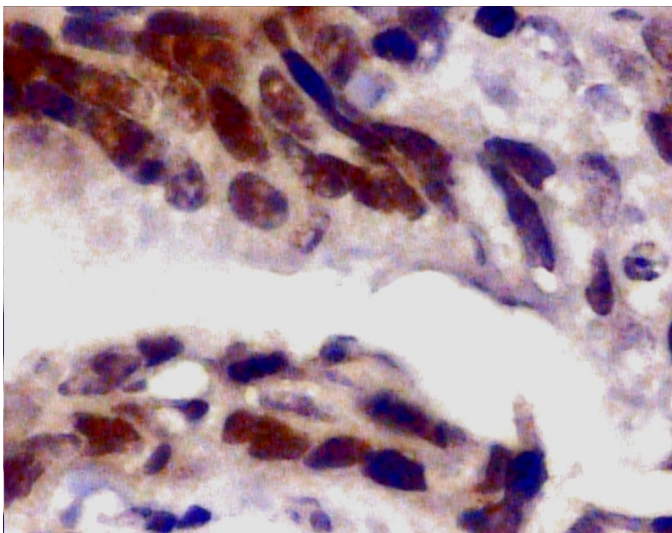


Figura 3. Forte imunoexpressão do oncôgeno p53 no adenocarcinoma esofágico (400X).

Tabela 8. Imunoexpressão tecidual da COX-2 em todos os grupos analisados.

Grupo	n	COX-2 positivo		COX-2 negativo	
		n	%	n	%
Esofagite por refluxo – I	23	11	47,83	12	52,17
Esôfago de Barrett – II	30	21	70,0	9	30,0
Adenocarcinoma associado ao esôfago de Barrett - III	11	11	100,0	0	0

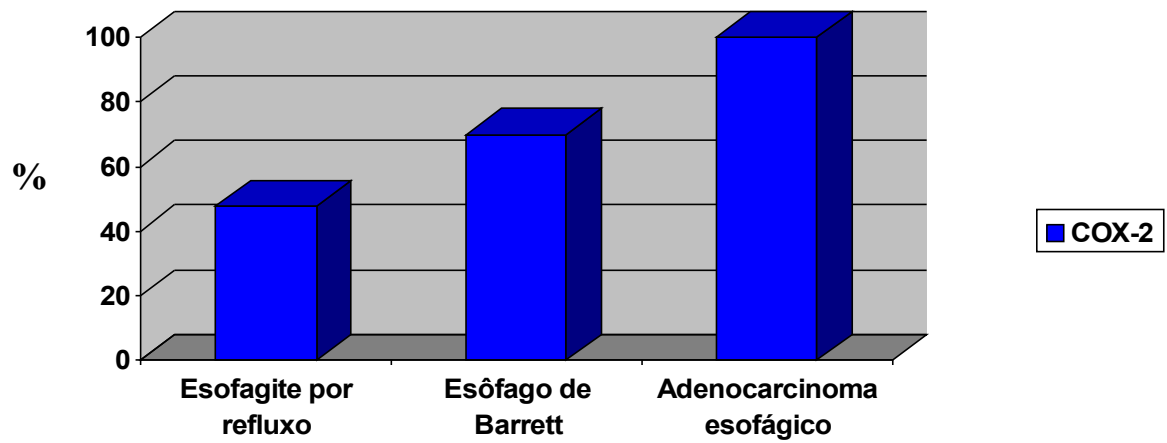


Gráfico 2. Imunoexpressão tecidual da COX-2 em todos os grupos analisados.

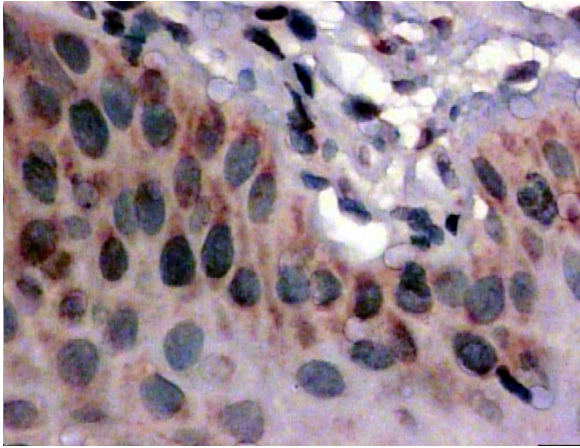


Figura 4. Imunoexpressão da COX-2, na esofagite por refluxo (400X).

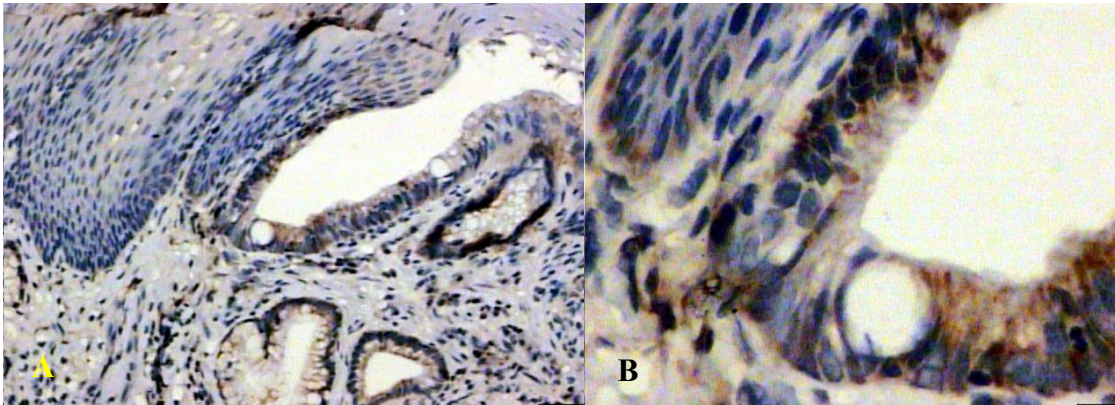


Figura 5. COX-2 - imunoexpressão citoplasmática, no epitélio glandular do esôfago de Barrett: 100X(A) e 400X(B).

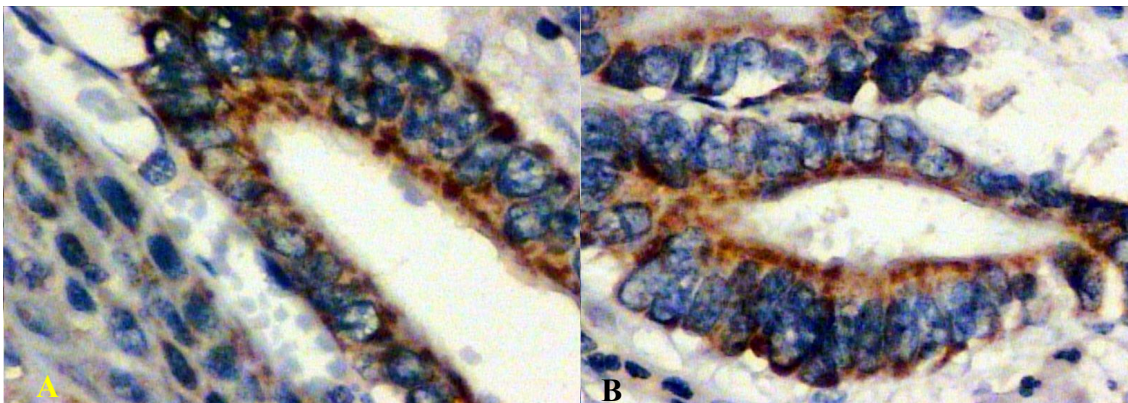


Figura 6. Imunoexpressão acentuada da COX-2, no adenocarcinoma esofágico(400X), e fraca marcação no controle interno (epitélio escamoso).

Tabela 9. Imunoexpressão tecidual do c-erbB-2, em todos os grupos analisados.

Grupo	n	c-erbB-2 positivo		c-erbB-2 negativo	
		n	%	n	%
Esofagite por refluxo – I	23	1	4,35	22	95,65
Esôfago de Barrett – II	30	19	63,34	11	36,66
Adenocarcinoma associado ao esôfago de Barrett - III	11	11	100,0	0	0

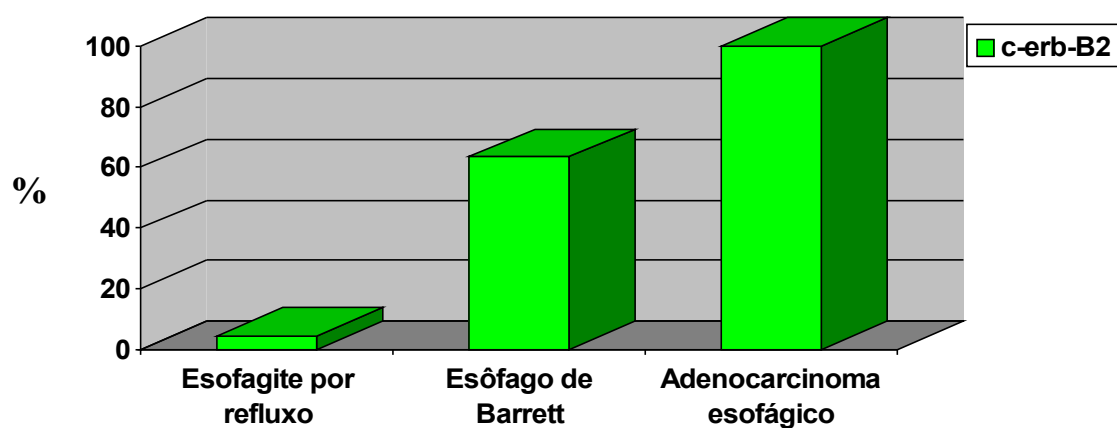


Gráfico 3. Imunoexpressão tecidual do c-erbB-2, em todos os grupos estudados.

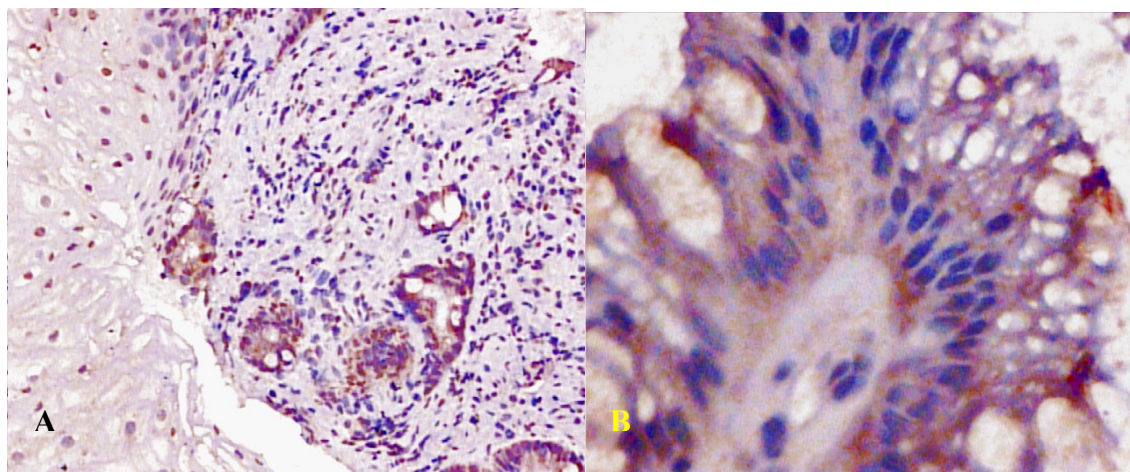


Figura 7. c-erbB-2 - imunexpressão citoplasmática, sem forte marcação de membrana epitelial, no esôfago de Barrett - A(100X) e B(400X).

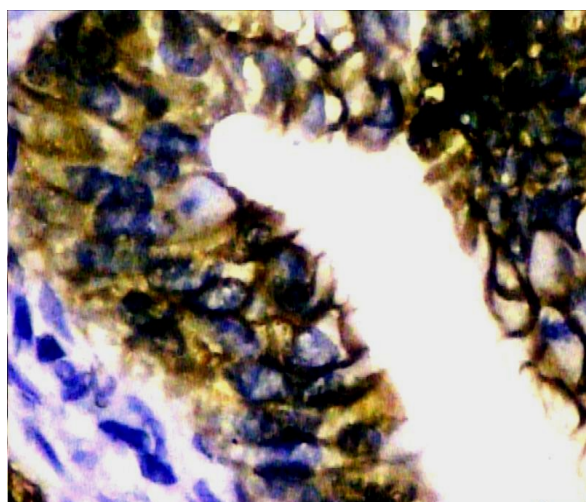


Figura 8. Forte imunexpressão (citoplasmática e de membrana) da oncoproteína c-erbB-2, no adenocarcinoma esofágico (400X).

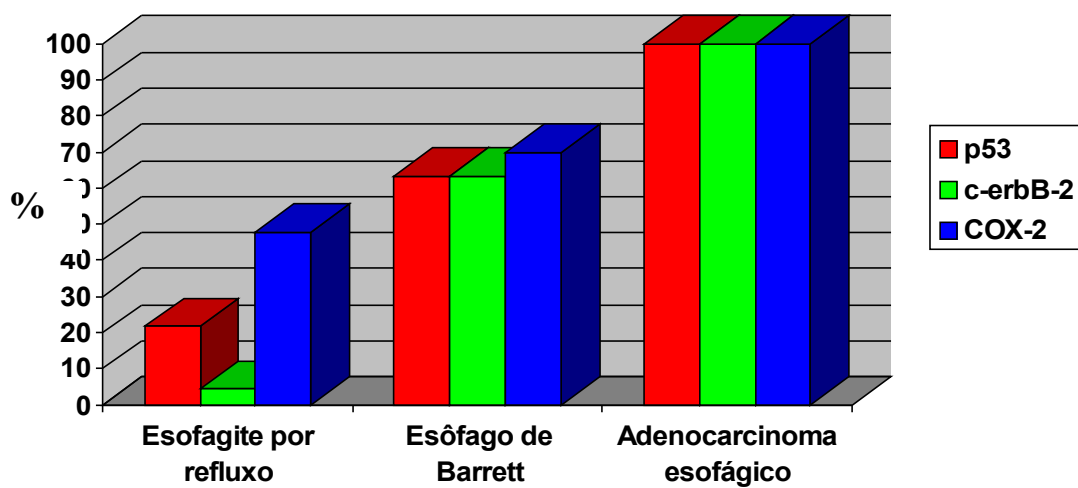


Gráfico 4. Análise agrupada da positividade tecidual dos biomarcadores p53, c-erbB-2 e COX-2, nos três grupos do estudo.

O padrão de expressão do p53 também foi analisado de uma forma estratificada e semiquantitativa (escore final), nos três grupos estudados, quanto à intensidade da imunomarcção nuclear, com os resultados demonstrados na tabela 10.

O resultado do teste de Kruskal–Wallis indica que houve diferenças significantes entre os três grupos de pacientes em relação ao escore final ($p < 0,001$). As comparações pareadas, realizadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, indicam que os escores mais altos ocorreram com freqüências que aumentaram em consonância com o espectro da gravidade dos grupos envolvidos (esofagite por refluxo < esôfago de Barrett < adenocarcinoma esofágico): grupo I vs grupo II: $p = 0,018$; grupo I vs grupo III: $p < 0,001$; grupo II vs grupo III: $p < 0,001$.

Tabela 10. Escore final da imunoexpressão tecidual do p53 em todos os grupos analisados.

Grupo	<i>n</i>	Escore final							
		ausente		fraco		moderado		forte	
		(0)		(1-2-3)		(4-6-8)		(9-12-16)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Esofagite por refluxo - I	23	18	78,3	5	21,7	0	0	0	0
Esôfago de Barrett - II	30	11	36,7	19	63,3	0	0	0	0
Adenocarcinoma associado ao esôfago de Barrett - III	11	0	0	1	9,1	3	27,3	7	63,3

Na tabela 11, observa-se o escore final da COX-2 nos três grupos estudados, quanto à intensidade da imunomarcção citoplasmática.

O resultado do teste de Kruskal–Wallis indica que houve diferenças significativas entre os três grupos de pacientes ($p < 0,001$). As comparações pareadas, realizadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, revelam que os grupos I e II apresentaram comportamento homogêneo, quanto aos escores obtidos, porém, no grupo III, os escores maiores ocorreram com frequências mais altas em comparação com os grupos I e II. Nestes dois grupos, os escores mais baixos foram mais frequentes (grupo I vs grupo III: $p < 0,001$; grupo II vs grupo III: $p < 0,001$).

Tabela 11. Escore final da imunoexpressão tecidual da COX-2 em todos os grupos do estudo.

Grupo	<i>n</i>	Escore final							
		ausente		fraco		moderado		forte	
		(0)		(1-2-3)		(4-6-8)		(9-12-16)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Esofagite por refluxo – I	23	12	52,2	7	30,4	4	17,4	0	0
Esôfago de Barrett – II	30	9	30,0	15	50,0	5	16,7	1	3,3
Adenocarcinoma associado ao esôfago de Barrett - III	11	0	0	0	0	5	45,5	6	54,5

O imunomarcador c-erbB-2 apresentou um perfil de marcação mais tardio, de forma que somente 1 paciente no grupo I, de um total de 23 (4,35%), foi fracamente positivo. No grupo II a positividade foi a de 63,33% e, no grupo III, todos os pacientes (100%) apresentaram imunoexpressão (tabela 12 e gráfico 3).

O resultado do teste de Kruskal–Wallis indica que houve diferenças significantes entre os três grupos de pacientes em relação ao escore final ($p < 0,001$). As comparações pareadas, realizadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, mostram que os escores mais altos ocorreram com frequências que aumentaram progressivamente, a partir do grupo I (grupo I vs grupo II: $p = 0,018$; grupo I vs grupo III: $p < 0,001$; grupo II vs grupo III: $p < 0,001$).

Tabela 12. Escore da imunoexpressão tecidual do c-erbB-2 nos três grupos analisados.

Grupo	<i>n</i>	Escore							
		ausente		fraco		moderado		forte	
		+		++		+++		++++	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Esófagite por refluxo - I	23	22	95,7	1	4,3	0	0	0	0
Esôfago de Barrett - II	30	11	36,7	13	43,3	4	13,3	2	6,7
Adenocarcinoma associado ao esôfago de Barrett - III	11	0	0	1	9,1	2	18,2	8	72,7

Na análise da imunoexpressão tecidual do Ki-67, qualitativa e semiquantitativa, observou-se que o biomarcador foi positivo nos três grupos analisados, não havendo imunoexpressão negativa. Nas figuras 9, 10 e 11, observam-se exemplos da imunomarcacão do Ki-67, e, no gráfico 5, assinala-se o escore semiquantitativo deste biomarcador, em todos os grupos de estudo, respectivamente.

O resultado do teste de Kruskal–Wallis indica que houve diferenças significantes entre os três grupos de pacientes, em relacão ao escore final ($p<0,001$). As comparações pareadas, realizadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, revelam que os grupos I e II apresentaram comportamento homogêneo quanto aos escores obtidos, porém, no grupo III, os escores maiores (positivos fortes: 9, 12 e 16) ocorreram com frequências mais altas em comparacão com os grupos I e II. Nestes dois grupos, os escores mais baixos foram os mais freqüentes (grupo I vs grupo III: $p<0,001$; grupo II vs grupo III: $p<0,001$) - tabela 13.

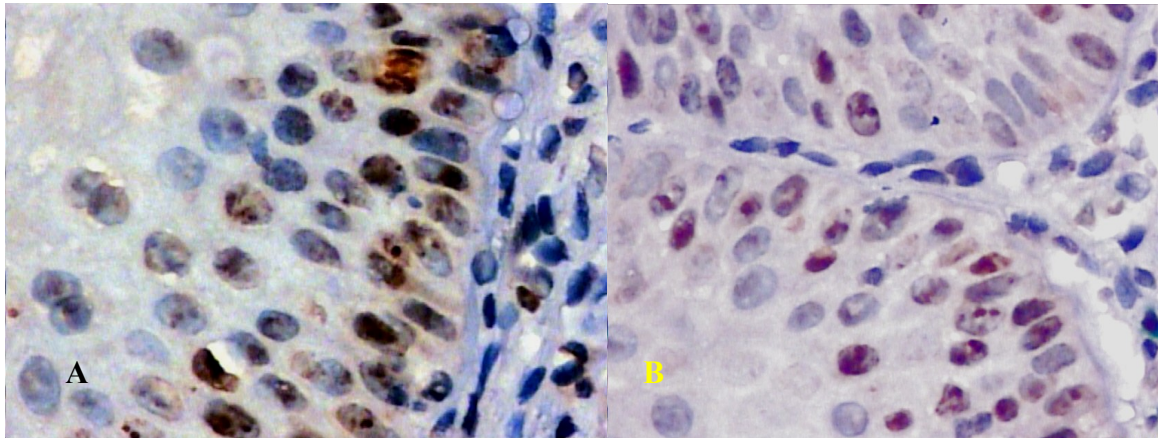


Figura 9. Ki-67 – atividade proliferativa da camada basal do epitélio malphigiano, na esofagite por refluxo (A–B:400X).

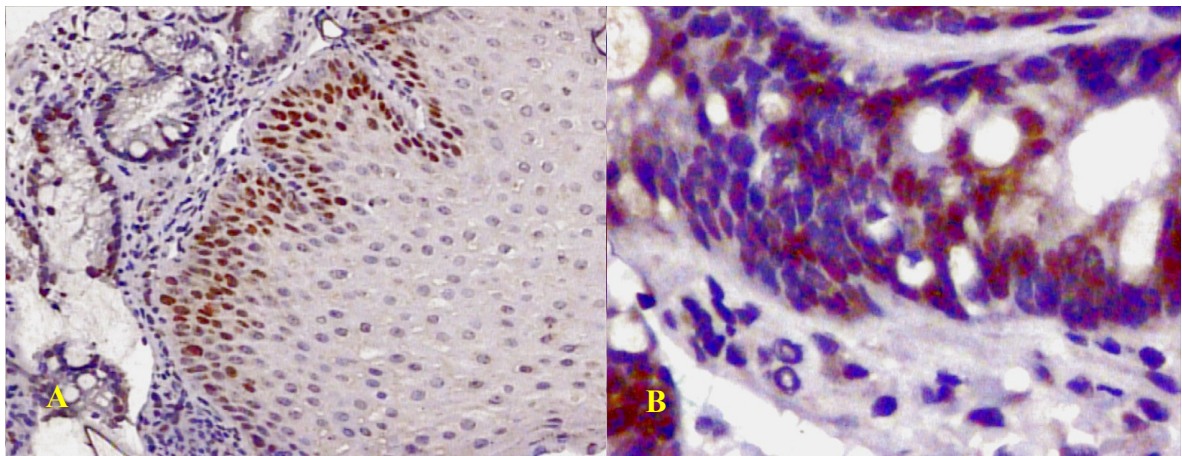


Figura 10. Expressão nuclear do Ki-67, no esôfago de Barrett e na atividade proliferativa basal do epitélio escamoso esofágico (A - 100X; B - 400X).

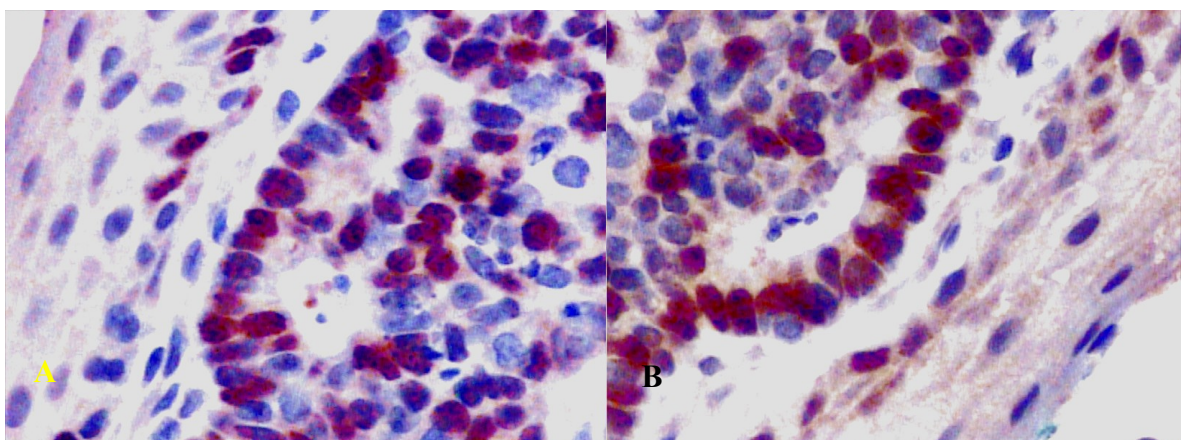


Figura 11. Ki-67 - alto índice proliferativo no adenocarcinoma esofágico (400X).

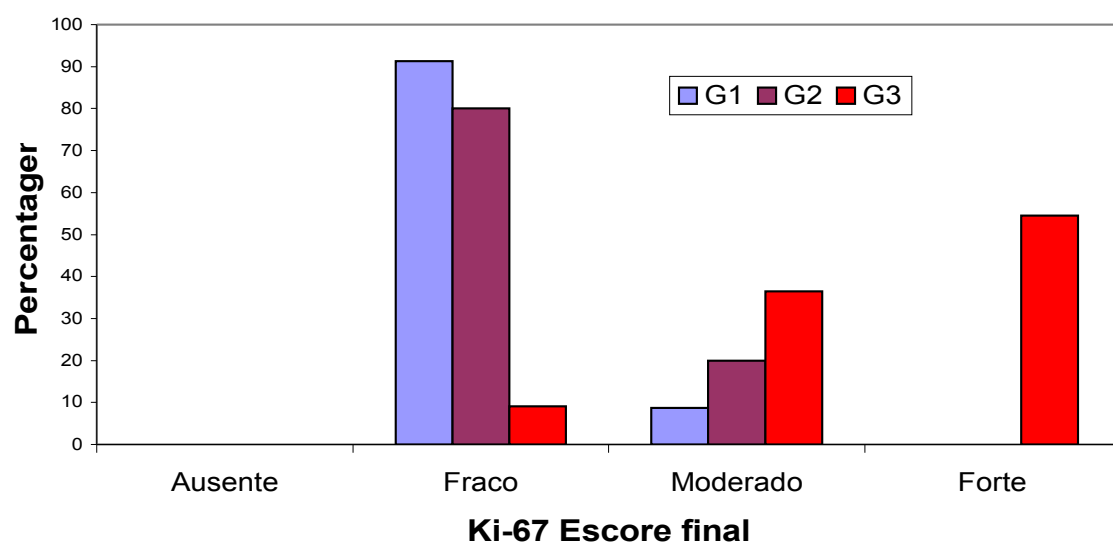


Gráfico 5. Escore semiquantitativo do Ki-67, em todos os grupos de estudo.

Tabela 13. Escore final da imunoexpressão tecidual do Ki-67 nos três grupos do estudo.

Grupo	<i>n</i>	Escore final							
		ausente		fraco		moderado		forte	
		(0)		(1-2-3)		(4-6-8)		(9-12-16)	
		n	%	N	%	n	%	n	%
Esofagite por refluxo - I	23	0	0	21	91,3	2	8,7	0	0
Esôfago de Barrett - II	30	0	0	24	80,0	6	20,0	0	0
Adenocarcinoma associado ao esôfago de Barrett - III	11	0	0	1	9,1	4	36,4	6	54,6

Na análise qualitativa e semiquantitativa da imunoexpressão tecidual da E-caderina, observou-se que o biomarcador foi positivo em todos os grupos estudo, entretanto o resultado do teste de Kruskal–Wallis indica que houve diferenças significantes entre os três grupos de pacientes, em relação ao escore final ($p < 0,001$). As comparações pareadas, realizadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn, mostram que os grupos I e II apresentaram comportamento homogêneo quanto aos escores obtidos, porém, no grupo III, os escores mais baixos ocorreram com frequências mais altas em comparação com os grupos I e II. Nestes dois grupos, os escores mais altos foram mais frequentes (grupo I vs grupo III: $p < 0,001$; grupo II vs grupo III: $p = 0,005$) - (tabela 14 e gráfico 6). Nas figuras 12, 13 e 14 observam-se exemplos da imunomarcagem da E-caderina, em todos os grupos do estudo.

Tabela 14. Escore final da imunoeexpressão tecidual da E-caderina nos grupos do estudo.

Grupo	<i>n</i>	Escore final							
		ausente		fraco		moderado		forte	
		(0)		(1-2-3)		(4-6-8)		(9-12-16)	
		n	%	N	%	n	%	n	%
Esofagite por refluxo - I	23	0	0	0	0	7	30,4	16	69,6
Esôfago de Barrett - II	30	0	0	0	0	19	63,3	11	36,6
Adenocarcinoma associado									
ao esôfago de Barrett - III	11	0	0	5	45,5	5	45,5	1	9,1

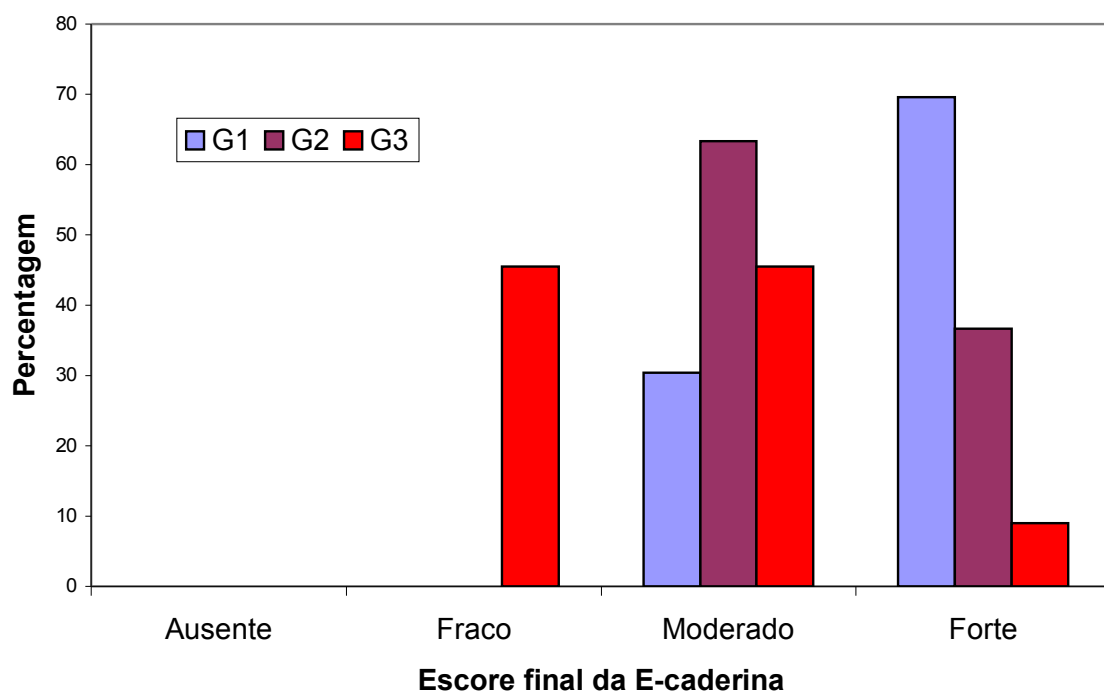


Gráfico 6. Análise do escore semiquantitativo da E-caderina, em todos os grupos de estudo.

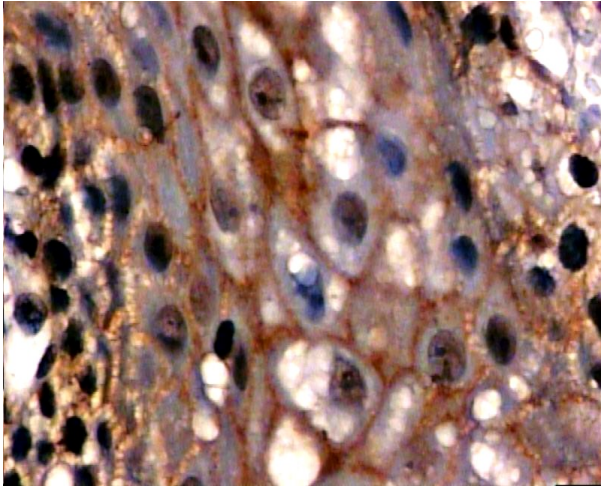


Figura 12. Forte expressão de membrana da E-caderina, na esofagite por refluxo (400X).

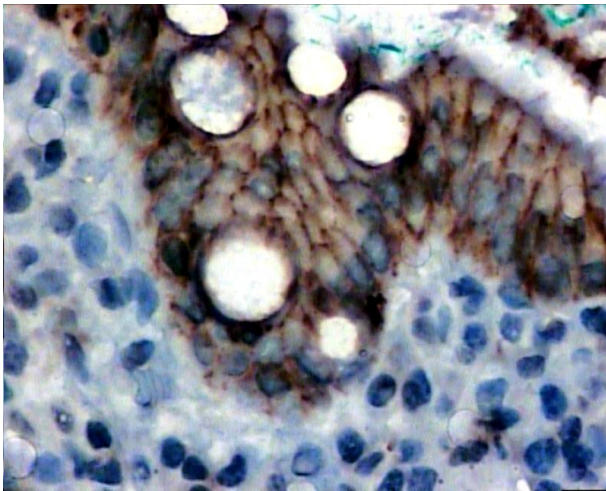


Figura 13. Imunoexpressão da E-caderina, no esôfago de Barrett (400X).

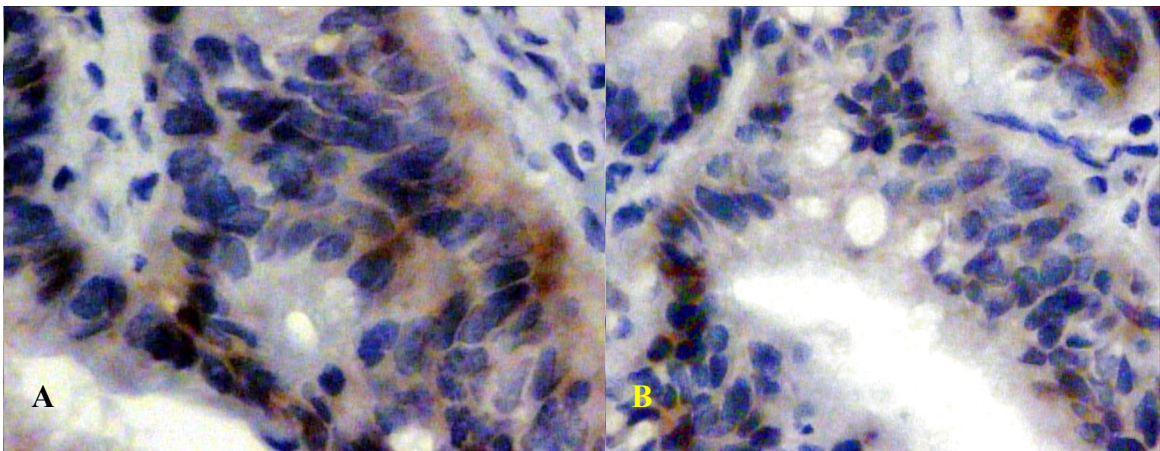


Figura 14. Imunomarcacão inconstante da E-caderina no adenocarcinoma associado com o esôfago de Barrett (A-B: 400X).

DISCUSSÃO

O EB representa a consequência mais séria da DRGE crônica, ocorrendo entre 5 a 10% dos pacientes^{12,17}.

No espectro da DRGE, considera-se o EB como uma etapa intermediária no desenvolvimento do adenocarcinoma esofágico⁴⁹⁻⁵¹, a neoplasia que, nos últimos 25 anos, apresentou a maior incidência dentre todos os cânceres, nos países ocidentais e na Europa^{20,24}.

Vários autores ressaltam a importância do seguimento endoscópico periódico dos pacientes portadores do EB. Consideram a melhor sobrevida em cinco anos daqueles que foram submetidos à ressecção do câncer esofágico e que participavam de programas de seguimento e vigilância endoscópica, com protocolos de biópsias, comparativamente àqueles pacientes com cânceres diagnosticados na endoscopia, ou fora dos programas de vigilância^{54,139,140}. No entanto, alguns pesquisadores afirmam não haver argumentos para se submeter a totalidade desses indivíduos a endoscopias e biópsias esofágicas seriadas, mas somente aqueles com alto risco de degeneração maligna, considerando-se que a grande maioria dos pacientes portadores do EB não evoluirá para o adenocarcinoma esofágico^{37,141,142}.

Realmente, não há, na literatura, dados concretos a respeito da história natural do EB, das suas taxas reais de progressão para o câncer, ou dos fatores de risco envolvidos, efetivamente, na patogênese e na degeneração maligna desta importante lesão pré-neoplásica. Os fatores considerados de risco, clínicos e endoscópicos, não apresentam, segundo alguns autores, a sensibilidade e/ou a especificidade necessárias à estratificação de risco dos pacientes para o câncer^{13,29,39-48}.

Adicionalmente, o rastreamento de pacientes portadores do EB não tem demonstrado ser uma medida científica e epidemiologicamente capaz de reduzir o índice de mortalidade do adenocarcinoma esofágico. Não demonstrou, também, diferenças significativas na sobrevida dos pacientes, quando foram comparados com a população.

Considerações e questionamentos têm sido, efetivamente, levantados, a respeito da relação custo–benefício deste rastreamento, uma vez que a incidência estimada da displasia de alto grau e do câncer esofágico, são baixas em geral (em torno de 0,5% ao ano), e as lesões neoplásicas precoces são difíceis de identificar endoscopicamente^{143,144}.

Nesse contexto, considerando não só estas limitações dos programas de rastreamento e vigilância clínico-endoscópicos, associados ao estudo histopatológico, mas também que há características celulares e biomoleculares outras, na carcinogênese esofágica relacionada com o EB, as quais não são detectáveis apenas com essas metodologias, é que o estudo e a definição de um painel imunoistoquímico de biomarcadores moleculares preditivos, com o potencial de estratificar os pacientes realmente de risco para o câncer no EB, têm assumido um papel fundamental na abordagem dessa importante entidade nosológica.

O biomarcador preditivo deve ser capaz de identificar, precocemente, o clone de células com a combinação necessária dos erros genéticos descritos, com potencial evolutivo para o câncer, dentro da sequência neoplásica do EB.

Na detecção desses biomarcadores, a maior prevalência deve ocorrer no adenocarcinoma esofágico, e o seu desenvolvimento deve ser observado no epitélio pré-maligno, antes do surgimento do tumor. Aqueles que surgirem tardiamente, ou seja, após o desenvolvimento do adenocarcinoma, não serão, portanto, úteis nessa fase de detecção precoce; no entanto, podem ter a sua aplicabilidade clínica como valor preditivo nas metástases^{145,146}.

O biomarcador preditivo deve ter, também, alta reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade, quando são comparados com a histopatologia^{25,147}, atualmente o método padrão-ouro para definição de risco do adenocarcinoma esofágico.

No presente estudo, considerando a sequência neoplásica do epitélio de Barrett⁴⁹⁻⁵¹, foram estudados e correlacionados, além dos aspectos clínicos e endoscópicos, o padrão de

expressão de cinco biomarcadores moleculares: o antígeno de proliferação celular Ki-67, o gene de supressão tumoral p53, a E-caderina, a COX-2 e o proto-oncogene c-erbB-2, dentro de três fases do espectro evolutivo da DRGE: a esofagite por refluxo, o esôfago de Barrett e o adenocarcinoma esofágico relacionado com o esôfago de Barrett.

Foi definido também, individualmente, o escore final para cada biomarcador, em cada grupo de estudo, permitindo-se avaliar em conjunto, de uma forma semiquantitativa, a qualidade da imunomarcção e a média do percentual de células que expressam o biomarcador.

Foram consideradas, na seleção desses biomarcadores, todas as etapas descritas por Hanahan e Weinberg, dentro do processo geral da carcinogênese⁶⁵, também aplicadas ao EB.

Na análise dos resultados, observa-se que não houve homogeneidade dos grupos em relação ao sexo. No grupo III, a proporção de homens foi significativamente maior, dados estes em conformidade com os encontrados na literatura, onde a predominância do adenocarcinoma esofágico é maior nos pacientes do sexo masculino^{14,42,148}.

No que concerne aos dados relacionados, especificamente, com o sexo e com o EB, assinala-se, na literatura, uma maior prevalência do epitélio de Barrett nos pacientes do sexo masculino, embora a razão seja desconhecida. Em estudo multicêntrico italiano, o EB foi encontrado em 1% dos homens e em 0,39% das mulheres, com uma proporção de 2,6 para 1¹⁴⁹. Na clínica Mayo, observou-se uma predominância de 0,97% em homens e de 0,49% nas mulheres¹³. No nosso estudo não foram observadas estas proporções, dentro do grupo de pacientes portadores do esôfago de Barrett.

Analisando-se os dados referentes à sintomatologia, observou-se que a queixa clínica predominante no grupo III foi a disfagia, em 8 de 11 pacientes (72%), comparativamente às queixas de pirose e epigastria, que dominaram entre os pacientes dos grupos I e II (acima de 80%). Contudo, há que se considerar o viés de seleção dos pacientes.

No que diz respeito à duração das queixas, Winters et al.¹⁵⁰, afirmam em seu trabalho que, em relação ao EB e a esofagite por refluxo, não houve diferença estatisticamente significativa na média de duração dos sintomas; entretanto, em ambos os casos, constatou-se diferença maior do que a observada na DRGE não-erosiva.

Lieberman et al.¹⁵¹, por sua vez, comparando pacientes que foram submetidos à endoscopia por refluxo, afirmaram que a *odds ratio* (OR) para o EB, em pacientes com duração da sintomatologia maior que 10 anos, era a de 6.4, comparativamente àqueles com sintomas com duração de 1 a 5 anos, com OR de 3.0 ($p < 0,001$).

Na análise dos resultados do presente trabalho, em relação à duração das queixas previamente a realização do exame endoscópico, observou-se que não houve diferenças significantes entre o grupo de pacientes portadores de esofagite por refluxo e o grupo de pacientes portadores de EB.

Em relação à média de idade, assinalou-se que não houve, estatisticamente, diferenças entre os grupos I e II; entretanto, o grupo III, do adenocarcinoma esofágico relacionado com o EB, apresentou diferença significativa em relação às médias dos grupos I e II, respectivamente. O adenocarcinoma é, sabidamente, uma patologia de ocorrência mais tardia, dentro da sequência carcinogénica do EB⁴⁹⁻⁵¹.

Embora o câncer do esôfago seja uma das patologias mais agressivas e letais do aparelho digestório, de pobre prognóstico, e se conheça a sua lesão presursora, o EB, a maioria desses cânceres, como já ressaltado, ainda continua sendo diagnosticada principalmente nas fases mais tardias, quando não podem mais ser curados³⁶.

Com efeito, dos 11 pacientes portadores de adenocarcinoma esofágico no presente estudo, observou-se que 8 (72,72%) foram, igualmente, diagnosticados nas fases tardias, com aspectos, durante a endoscopia, de lesões já em fases avançadas.

No que concerne, especificamente, aos biomarcadores moleculares, em relação ao gene de supressão tumoral p53, observam-se, na literatura, resultados conflitantes da imunoexpressão no epitélio de Barrett, embora grande parte dos estudos apontem um perfil de reatividade progressivamente maior na sequência neoplásica evolutiva do EB^{19,83,152-159}.

Alguns autores relatam que as alterações do gene p53 são eventos precoces na progressão neoplásica do EB, podendo, em alguns casos, ser detectadas antes da presença das alterações histológicas ou das anormalidades no ciclo celular^{69,160,161}.

Dolan et al.¹⁶², em estudo preliminar, na análise de 30 pacientes submetidos à esofagectomia por adenocarcinoma associado, e de 48 portadores do EB, em programa de vigilância endoscópica, concluíram que as mutações no gene p53 podem ser detectadas antes do desenvolvimento da displasia de alto grau ou do carcinoma, podendo ser, portanto, úteis, na estratificação de risco dos pacientes portadores do EB. No entanto, ressaltam que o adenocarcinoma do esôfago pode se desenvolver sem a expressão do gene p53 mutante, e que a mutação pode ocorrer, tardiamente, no processo da carcinogênese relativa ao EB. Afirmam, também, que não está estabelecido, ainda, se todos os pacientes portadores de mutação no gene p53 desenvolverão, ou não, o câncer esofágico.

Younes et al.⁸⁹, demonstraram, igualmente, expressão aumentada da proteína p53 em amostras de mucosa do EB, que ocorreram antes do desenvolvimento da displasia de alto grau ou do carcinoma, em dois de três pacientes.

Garewal¹⁶³ identificou, na literatura, 16 trabalhos analisando a imunoexpressão do p53 no EB. Os resultados demonstram, de forma semelhante, um acréscimo gradual na frequência das alterações do p53, à medida que o grau de displasia aumenta, com variação de percentuais de 0% a 10% no epitélio sem displasia (média de 1,4%), 0% a 60% na displasia de baixo grau (média de 30%), 50% a 100% na displasia de alto grau (média de 68%) e 53% a 100% no adenocarcinoma esofágico (média de 72%).

No entanto, outros pesquisadores também observaram resultados da imunoexpressão do p53 mais tardios, dentro da seqüência neoplásica do EB, com baixos percentuais no epitélio de Barrett^{19,154,156,164-166}, ou positividade somente no adenocarcinoma esofágico, com ausência de expressão no epitélio metaplásico. Symmans et al.¹⁶⁷ não encontraram positividade do p53 em nenhum dos portadores do EB (n=7), e Roth¹⁶⁸ encontrou mutação do p53 em 5 de 12 pacientes com epitélio de Barrett adjacente ao adenocarcinoma esofágico, mas não a encontrou em nenhum dos 10 pacientes com EB sem câncer.

Flejou et al.¹⁶⁹ igualmente relataram imunoexpressão do p53 em 56 de 82 pacientes com adenocarcinoma relacionado com o EB, com ausência do p53 no epitélio metaplásico ou com displasia de baixo grau, nas peças ressecadas. Reportaram, ainda, não haver correlação entre o grau de disseminação do tumor e o *status* do p53, sugerindo ser a imunoexpressão tecidual do p53 um evento, efetivamente, tardio¹⁷⁰.

Feith et al.¹⁷¹, em análise de 24 portadores de adenocarcinoma do esôfago distal ressecado, demonstraram, da mesma forma, não haver imunoexpressão do p53 no epitélio esofágico normal ou na metaplasia colunar; entretanto, observaram positividade na imunoexpressão em 50% dos casos portadores de câncer. Concluíram, também, na sua pesquisa, ser o p53 um marcador tardio na seqüência evolutiva neoplásica do EB.

Há outros estudos na literatura, que também demonstram esta imunorreatividade tardia do p53 na seqüência metaplasia–displasia–adenocarcinoma do EB, com expressão apenas demonstrável, mais intensamente, na displasia de alto grau, quando esta é comparada com a displasia de baixo grau ou com o epitélio de Barrett não-displásico adjacente^{85,86,156,172,173}.

No presente estudo foi encontrada uma expressão do gene p53 já no grupo I, com um perfil de imunoexpressão tecidual subsequente, nos demais grupos de análise, II e III, progressivamente maior ($p<0,001$). No grupo I, observou-se uma positividade em 5 dos 23

pacientes (21,74%). No grupo II, o percentual de pacientes positivos foi significativamente maior, com imunomarcção em 19 dos 30 pacientes (63,33%), e, no grupo III, observou-se a máxima positividade do p53, com 11 dos 11 pacientes (100%) imunomarcados. Houve, também, diferenças significativas entre os três grupos de pacientes, em relação aos escores finais da expressão. As comparações pareadas revelaram que os escores mais altos ocorreram com freqüências que aumentaram em consonância com o espectro de gravidade dos grupos envolvidos.

Discrepâncias nos resultados encontrados na literatura, da imunoexpressão do oncogene p53 na seqüência neoplásica do EB, realmente ocorrem.

Alguns autores afirmam, efetivamente, que há limitações no estudo imunoistoquímico do p53, considerando-o um teste relativamente inespecífico, com mais de 25% de resultados falso-positivos e falso-negativos, quando são comparados com o teste-padrão ouro de seqüenciamento do DNA^{172,174,175}, o que poderia trazer restrições no seu uso, na rotina clínica diária, na abordagem dos pacientes portadores do EB.

No entanto, as divergências de resultados observadas na literatura, podem ser devidas, em parte, a variações nas técnicas de detecção de mutações do gene p53 e, igualmente, a diferenças nos anticorpos e na coloração utilizados nas técnicas imunistoquímicas. A ausência de anormalidades do p53, em alguns casos de epitélio de Barrett displásico ou neoplásico, pode, também, indicar que a progressão maligna é possível sem o envolvimento do gene p53^{166,176}. Ademais, observa-se que não há, sempre, a imunoexpressão protéica tecidual de todas as mutações genéticas que ocorrem no gene p53, e que, contrariamente, é possível identificar-se a imunoexpressão deste oncogene, na ausência da mutação genética correspondente^{177,178}.

Um aumento do número de células proliferativas e uma expansão do seu compartimento também foram evidenciados no esôfago de Barrett e no adenocarcinoma

esofágico. A coloração do Ki-67, um dos biomarcadores de proliferação celular, também, a exemplo do PCNA, correlaciona-se com os achados histológicos encontrados no EB¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

Relata-se na literatura que o número e a localização dos núcleos positivos para o Ki-67 são significativamente diferentes no EB sem displasia, no EB com displasia de baixo e de alto grau, e no adenocarcinoma associado com o EB^{19,57,179,182,183}, com positividade acentuada somente nestes dois últimos grupos¹⁸⁴, e menor expressão no epitélio de Barrett, com ou sem displasia de baixo grau.

Polokowski et al.¹⁹ encontraram, em peças ressecadas por adenocarcinoma esofágico e displasia de alto grau, uma correlação estatisticamente significativa entre anormalidades do p53 e o índice de proliferação celular (Ki-67). Admitiram que a proliferação poderia ser conseqüente à ativação do oncogene e à perda da supressão tumoral.

Szachnowicz et al.¹⁸⁵, em análise de treze pacientes portadores de adenocarcinoma esofágico (11 deles associados à metaplasia intestinal), evidenciaram extensiva positividade na imunomarcação para o Ki-67 em todos os pacientes, constatando forte atividade da proliferação celular.

Outros autores têm relatado, também, baixa expressão do Ki-67 em pacientes com EB (14%), sem a presença do adenocarcinoma, e expressões acentuadas no EB, associado ao adenocarcinoma (87%)¹⁸³.

Neste trabalho, foi encontrada uma imunoexpressão tecidual, qualitativa, do biomarcador Ki-67, em 100% dos pacientes nos grupos estudados, refletindo, possivelmente, já no grupo I, o estado de proliferação celular observado no processo inflamatório que ocorre na esofagite por refluxo. Todavia, quando se analisa o escore final semiquantitativo da imunoexpressão tecidual do Ki-67, de uma forma estratificada, nos respectivos grupos do estudo, assinala-se que houve diferenças significativas. As comparações pareadas, revelam que os grupos I e II apresentaram comportamento homogêneo quanto aos escores obtidos,

porém no grupo III os escores mais altos ocorreram com frequências mais altas em comparação com os grupos I e II. Nestes dois grupos, os escores mais baixos foram os mais frequentes.

No que diz respeito ao imunomarcador COX-2, diversos grupos têm relatado que os seus níveis estão aumentados no EB e no adenocarcinoma associado e que, adicionalmente, a sua expressão se correlaciona com o grau da displasia. Altos níveis são detectados no tecido com displasia de alto grau e no adenocarcinoma esofágico, quando, respectivamente, são comparados com a displasia de baixo grau ou com o tecido não-displásico^{115,138,186}.

Zimmerman et al.¹¹⁶ informaram que 78% de 27 pacientes com adenocarcinoma esofágico expressavam a COX-2. Shrivani et al.⁹⁶ também demonstraram, em estudos imunoistoquímicos e de *imunoblotting*, que a expressão da COX-2 encontra-se aumentada no adenocarcinoma esofágico e no EB, quando estes são comparados com o esôfago normal e com o duodeno. Ademais, com a exposição de culturas de células do epitélio de Barrett ao ácido e/ou bile observou-se um aumento na expressão de COX-2.

Morris et al.¹³⁸ reportaram, também, um acréscimo hierárquico na expressão da COX-2, no processo de carcinogênese relacionado com o EB, e Souza et al.⁹⁸ confirmaram que a inibição seletiva da COX-2 reduz a proliferação e aumenta a apoptose em duas linhagens de células do adenocarcinoma relacionadas com o EB, expressando COX-2. Esse efeito da inibição seletiva da COX-2 reduzindo a proliferação celular também foi observado por Buttar et al.¹⁸⁷.

Contrariamente, Van der Woude et al.¹⁸⁸ demonstraram que a COX-2 estava ausente no epitélio de Barrett não-neoplásico e/ou displásico, mesmo presente na lâmina própria e nos miofibroblastos. Entretanto, no grupo de pacientes portadores do adenocarcinoma esofágico, houve imunoexpressão da COX-2 em 9 das 10 amostras, porém apenas na minoria das células tumorais. Ademais, observam esses autores, os seus resultados não suportam a hipótese da

inibição seletiva da COX-2 na prevenção ou tratamento da displasia ou câncer relacionados com o EB, já que não houve imunexpressão da COX-2 nos estádios pré-neoplásicos desta entidade nosológica.

Na análise da expressão tecidual da COX-2 em todos os distintos grupos do presente estudo, observa-se, também, que houve uma imunomarcção positiva, progressivamente crescente, a partir do grupo I. Neste grupo, assinala-se a positividade na imunomarcção em 47,82% dos pacientes avaliados (11/23), e no grupo do EB em 70% dos pacientes (21/30). No grupo III (adenocarcinoma esofágico), a imunexpressão positiva foi verificada em 100% dos pacientes analisados. Todas essas diferenças foram estatisticamente significativas.

Na avaliação estratificada, semiquantitativa, da imunomarcção da COX-2, observou-se que houve diferenças também significativas entre os três grupos de pacientes em relação aos escores finais. O resultado das comparações pareadas revelam que os grupos I e II apresentaram comportamento homogêneo quanto aos escores obtidos, mas no grupo III os escores mais altos ocorreram com freqüências mais altas em comparação com os grupos I e II. Nestes dois grupos os escores mais baixos foram mais freqüentes.

Do mesmo modo, as diferenças nas técnicas empregadas na análise da imunexpressão da COX-2, o uso de inibidores da bomba de prótons e de antiinflamatórios pelos pacientes, arrolados em alguns estudos, e também o fato de que os níveis do mRNA necessariamente não refletem os níveis da expressão protéica, podem, todos estes fatores, explicar a discrepância dos resultados encontrados na literatura, relativos à imunexpressão, na carcinogênese esofágica do EB.

A molécula de adesão E-caderina desempenha um papel fundamental na manutenção da estrutura e na função epitelial dos tecidos.

Há estudos que demonstram que, entre 60% e 80% dos pacientes portadores do adenocarcinoma esofágico, existe expressão reduzida da E-caderina e das cateninas^{126,127,189}.

Ademais, esta expressão reduzida da E-caderina e da alfa e da beta catenina correlaciona-se, significativamente, com estágios desfavoráveis do tumor, grau do tumor, metástase linfonodal e sobrevida, respectivamente¹²⁷.

Swami et al.¹¹⁸ encontraram um decréscimo significativo na expressão da E-caderina na metaplasia colunar, inclusive nos casos com displasia de baixo grau, quando estes eram comparados ao epitélio escamoso normal do esôfago.

Feith et al.¹⁷¹, contrariamente, observaram que a expressão da E-caderina no EB não-displásico foi similar à encontrada no epitélio esofágico normal. No entanto, encontraram uma perda quase completa da expressão da E-caderina no carcinoma esofágico invasivo, e uma redução significativa da expressão tumoral da E-caderina na seqüência, EB, displasia e adenocarcinoma esofágico, sustentando a hipótese da degeneração neoplásica evolutiva no EB¹¹⁸.

No presente estudo, apesar de todos os grupos demonstrarem positividade na imunomarcacão para a E-caderina, observa-se que houve, ao contrário dos demais biomarcadores descritos anteriormente, uma queda progressiva na intensidade da imunomarcacão, dos grupos I ao III – demonstrando uma perda na qualidade estrutural dos tecidos.

O resultado estatístico, da análise estratificada da imunoexpressão da E-caderina, indica que houve diferenças significativas entre os três grupos de pacientes em relação aos escores finais. As comparações pareadas, por sua vez, demonstram que os grupos I e II apresentaram comportamento homogêneo quanto aos escores obtidos, porém no grupo III os escores mais baixos ocorreram com freqüências mais altas em comparação com os grupos I e II. Nestes dois grupos os escores mais altos foram mais freqüentes.

No EB, expressões anormais de EGF têm sido encontradas¹⁹⁰. O EGFR e o TGF-alfa encontram-se aumentados na metaplasia tipo intestinal e elevados nas lesões displásicas e no

adenocarcinoma esofágico¹⁹¹⁻¹⁹³. A superexpressão do EGFR e do TGF-alfa no adenocarcinoma esofágico está associada com um pior prognóstico e com a presença de metástases^{194,195}.

O c-erbB-2 é um proto-oncogene que codifica uma glicoproteína altamente homóloga, porém distinta, ao EGFR. O c-erbB-2 está relacionada com a diferenciação e proliferação celular¹²⁹, e, a sua expressão, também se correlaciona com a sobrevida de pacientes com adenocarcinoma¹³⁰.

Jankowski et al.¹⁹⁰ descreveram uma imunomarcção positiva do c-erbB-2 em 9 de 15 pacientes com EB e em 11 de 15 pacientes adicionais, com adenocarcinoma esofágico relacionado com o EB.

Em outro estudo, um aumento na imunoexpressão da oncoproteína c-erbB-2 foi observado em 7 de 66 casos de adenocarcinoma relacionado com o EB (11%), mas não no tecido displásico adjacente. Também não houve imunoexpressão no epitélio não-displásico. Neste último trabalho, a presença do c-erbB-2 correlacionou-se com prognóstico desfavorável e com piora na sobrevida dos pacientes¹³⁰.

A superexpressão de c-erbB-2 também foi demonstrada em 10% a 73% dos adenocarcinomas^{77,130,190,196-199}; entretanto, a expressão aumentada não foi evidenciada na displasia do epitélio de Barrett, sugerindo ser um evento tardio na seqüência neoplásica do EB¹³¹. A presença desses índices elevados correlacionou-se com a invasão tumoral, com o envolvimento linfático, com metástases à distância e com o *status* do tumor residual, após a sua ressecção^{77,130,190,196-199}.

Kim et al.²⁰⁰ constataram que a expressão do c-erbB-2 ocorreu em 31% dos casos de displasia de alto grau e somente em 10% dos casos de adenocarcinoma esofágico. Sugeriram, igualmente, que o c-erbB-2 seria um marcador de estágios avançados da neoplasia esofágica,

relacionado com o EB, não sendo, portanto, útil como biomarcador do adenocarcinoma esofágico, considerando-se a sua baixa prevalência.

Na análise da imunexpressão tecidual do c-erbB-2, no presente estudo, observa-se, também, que houve uma imunomarcção positiva, progressivamente crescente, do grupo I ao grupo III, com diferenças significativas na positividade entre todos os grupos. No grupo I, de um total de 23 pacientes, o c-erbB-2 foi ausente quase que na totalidade dos pacientes (22/23). Se considerarmos que a marcação focal ou fracamente perceptível em membranas celulares é também considerada, imunoistoquimicamente, como negativa, teremos então 100% dos pacientes no grupo I com ausência de imunomarcção. Já no grupo III, 100% dos pacientes foram imunomarcados demonstrando ser, realmente, o c-erbB-2, um marcador tardio na evolução carcinogénica do esôfago, dentro dos nossos grupos de estudo.

Na análise semiquantitativa da imunexpressão tecidual do c-erbB-2 observa-se que houve diferenças significativas entre os três grupos de pacientes, em relação aos escores finais. As comparações pareadas demonstram, também, que os escores mais altos ocorreram com frequências que aumentaram em consonância com o espectro evolutivo da gravidade dos grupos envolvidos.

No câncer relacionado com o EB, assinala-se que as células metaplásicas são efetivamente predispostas a desenvolverem todas as características inerentes ao processo geral do câncer, com a conseqüente evidência tecidual e imunoprotéica dos diversos fatores descritos acima: de proliferação celular (biomarcador: Ki-67), secretórios, de crescimento (EGF, c-erbB-2 e TGF-alfa), de expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2), fatores apoptóticos, dos oncogenes (genes de supressão tumoral p53 e p16), de proteínas do ciclo celular, e de alterações nas moléculas de adesão da célula, com expressão reduzida da E-caderina.

Diversos estudos têm avaliado uma gama de biomarcadores moleculares teciduais utilizáveis na estratificação de risco da progressão neoplásica do EB, com resultados algumas

vezes discordantes e controversos, como foram vistos anteriormente. Entretanto, apontam, na sua maioria, para resultados crescentes na imunoexpressão, com exceção da E-caderina, que apresenta um padrão de expressão inverso, decrescente.

Não obstante, não há ainda descrito na literatura nenhum marcador genético que, isoladamente, seja capaz de ser utilizado para prever o potencial maligno do EB. Nenhum biomarcador tecidual tem se mostrado, ainda, superior à identificação histológica da displasia no epitélio de Barrett, como fator de risco para o adenocarcinoma esofágico, mesmo com as limitações previamente descritas. Dessa forma, um marcador menos subjetivo para essa possível progressão neoplásica no EB, que suplemente ou até mesmo substitua o sistema atual de classificação do grau de displasia, é realmente necessário, no sentido de se melhorar a sensibilidade, a especificidade e a relação custo-benefício dos programas de seguimento relativos ao EB.

A rede de pesquisa e detecção precoce, do Instituto Nacional do Câncer, nos EUA, recentemente propôs cinco fases para a validação dos biomarcadores²⁰¹, de forma que pudessem ser úteis na análise do surgimento destes novos biomarcadores moleculares, e na sua possível aplicabilidade clínica, relacionada com o manuseio do risco de câncer.

Estudos nas fases 1 e 2 constituem a grande maioria das publicações; no entanto, encontram-se em estágios muito precoces de análise para que possam ser utilizados clinicamente. As fases 3, 4 e 5, por sua vez, englobam uma minoria das pesquisas, mas são importantes estudos e requerem uma revisão e uma especial atenção clínica.

Atualmente, as alterações na ploidia do DNA (tetraploidia e aneuploidia), analisadas através da citometria de fluxo, bem como as anormalidades no gene de supressão tumoral p53, têm sido os biomarcadores que mais têm avançado em termos de validação, com estudos na fase 4, que são aquelas investigações prospectivas que podem envolver grande número de

pacientes para se determinar a capacidade de um determinado biomarcador em prever evoluções clínicas importantes de uma determinada patologia.

A identificação dos genes envolvidos na carcinogênese também tem sido objeto de pesquisa do câncer, ao longo das últimas duas décadas.

Na era pós-genômica, estudos determinando o perfil proteômico do tumor têm recebido uma atenção toda especial, ao lado dos avanços da bioinformática. A identificação dos genes diferentemente expressos no epitélio de Barrett e no adenocarcinoma esofágico, pode ser empregada para distinguir entre as duas condições, e os seus padrões de expressão podem ser utilizados como marcadores teciduais para progressão neoplásica²⁰²⁻²⁰⁴.

Essas novas abordagens revestem-se de grande importância no manuseio diagnóstico e terapêutico dos pacientes portadores do EB, com repercussões significativas no seu prognóstico. São medidas que tem por objetivo, sobretudo, a otimização e a padronização dos programas de rastreamento e seguimento dos pacientes de risco para a carcinogênese esofágica, como também a monitorização da eficácia da terapêutica conservadora das lesões displásicas associadas ao EB, abrindo, conseqüentemente, a perspectiva para o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas, a exemplo da quimioprofilaxia¹³² em pacientes selecionados.

Estudos prospectivos, bem planejados, randomizados, são ainda necessários para validar a sua relevância clínica, de forma que se ofereça, seguramente, uma melhor perspectiva na abordagem dos pacientes portadores do EB.

CONCLUSÕES

Obedecidos os objetivos formulados, e através das análises dos resultados, pode-se concluir que:

- ❖ Os biomarcadores moleculares oncogênicos e de atividade mitótica, p53, c-erbB-2, COX-2 e Ki-67, apresentam um aumento progressivo na intensidade da imunoexpressão tecidual, na esofagite por refluxo (grupo I), no esôfago de Barrett (grupo II) e no adenocarcinoma relacionado ao esôfago de Barrett (grupo III), respectivamente;
- ❖ O grupo III (adenocarcinoma relacionado ao esôfago de Barrett) apresenta os níveis mais acentuados da imunomarcção dos biomarcadores p53, COX-2, Ki-67 e c-erbB-2;
- ❖ O c-erbB-2 apresenta um perfil tardio de positividade e intensidade da imunoexpressão tissular, com ausência de marcação na esofagite por refluxo (grupo I) e marcação forte no adenocarcinoma relacionado ao esôfago de Barrett (grupo III);
- ❖ A E-caderina demonstra um perfil de imunoexpressão decrescente, inverso a todos os demais biomarcadores moleculares pesquisados, com os maiores níveis de marcação tecidual na esofagite por refluxo (grupo I), e os menores no adenocarcinoma relacionado ao esôfago de Barrett (grupo III).

REFERÊNCIAS

1. Spechler JS. Esophageal columnar metaplasia (Barrett's esophagus). In: *Gastrointestinal Clin North Am* 1997; 7: p.1-18.
2. Sampliner RE. Practice guidelines on the diagnosis, surveillance and therapy of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 1998; 93:1028-32.
3. Eisig JN, Barbuti RC. Doença do refluxo gastroesofágico: manifestações típicas. In : *Federação Brasileira de Gastroenterologia (Brasil). Conduas em gastroenterologia*. São Paulo: Revinter, 2004. p12-17.
4. Barrett NR. Chronic peptic ulcer of the oesophagus and "oesophagitis". *Br J Surg* 1950;38:175-82.
5. Allinson PR, Johnstone AS. The oesophagus lined with gastric mucosa membrane. *Thorax* 1953; 8:87-101.
6. Naef AP, Savary M, Ozzello L. Columnar-lined lower esophagus: an acquired lesion with malignant predisposition. Report on 140 cases of Barrett's esophagus with 12 adenocarcinomas. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1975; 70:826-35.
7. Skinner DB; Roth JLA, Sullivan BH, Stein GN, Levine M. Reflux esophagitis, In : Berk JE, ed Bockus. *Gastroenterology*. Philadelphia, WB Saunders Company, 1985. v2:pp717-68.
8. Stoker DL, William SJG, Leicester RG, Colin-Jones DG. Oesophagitis: a five year review. *Gut* 1988; 29:1450.
9. Locke GR III, Talley NJ, Fett SL, Zinsmeister AR, Melton LJ III. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: A population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 1997; 112:1448-56.

10. Moraes-Filho JPP, Chinzon D, Eisig J, Zaterka S. Brazilian National Surveillance on heartburn. *Gastroenterology* 2003; 124(Suppl.):A166.
11. Powell J, McConkey CC. The rising trend on oesophageal adenocarcinoma and gastric cardia. *Eur J Cancer Prev* 1992; 1:265–9.
12. Cameron AJ, Zinsmeister AR, Ballaard DJ, Carney JA. Prevalence of columnar-lined (Barrett's) oesophagus: comparison of population-based clinical and autopsy findings. *Gastroenterology* 1990; 99:918–22.
13. Cameron AJ, Lomboy CT. Barrett's esophagus: age, prevalence, and extent of columnar epithelium. *Gastroenterology* 1992; 103:1241-5.
14. Bonelli L. Barrett's esophagus: results of a multicentric survey. G.O.S.P. (Gruppo Operativo per lo Studio delle Precancerosi Esofagee). *Endoscopy* 1993; 25:652-4.
15. Hamilton SR, Smith RC, Cameron JL. Prevalence and characteristics of Barrett's esophagus in patients with adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Human Pathol* 1998; 19:942-8.
16. Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 1991; 265:1278-9.
17. Poynton AR, Walsh TN, O'Sullivan G, Hennessy TPJ. Carcinoma arising in familial Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:1855–6.
18. Reid BJ, Blount PL, Rubin CE, Levine DS, Haggitt RC, Rabinovitch PS. Flow cytometry and histological progression to malignancy in Barrett's esophagus: prospective endoscopic surveillance of a cohort. *Gastroenterology* 1992; 102:1212-9.

19. Polkowski W, van Lanschot JJ, ten kate FJW, Baak JP, Tytgat GN, Obertop H, et al. The value of p53 and ki-67 as markers for tumor progression in the Barrett's dysplasia-carcinoma sequence. *Surg Oncol* 1995; 4:163-71.
20. Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998; 83:2049-53.
21. Armstrong RW, Borman B. Trends in incidence rates of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in New Zealand, 1978-1992. *Int J Epidemiol* 1996; 25:941-7.
22. Hansson LE, Sparen P, Nyren O. Increasing incidence of both major histological types of esophageal carcinomas among men in Sweden. *Int J Cancer* 1993; 54:402-7.
23. Hansen S, Wiig JN, Giercksky KE, Tretli S. Esophageal and gastric carcinoma in Norway 1958-1992: incidence time trend variability according to morphological subtypes and organ subties. *Int J Cancer* 1997; 71:340-4.
24. Dolan K, Sutton R, Walker SJ, Morris AI, Campbell F, Williams EM. New classification of oesophageal and gastric carcinomas derived from changing patterns in epidemiology. *Br J Cancer* 1999; 80:834-42.
25. Reid BJ, Blount PL, Rabinovitch PS. Biomarkers in Barrett's esophagus. In: *Gastrointest Endoscopy Clin N Am* 2003; 13(2): p.369-97.
26. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340:825-31.
27. Wang KK, Wongkeesong M, Buttar NS. American gastroenterological association technical review on the role of the gastroenterologist in the management of esophageal carcinoma. *Gastroenterology* 2005; 128:1471-505.

28. Provenzale D, Kemp A, Arora S, Wong JB. A guide for surveillance of patients with Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 1994; 89:670-80.
29. Sampliner RE. The Practice Parameters Committee of the ACG. Update guidelines for the diagnosis, surveillance and therapy of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:1888-95.
30. Corley DA, Levin TR, Habel LA, Weiss NS, Buffler PA. Surveillance and survival in Barrett's adenocarcinomas: a population-based study. *Gastroenterology* 2002; 122:633-40.
31. Falk G. Endoscopic surveillance of Barrett's esophagus. Risk stratification and cancer risk. *Gastrointest Endosc* 1999; 49:S29-S34.
32. Streitz JM Jr, Andrews CW Jr, Ellis FH Jr. Endoscopic surveillance of Barrett's esophagus. Does it help? *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 105:383-7.
33. Conio M, Cameron AJ, Romero Y, Branch CD, Schleck CD, Burgart LJ, Zinsmeister AR, Melton III LJ, Locke III GR. Secular trends in the epidemiology and outcome of Barrett's oesophagus in Olmsted County, Minnesota. *Gut* 2001; 48:304-9.
34. Dulai GS, Guha S, Kahn KL, Gornbein J, Weinstein WM. Preoperative prevalence of Barrett's esophagus in esophageal adenocarcinoma: a systematic review. *Gastroenterology* 2002; 122:26-33.
35. Survival of cancer patients in Europe: the EURO CARE II Study. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1999.
36. Farrow DC, Vaughan TL. Determinants of survival following the diagnosis of esophageal adenocarcinoma (United States). *Cancer Causes Control* 1996; 7:322-7.

37. van der Burgh A, Dess J, Hop WC, van Blankenstein M. Oesophageal cancer is an uncommon cause of death in patients with Barrett's esophagus. *Gut* 1996; 39:5-8.
38. Spechler SJ, Lee E, Ahnen D, Goyal RK, Hirano I, Ramirez F, Raufman JP, Sampliner R, Schnell T, Sontag S, Vlahcevic ZR, Young R, Williford W. Long term outcome of medical and surgical therapies for gastroesophageal reflux disease: follow-up of a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 119:333-8.
39. Jankowski AJ, Harrison RF, Perry I, Balkwill F, Tselepis C. Seminar: Barrett's metaplasia. *Lancet* 2000; 356:2079-85.
40. Sarr MG, Hamilton SR, Marrone GC, Cameron JL. Barrett's esophagus: it's prevalence and association with adenocarcinoma in patients with symptoms of gastroesophageal reflux. *Am J Surg* 1985; 149:187-93.
41. Menke-Pluymers MBE, Hop WCJ, Dees J, van Blankenstein M, Tilanus HW. Risk factors for the development of an adenocarcinoma in Barrett's Esophagus. *Cancer* 1993; 72:1155-8.
42. Skinner DB, Walther BC, Riddell RH, Schmidt H, Iascone C, DeMeester T. Barrett's esophagus: Comparison of benign and malignant cases. *Ann Surg* 1983; 198:554-66.
43. Lagergren J, Bergstrom R, Nyren O. Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Ann Inter Med* 1999; 130:883-90.
44. Romero Y, Cameron AJ, Locke GR 3rd, Schaid DJ, Slezak JM, Branch CD, Melton LJ 3rd. Familial aggregation of gastroesophageal reflux in patients with Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1997; 113:1449-56.

45. Lagergren J, Bergstrom R, Adami HO, Nyren O. Association between medications that relax the lower esophageal sphincter and risk for esophageal adenocarcinoma. *Ann Intern Med* 2000; 133:165-75.
46. Weston AP, Badr AS, Topalovski M, Cherian R, Dixon A, Hassanein RS. Prospective evaluation of the prevalence of gastric *Helicobacter pylori* infection in patients with GERD, Barrett's esophagus, Barrett's dysplasia and Barrett's adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:387-94.
47. Gray MR, Donnely RJ, Kingsnorth AN. The role of smoking and alcohol in metaplasia and cancer risk in Barrett's columnar line oesophagus. *Gut* 1993; 34:727-31.
48. Spechler SJ, Sperber H, Doos WG, Schimmel EM. The prevalence of Barrett's esophagus in patients with chronic peptic oesophageal strictures. *Dig Dis Sci* 1983; 28:769-74.
49. Morales CP, Souza RF, Spechler SJ. Hallmarks of cancer progression in Barrett's esophagus. *Lancet* 2002; 360:1587-9.
50. Fléjou JF. Barrett's oesophagus: from metaplasia to dysplasia and cancer. *Gut* 2005; 54(suppl I):i6-i12.
51. Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, Triadafilopoulos G, Geboes K, Casson AG, et al. Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Pathol* 1999; 154:965-73.
52. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Roth G, Surawicz CM, Van Belle G, et al.. Observer variation in the diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus. *Hum Pathol* 1988; 19:166-78.
53. Hameeteman W, Tytgat GN, Houthoff HJ, van den Tweel JG. Barrett's esophagus: development of dysplasia and adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1989; 96:1249-56.

54. Levine DS, Haggitt RC, Blount PL, Rabinovitch PS, Rusch VW, Reid BJ. An endoscopic biopsy protocol can differentiate high-grade dysplasia from early adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1993; 105:40-50.
55. Altorki NK, Sunagawa M, Little AG, Skinner DB. High grade dysplasia in columnar lined oesophagus. *Am J Surg* 1991; 161:97-9.
56. Schnell T, Sontag S, Chejfec G, et al. High grade dysplasia in Barrett's oesophagus: a report of experience with 43 patients. *Gastroenterology* 1989; 96:A452.
57. Krishnadath KK, Tilanus HW, van Blankenstein M, Hop WC, Teijgeman R, Mulder AH, Bosman FT, van Dekken H. Accumulation of genetic abnormalities during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Cancer Res* 1995; 55:1971-6.
58. Schnell T, Sontag SJ, Chejfec G, Kurucar C, O'Connell S, Levine G, et al. High grade dysplasia is not an indication for surgery in patients with Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1996; 110:A590.
59. Levine DS, Haggitt RC, Irvine S, Reid BJ. Natural history of high grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1996; 110:A550.
60. Streitz JM, Ellis JH, Gibbs P, Balogh K, Watkins E Jr. Adenocarcinoma in Barrett's esophagus : a clinicopathologic study of 65 cases. *Ann Surg* 1991; 213:122-5.
61. Johansson J, Johnsson F, Walther B, Willen R, Stael von Holstein C, Zilling T. Adenocarcinoma in the distal esophagus with and without Barrett's esophagus. *Arch Surg* 1996; 131:708-13.
62. Montgomery E, Bronner MP, Goldblum JR, Greeson JK, Haber MM, Hart J, et al. Reproducibility of the diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus: a reaffirmation. *Hum Pathol* 2001; 32:368-78.

63. Miros M, Kerlin P, Walker N. Only patients with dysplasia progress to adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Gut* 1991; 32:1441-6.
64. MacDonald CE, Wicks AC, Playford RJ. Final results from 10 year cohort of patients undergoing surveillance for Barrett's esophagus: observational study. *B M J* 2000; 321:1252-5.
65. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.
66. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194:23-8.
67. Barrett MT, Sanchez CA, Prevo LJ, Wong DJ, Galipeau PC, Paulson TG, et al. Evolution of neoplastic cell lineages in Barrett oesophagus. *Nat Genet* 1999; 22:106-9.
68. Galipeau PC, Prevo LJ, Sanchez CA, Longton GM, Reid BJ. Clonal expansion and loss of heterozygosity at chromosomes 9p and 17p in premalignant esophageal (Barrett's) tissue. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:2087-95.
69. Galipeau PC, Cowan DS, Sanchez CA, Barrett MT, Emond MJ, Levine DS, et al. 17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraploid) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:7081-4.
70. Huang Y, Boynton RF, Blount PL, Silverstein RJ, Yin J, Tong Y, et al. Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancers. *Cancer Res* 1992; 52:6525-30.
71. Werner M, Mueller J, Walch A, Hofler H. The molecular pathology of Barrett's esophagus. *Histol Histopathol* 1999; 14:553-9.

72. Beilstein M, Silberg D. Cellular and molecular mechanisms responsible for progression of Barrett's metaplasia to esophageal carcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31:461-79.
73. Haggitt RC, Reid BJ, Rabinovitch PS, Rubin CE. Barrett's esophagus. Correlation between mucin histochemistry, flow cytometry, and histologic diagnosis for predicting increased cancer risk. *Am J Pathol* 1988; 131:53-61.
74. Levine DS, Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. Correlation of ultrastructural aberrations with dysplasia and flow cytometric abnormalities in Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 1989; 96:355-67.
75. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. Barrett's esophagus. Correlation between flow cytometric and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1987;93:1-11.
76. Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS. Barrett's esophagus: cell cycle abnormalities in advancing stages of neoplastic progression. *Gastroenterology* 1993; 105:119-29.
77. Nakamura T, Nekarda H, Hoelscher AH, Bollschweiler E, Harbeck N, Becker K, et al. Prognostic value of DNA ploidy and c-erbB-2 oncoprotein overexpression in adenocarcinoma of Barrett's esophagus [published correction appears in *Cancer* 1994; 74:2396]. *Cancer* 1994; 73:1785-94.
78. McKinley MJ, Budman DR, Grueneberg D, Bronzo RL, Weissman GS, Kahn E. DNA content in Barrett's esophagus and esophageal malignancy. *Am J Gastroenterolo* 1987; 82:1012-5.

79. Rabinovitch PS, Reid BJ, Haggitt RC, Norwood TH, Rubin CE. Progression to cancer in Barrett's esophagus is associated with genomic instability. *Lab Invest* 1989; 60:65-71.
80. James PD, Atkinson M. Value of DNA image cytometry in the prediction of malignant change in Barrett's esophagus. *Gut* 1989; 30:899-905.
81. Krishnadath KK, Reid BJ, Wang KK. Biomarkers in Barrett esophagus *Mayo Clin Proc* 2001; 76: 438-46.
82. van Lieshout EM, Jansen JB, Peters WH. Biomarkers in Barrett's esophagus. *Int J Oncol* 1998; 13:855-64.
83. Ireland AP, Clark GWB, DeMeester TR. Barrett's esophagus. The significance of p53 in clinical practice. *Ann Surg* 1997; 225(1):17-30.
84. Ambs S, Hussain SSP, Marrogi AJ, Harris CC. Cancer-prone oxidative overload disease. *IARC Sci Publ* 1999; 150:295-302.
85. Schneider PM, Casson AG, Levin B, Garewal HS, Hoelscher AH, Becker K, et al. Mutations of the p53 in Barrett's esophagus and Barrett's cancer: a prospective study in ninety-eight cases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 111:323-31; discussion, 331-3.
86. Younes M, Ertan A, Lechago LV, Somoano JR, Lechago J. p53 protein accumulation is a specific marker of malignant potential in Barrett's metaplasia. *Dig Dis Sci.* 1997; 42:697-701.
87. Klump B, Hsieh CJ, Holzmann K, Borchard F, Gaco V, Greschniok A, et al. Diagnostic significance of nuclear p53 expression in the surveillance of Barrett's esophagus - a longitudinal study. *Z Gastroenterol* 1999; 37:1005-11.

88. Reid BJ, Barrett MT, Galipeau PC, Sanchez CA, Neshat K, Cowan DS, Levine DS. Barrett's esophagus: ordering the events that lead to cancer. *Eur J Cancer Prev* 1996; 5:57-65.
89. Younes M, Lebovitz R, Lechago L, Lechago J. p53 accumulation in Barrett metaplasia, dysplasia and carcinoma: a follow-up study. *Gastroenterology* 1993; 105:1637-42..
90. Sinicrope FA, Roddey G, McDonnell TJ, Shen Y, Cleary KR, Stephens LC. Increased apoptosis accompanies neoplastic development in the human colorectum. *Clin Cancer Res* 1996; 2:1999-2006.
91. Soslow RA, Remotti H, Baergen RN, Altorki NK. Suppression of apoptosis does not foster neoplastic growth in Barrett's esophagus. *Mod Pathol* 1999; 12:239-250.
92. Whittles CE, Biddlestone LR, Burton A, Barr H, Jankowski JA, Warner PJ, Shepherd NA. Apoptotic and proliferative activity in the neoplastic progression of Barret's oesophagus: a comparative study. *J Pathol* 1999; 187:535-40.
93. Gillen P, McDermott M, Grehan D, Hourihane DO, Hennessy TP. Proliferating cell nuclear antigen in the assessment of Barrett's mucosa. *Br J Surg* 1994; 81:1766-8.
94. Baak JPA, Oort J. The case for quantitative pathology in cancer diagnosis and treatment. In: Baak JPA ed. *Manual of Quantitative Pathology in Cancer Diagnosis and Prognosis*. Berlin: Springer-Verlag 1991:7-18.
95. Fitzgerald RC, Omary MB, Triadafilopoulos G. Altered sodium-hydrogen exchange activity is a mechanism for acid-induced hyperproliferation in Barrett's esophagus. *Am J Physiol* 1998; 275:G47-55.

96. Shirvani VN, Ouatu-Lascar R, Kaur BS, Omary MB, Triadafilopoulos G. Cyclooxygenase-2 expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma : ex vivo induction by bile salts and acid exposure. *Gastroenterology* 2000; 118: 487-96.
97. Zhang F, Subbaramaiah K, Altorki N, Dannenberg AJ. Dihydroxy bile acids activate the transcription of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 1998; 273:2424-8.
98. Souza RF, Shewmake K, Beer DG, Cryer B, Spechler SJ. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis in human esophageal adenocarcinoma cells. *Cancer Research* 2000; 60:5767-72.
99. Inoue H, Yokoyama C, Hara S, Tone Y, Tanabe T. Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7:249-54.
100. Simmons DL, Levy DB, Yannoni Y, Erikson RL. Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86:1178-82.
101. Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5:904-9.
102. Subbaramaiah K, Telang N, Ramonetti JT, Araki R, DeVito B, Weksler BB, Dannenberg AJ. Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1996; 56:4424-9.
103. Sheng H, Williams CS, Shao J, Liang P, DuBois RN, Beauchamp RD. Induction by cyclooxygenase-2 by activated H-ras oncogene in rat-1 fibroblasts and the role of mitogen activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 1998; 273:22120-7.

104. Tsujii M, Kawano S, Tsujii S, Sawaoka H, Hori M, Dubois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells [published erratum appears in Cell 1998 Jul 24;94:271]. Cell 1998; 93:705-16.
105. Williams C, Luongo C, Radhika A, Zhang T, Lamps LW, Nanney LB, Beauchamp RD, Dubois RN. Elevated cyclooxygenase-2 levels in Min mouse adenomas. Gastroenterology 1996; 111:1134-40.
106. Steinbach G, Lynch PM, Philips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. N Engl J Med 2000; 342:1946-52.
107. Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. Cancer Res, 1998; 58:4245-9.
108. Elder DJ, Halton DE, Hague A, Paraskeva C. Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression. Clin Cancer Res 1997; 3:1679-83.
109. Sheng GG, Shao J, Sheng H, Hooton EB, Isakson PC, Morrow JD, et al. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of H-retransformed rat intestinal epithelial cells. Gastroenterology 1997; 113:1883-91.
110. Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, et al. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. Cancer Res 1998; 58:1208-16.

111. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995; 83:493-501.
112. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1997; 94:3336-40.
113. Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler BB, Subbaramaiah K. Cyclooxygenase-2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* 2001; 2:544–51.
114. Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 2001; 1:11–21.
115. Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998; 58:2929-34.
116. Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schror K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59:198-204.
117. Buskens CJ, van Rees BP, Sivula A, Reitsma JB, Haglund C, Bosma PJ, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in patients with adenocarcinoma of the esophagus. *Gastroenterology* 2002; 122:1800–7.
118. Swami S, Kumble S, Triadafilopoulos G. E-cadherin expression in gastroesophageal reflux disease, Barrett's esophagus, and esophageal adenocarcinoma: an immunohistochemical and immunoblot study. *Am J Gastroenterol* 1995; 90:1808-13.

- 119.Doki Y, Shiozaki H, Tahara H, Inoue M, Oka H, Iihara K, et al. Correlation between E-cadherin expression and invasiveness in vitro in a human esophageal cancer cell line. *Cancer Res* 1993; 53:3421-6.
- 120.Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, Hofler H. E-cadherin expression gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* 1994; 54:3845-52.
- 121.Becker KF, Hofler H. Frequent somatic allelic inactivation of the E-cadherin gene in gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1082-4.
- 122.Birchmeier W, Behrens J, Weidner KM, Frixen UH, Schipper J. Dominant and recessive genes involved in tumor cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 1991; 3:832-40.
- 123.Crossin KL. Cell adhesion molecules in embryogenesis and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 615:172-86.
- 124.Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, et al. E-cadherin mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991; 113:173-85.
- 125.Shimoyama Y, Hirohashi S. Expression of E- and P- cadherin in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1991; 51:2185-92.
- 126.Bailey T, Biddlestone L, Shepherd N, Barr H, Warner P, Jankowski J. Altered cadherin and catenin complexes in the Barrett's esophagus dysplasia adenocarcinoma sequence: correlation with disease progression and dedifferentiation. *Am J Pathol* 1998; 152:135-44.
- 127.Krishnadath KK, Tilanus HW, van Blankenstein M, Hop WC, Kremers ED, Dinjens WN, Bosman FT. Reduced expression of the cadherin-catenin complex in oesophageal adenocarcinoma correlates with poor prognosis. *J Pathol* 1997; 182:331-8.

128. Washington K, Chiappori A, Hamilton K, Shyr Y, Blanke C, Johnson D, et al. Expression of beta-catenin, alpha-catenin, and E-cadherin in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinomas. *Mod Pathol* 1998; 11:805-13.
129. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, et al. Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 1986; 319:230-4.
130. Flejou JF, Paraf F, Muzeau F, Fekete F, Henin D, Jothy S, Potet F. Expression of c-erbB-2 oncogene product in Barrett's adenocarcinoma: pathological and prognostic correlations. *J Clin Pathol* 1994; 47:23-6.
131. Hardwick RH, Shepherd NA, Moorthen M, Newcomb PV, Alderson D. c-erbB-2 overexpression in the dysplasia/carcinoma sequence of Barrett's oesophagus. *J Clin Pathol* 1995; 48:129-32.
132. Fennerty MB, Triadafilopoulos G. Clinical Review: Barrett's related esophageal adenocarcinoma: is chemoprevention a potential option? *Am J of Gastroenterology* 2001; 96: 2302-5.
133. Moraes-Filho JP, Cecconello I, Gama-Rodrigues J, Castro L, Henry MA, Meneghelli UG, Quigley E, Brazilian Consensus Group. Brazilian Consensus on Gastresophageal Reflux Disease: Proposals for assessment, classification and management. *Am J of Gastroenterol* 2002; 97:241-8.
134. Werner M, Flejou JF, Hainaut P, Höfler H, Lambert R, Keller G, Stein HJ. Adenocarcinoma of the esophagus. In: Hamilton SR, Aaltonen LA(eds.). *Pathology and Genetics of Tumors of the Digestive System. World Health Organization Classification of Tumors*, IARC Press, Lyon 2000:20-6p.

135. Breyer HP, Maguilnik I. Esofagite de Refluxo. In: Magalhães AFN, Cordeiro FTM, Quilici FA, Machado G, Amarante HMBS, Prolla JC, Leitão OR, Alves PRA, Sakai P. In: Endoscopia Digestiva Diagnóstica e Terapêutica (SOBED). Rio de Janeiro: Revinter Ltda; 2005.p.155-9.
136. Maluf Fº F, Moura EGH, Sakai P. Carcinoma Precoce do Esôfago. In : Magalhães AFN, Cordeiro FTM, Quilici FA, Machado G, Amarante HMBS, Prolla JC, Leitão OR, Alves PRA, Sakai P. In: Endoscopia Digestiva Diagnóstica e Terapêutica (SOBED). Rio de Janeiro: Revinter Ltda; 2005. p.224-30.
137. DeNardi FJ, Riddell RH. The esophagus. In: Silverberg SG, DeLellis RA, Frable WJ. In: Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology. New York; Churchill Livingstone - 3ª Ed. 1997. p 1597-668.
138. Morris CD, Armstrong GR, Bigley G, Green H, Attwood SE. Cyclooxygenase-2 expression in the Barrett's metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. Am J Gastroenterol 2001; 96(4):990-6.
139. Peters JH, Clark GW, Chandrasoma P, Smyrk TC, DeMeester TR. Outcome of adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus in endoscopically surveyed and nonsurveyed patients. J Thorac Cardiovasc Surg 1994; 108: 813.
140. Spechler JS, Goyal RK. Barrett's esophagus. N Engl J Med 1986; 315:362.
141. Spechler SJ, Robbins AH, Rubins HB, Vincent ME, Heeren T, Doos WG, Colton T, Schimmel EM. Adenocarcinoma and Barrett's esophagus. An overrated risk? Gastroenterology 1984; 87:927.
142. Cameron AJ, Ott BJ, Payne WS. The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus. N Engl J Med 1985; 313:857.

143. Specheler SJ. Barrett's esophagus: Clinical practice. *N Engl J Med* 2000; 346:836-42.
144. Sharma P, Sidorenko EI. Are screening and surveillance for Barrett's oesophagus really worthwhile? *Gut* 2005; 54: 27-32.
145. Neshat K, Sanchez CA, Galipeau PC, Cowan DS, Ramel S, Levine DS, Reid BJ. Barrett's esophagus: a model of human neoplastic progression. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Volume 59. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1994: 577-83.
146. Reid BJ, Barrett MT, Galipeau PC, Sanchez CA, Neshat K, Cowan DS, Levine DS. Barrett's esophagus: ordering the events that lead to cancer. *Eur J Cancer Prev* 1996; 5(Suppl):57-65.
147. McManus DT, Olaru A, Meltzer SJ. Biomarkers of esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Cancer Research* 2004; 64:1561-9.
148. Sjogren RW, Johnson LF. Barrett's esophagus: a review. *Am J Med* 1983; 74:313
149. Gruppo Operativo per lo studio delle precancerosi dell esophago(GOSPE). Barrett's esophagus: epidemiological and clinical results of a multicentric survey. *Int J Cancer* 1991; 48:364-8.
150. Winters C Jr, Spurling TJ, Chobanian SJ, Curtis DJ, Esposito RL, Hacker JF 3rd, et al. Barrett's esophagus. A prevalent, occult complication of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 1987; 92:118-24.
151. Lieberman DA, Oehlke M, Helfand M. Risk factors for Barrett's esophagus in community-based practice. GORGE consortium. Gastroenterology Outcomes Research Group in Endoscopy. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1293-7.

152. Levine DS. Barrett's oesophagus and p53. *Lancet* 1994; 344(8917):212-3.
153. Gimenez A, Minguela A, Parrilla P, Bermejo J, Perez D, Molina J, et al. Flow cytometric DNA analysis and p53 protein expression show a good correlation with histologic findings in patients with Barrett's esophagus. *Cancer* 1998; 83:641-51.
154. Ramel S, Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS, Neshat K, et al. Evaluation of p53 protein expression in Barrett's esophagus by two-parameter flow cytometry. *Gastroenterology* 1992; 102:1220-8.
155. Jones DR, Davidson AG, Summers CL, Murray GF, Quinlan DC. Potential application of p53 as an intermediate biomarker in Barrett's esophagus. *Ann Thorac Surg* 1994; 57:598-603.
156. Rice TW, Goldblum JR, Falk GW, Tubbs RR, Kirby TJ, Casey G. p53 immunoreactivity in Barrett's metaplasia, dysplasia and carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 108:1132-7.
157. Hanas JS, Lerner MR, Lightfoot SA, Raczkowski C, Kastens DJ, Brackett DJ, Postier RG. Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1) and p53 tumor suppressor in dysplastic progression and adenocarcinoma in Barrett esophagus. *Cancer* 1999; 86:756-63.
158. Kubba AK, Poole NA, Watson A. Role of p53 assessment in management of Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci* 1999; 44:659-67.
159. Fitzgerald RC, Triadafilopoulos G. Recent developments in the molecular characterization of Barrett's esophagus. *Dig Dis* 1998; 16:63-80.

- 160.Neshat K, Sanchez CA, Galipeau PC, Blount PL, Levine DS, Joslyn G, Reid BJ. p53 mutations in Barrett's adenocarcinoma and high-grade dysplasia. *Gastroenterology* 1994; 106:1589-95.
- 161.Blount PL, Galipeau PC, Sanchez CA, Neshat K, Levine DS, Yin J, et al. 17p allelic losses in diploid cells of patients with Barrett's esophagus who develop aneuploidy. *Cancer Res* 1994; 54:2292-5.
- 162.Dolan K, Walker SJ, Gosney J, Field JK, Sutton R. TP53 mutations in malignant and premalignant Barrett's esophagus. *Dis Esophagus* 2003; 16:83-9.
- 163.Garewal HS. What is the comparative rate of p53 overexpression in Barrett's patients with and without dysplasia? In: Giulini R, Siewert JR, Couturier Dysplasia, Scarpignato C. Barrett's esophagus (O.E.S.O.). France : John Libbey Eurotext Ed. 2003, (1):390-1.
- 164.Moskaluk CA, Heitmiller R, Zahurak M, Schwab D, Sidransky D, Hamilton SR. p53 and p21 (WAF1/CIP1/SDI1) gene products in Barrett esophagus and adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Hum Pathol* 1996; 27:1211-20.
- 165.Krishnadath KK, van Blankenstein M, Tilanus HW. Prognostic value of p53 in Barrett's oesophagus. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7:81-4.
- 166.Krishnadath KK, Tilanus HW, van Blankenstein M, Bosman FT, Mulder AH. Accumulation of p53 protein in normal, dysplastic, and neoplastic Barrett's oesophagus. *J Pathol* 1995; 175:175-80.
- 167.Symmans PJ, Linehan JM, Brito MJ, Filipe MI. p53 expression in Barrett's oesophagus, dysplasia, and adenocarcinoma using antibody DO-7. *J Pathol* 1994; 173:221-6.
- 168.Roth JA. Molecular surgery for cancer. *Arch Surg* 1992;127:1298-302.

- 169.Flejou JF, Potet F, Muzeau F, Le Pelletier F, Fekete F, Henin D. Overexpression of the p53 protein in Barrett's syndrome with malignant transformation. *J Clin Pathol* 1993; 46:330-3.
- 170.Flejou JF, Paraf F, Potet F, Muzeau F, Fekete F, Henin D. p53 protein expression in Barrett's adenocarcinoma: a frequent event with no prognostic significance. *Histopathology* 1994; 24:487-9.
- 171.Feith M, Stein HJ, Mueller J, Siewert JR. Malignant degeneration of Barrett's esophagus: the role of the Ki-67 proliferation fraction, expression of E-cadherin and p53. *Dis Esophagus* 2004; 17:322-7.
- 172.Hamelin R, Fléjou JF, Muzeau F, Potet F, Laurent-Puig P, Fékété F, Thomas G. TP53 gene mutations and p53 protein immunoreactivity in malignant and premalignant Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1994; 107:1012-8.
- 173.Gleeson CM, Sloan JM, McManus DT, Maxwell P, Arthur K, McGuigan JA, et al. Comparison of p53 and DNA content abnormalities in adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia. *Br J Cancer* 1998; 77:277-86.
- 174.Coggi G, Bosari S, Roncalli M, Graziani D, Bossi P, Viale G, et al. p53 protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma. A molecular and immunohistochemical study with clinicopathologic correlations. *Cancer* 1997; 79:425-32.
- 175.Moore JH, Lesser EJ, Erdody DH, Natale RB, Orringer MB, Beer DG. Intestinal differentiation and p53 gene alterations in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1994; 56:487-93.
- 176.Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351:453-6.

177. Weston AP, Banerjee SK, Sharma P, Tran TM, Richards R, Cherian R. p53 protein overexpression in low grade dysplasia (LGD) in Barrett's esophagus: immunohistochemical marker predictive of progression. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:1355-62.
178. Fujiki T, Haraoka S, Yoshioka S, Ohshima K, Iwashita A, Kikuchi M. p53 gene mutation and genetic instability in superficial multifocal esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2002; 20:669-79.
179. Lauwers GY, Kandemir O, Kubilis PS, Scott GV. Cellular kinetics in Barrett's epithelium carcinogenic sequence: roles of apoptosis, bcl-2 protein, and cellular proliferation. *Mod Pathol* 1997; 10:1201-8.
180. Jankowski J, McMenemim R, Yu C, Hopwood D, Wormsley KG. Proliferating cell nuclear antigen in oesophageal diseases; correlation with transforming growth factor alpha expression. *Gut* 1992; 33:587-91.
181. Hong MK, Laskin WB, Herman BE, Johnston MH, Vargo JJ, Steinberg SM, et al. Expansion of the Ki-67 proliferative compartment correlates with degree of dysplasia in Barrett's esophagus. *Cancer* 1995; 75:423-9.
182. Yacoub L, Goldman H, Odze RD. Transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor receptor, and MIB-1 expression in Barrett's-associated neoplasia: correlation with prognosis. *Mod Pathol* 1997; 10:105-12.
183. Rioux-Leclercq N, Turlin B, Sutherland F, Heresbach N, Launois B, Campion JP, Ramee MP. Analysis of Ki-67, p53 and Bcl-2 expression in the dysplasia-carcinoma sequence of Barrett's esophagus. *Oncol Rep* 1999; 6:877-82.

- 184.Halm U, Tannapfel A, Breitung B, Breidert M, Wittekind CW, Mossner J, et al. Apoptosis and cell proliferation in the metaplasia-dysplasia-carcinoma-sequence of Barrett's esophagus. *Hepatogastroenterology* 2000; 47:962-6.
- 185.Szachnowicz S, Ceconello I, Iriya K, Marson AG, Takeda FR, Gama-Rodrigues JJ, et al. Origin of adenocarcinoma in Barrett's esophagus: p53 and Ki-67 expression and histopathologic background. *Clinics* 2005; 60(2):103-12.
- 186.Kandil HM, Tanner G, Smalley W, Halter S, Radhika A, Dubois RN. Cyclooxygenase-2 expression in the Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci* 2001; 46:785-9.
- 187.Buttar N, Anderson M, Krishnadath K, et al. Chemopreventive potential of selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition in Barrett's epithelium: an in vitro study (abstr). *Gastroenterology* 2000; 118:A35.
- 188.Van Der Woude CJ, Jansen PLM, Tiebosch ATGM, Beuving A, Homan M, Kleibeuker JH, Moshage H, et al. Expression of apoptosis-related proteins in Barrett's metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence: a switch to a more resistant phenotype. *Hum Pathol* 2002; 33:686-92.
- 189.Jankowski JA, Newham PM, Kandemir O, Hirano S, Takeichi M, Pignatelli M. Differential expression of E-cadherin in normal, metaplastic and dysplastic oesophageal mucosa: a putative biomarker. *Int J Oncol* 1994; 441-8.
- 190.Jankowski J, Coghill G, Hopwood D, Wormsley KG, Oncogenes and onco-suppressor gene in adenocarcinoma of the oesophagus. *Gut* 1992; 33:1033-8.
- 191.Jankowski J, McMenemin R, Hopwood D, Penston J, Wormsley KG. Abnormal expression of growth regulatory factors in Barrett's oesophagus. *Clin Sci (Colch)*. 1991; 81:663-8.

- 192.al-Kasspooles M, Moore JH, Orringer MB, Beer DG. Amplification and overexpression of the EGFR and c-erbB-2 genes in human esophageal adenocarcinomas. *Int J Cancer* 1993; 54:213-9.
- 193.Brito MJ, Filipe MI, Linehan J, Jankowski J. Association of transforming growth factor alpha (TGFA) and its precursors with malignant change in Barrett's epithelium: biological and clinical variables. *Int J Cancer* 1995; 60:27-32.
- 194.Jankowski J. Altered gene expression of growth factors and their receptors during esophageal tumorigenesis. *Gastroenterol Clin Biol* 1994; 18(1, Pt2):D40-5.
- 195.Millikan KW, Mall JW, Myers JA, Hollinger EF, Doolas A, Saclarides TJ. Do angiogenesis and growth factor expression predict prognosis of esophageal cancer ? *Am Surg* 2000; 66:401-5.
- 196.Jankowski J, Hopwood D, Wormsley KG. Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha and their receptor in gastro-oesophageal diseases. *Dig Dis* 1993; 11:1-11.
- 197.Hardwick RH, Barham CP, Ozua P, Newcomb PV, Savage P, Powell R, et al. Immunohistochemical detection of p53 and c-erbB-2 in oesophageal carcinoma; no correlation with prognosis. *Eur J Surg Oncol* 1997; 23:30-5.
- 198.Polkowski W, van Sandick JW, Offerhaus GJ, ten Kate FJ, Mulder J, Obertop H, van Lanschot JJ. Prognostic value of Lauren classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Ann Surg Oncol* 1999; 6:290-7.

- 199.Duhaylongsod FG, Gottfried MR, Iglehart JD, Vaughn AL, Wolfe WG. The significance of c-erbB-2 and p53 immunoreactivity in patients with adenocarcinoma of the esophagus. *Ann Surg* 1995; 221:677-84.
- 200.Kim R, Clarke MR, Melhem MF, Young MA, Vanbibber MM, Reynolds JC, et al. Expression of p53, PCNA, and c-erbB-2 in Barrett's metaplasia and adenocarcinoma. *Digestive Diseases and Sciences* 1997; 42:2453-62.
- 201.Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M, et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1054-61.
- 202.Barrett MT, Yeung KY, Ruzzo WL, Hsu L, Blount PL, Sullivan R, et al. Transcriptional analyses of Barrett's metaplasia and normal upper GI mucosae. *Neoplasia* 2002; 4:121-8.
- 203.Selaru FM, Zou T, Xu X, Shustova V, Yin J, Mori Y, et al. Global gene expression profiling in Barrett's esophagus and esophageal cancer: a comparative analysis using cDNA microarrays. *Oncogene* 2002; 21:475-8.
- 204.Xu Y, Selaru FM, Yin J, Zou TT, Shustova V, Mori Y, et al. Artificial neural networks and gene filtering distinguish between global gene expression profiles of Barrett's esophagus and esophageal cancer. *Cancer Res* 2002; 62:3493-7.

ANEXOS

ANEXO 1

PROTOCOLO DE COLETA DE INFORMAÇÕES.

MODELO DE FICHA TIPO A

ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA

ENDOCENTRO

Nome :

Idade:

Sexo: (☐) Masculino (☐) Feminino

Queixa principal e duração.....

- (☐) Até 30 dias
- (☐) Meses (de 01 a 12 meses)
- (☐) Anos (acima de doze meses)

DADOS DA ENDOSCOPIA DIGESTIVA ALTA

1. Esofagite por refluxo (Classificação de Savary-Miller modificada) :

(☐) Grau I

(☐) Grau II

(☐) Grau III

(☐) Grau IV

(☐) Grau V

2. Esôfago de Barrett :

Extensão.....(☐) 01-03cm

(☐) > 03cm

3. Neoplasia de esôfago :

TIPO	ASPECTO ENDOSCÓPICO
------	---------------------

() 0.....	Superficial : polipóide, elevado, plano, deprimido, ulcerado.
------------	---

() 1.....	Avançado : polipóide de base larga.
------------	-------------------------------------

() 2.....	Avançado : ulcerado de bordas elevadas e bem delimitadas.
------------	---

() 3.....	Avançado : ulcerado, de bordas infiltrativas.
------------	---

() 4.....	Avançado : infiltração difusa, sem ulceração.
------------	---

() 5.....	Avançado : não-classificável.
------------	-------------------------------

MODELO DE FICHA TIPO B
LAUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO
LABORATÓRIO VIRCHOW

Nome :

Idade:

Sexo: (☐) Masculino (☐) Feminino

DIAGNÓSTICO ENDOSCÓPICO :

1. Esofagite por refluxo (Classificação de Savary-Miller modificada):

(☐) Grau I

(☐) Grau II

(☐) Grau III

(☐) Grau IV

(☐) Grau V

2. Esôfago de Barrett :

Extensão.....(☐) 01-03cm

(☐) > 03cm

3. Neoplasia de esôfago

TIPO	ASPECTO ENDOSCÓPICO
-------------	----------------------------

() 0.....	Superficial : polipóide, elevado, plano, deprimido, ulcerado.
----------------	---

() 1.....	Avançado : polipóide de base larga.
----------------	-------------------------------------

() 2.....	Avançado : ulcerado de bordas elevadas e bem delimitadas.
----------------	---

() 3.....	Avançado : ulcerado, de bordas infiltrativas.
----------------	---

() 4.....	Avançado : infiltração difusa, sem ulceração.
----------------	---

() 5.....	Avançado : não-classificável.
----------------	-------------------------------

DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO

Descrição da macroscopia:

.....

.....

.....

.....

.....

Descrição da microscopia :

.....

.....

.....

.....

Conclusão Diagnóstica:

.....

.....

DIAGNÓSTICO IMUNOISTOQUÍMICO

1) Biomarcador tecidual nuclear p-53

Intensidade da imunomarcação nuclear :

- () 0+ = Marcação negativa ou ausência de expressão.
- () 1+ = Marcação positiva focal.
- () 2+= Marcação positiva multifocal.
- () 3+= Marcação positiva - moderada e difusa.
- () 4+= Marcação positiva intensa.

➤ **Padrão de expressão dos núcleos imunomarcados**

- () 1= <25% de núcleos imunomarcados.
() 2= 25-50% de núcleos imunomarcados.
() 3= >50-75% de núcleos imunomarcados.
() 4= >75% de núcleos imunomarcados

Número de células (0-100)

Lâmina 01..... %.
Lâmina 02..... %.
Lâmina 03..... %.
Lâmina 04..... %.
MÉDIA NOS 04 CAMPOS..... %

➤ **ESCORE FINAL : TOTAL ()**

* Mínimo de 0 e máximo de 16

2) Biomarcador tecidual nuclear ki-67

Intensidade da imunomarcação nuclear :

- () 0+ = Marcação negativa ou ausência de expressão.
() 1+ = Marcação positiva focal.
() 2+ = Marcação positiva multifocal.
() 3+ = Marcação positiva - moderada e difusa.
() 4+ = Marcação positiva intensa

➤ **Padrão de expressão dos núcleos imunomarcados**

- () 1= <25% de núcleos imunomarcados.
() 2= 25-50% de núcleos imunomarcados.
() 3= >50-75% de núcleos imunomarcados.
() 4= >75% de núcleos imunomarcados

Número de células (0-100)

Lâmina 01..... %.
Lâmina 02..... %.
Lâmina 03..... %.
Lâmina 04..... %.
MÉDIA NOS 04 CAMPOS..... %

➤ **ESCORE FINAL : TOTAL ()**

* Mínimo de 0 e máximo de 16

3) Biomarcador tecidual citoplasmático E-Caderina

➤ **Intensidade da imunomarcção citoplasmática :**

- () 0+ = Marcação negativa ou ausência de expressão;
() 1+ = Marcação positiva focal;
() 2+ = Marcação positiva multifocal;
() 3+ = Marcação positiva - moderada e difusa;
() 4+ = Marcação positiva intensa.

➤ **Intensidade da expressão antigênica citoplasmática :**

- () 1= <25% células com marcação citoplasmática;

- () 2= 25-50% células com marcação citoplasmática;
- () 3= >50-75% células com marcação citoplasmática;
- () 4= > 75% células com marcação citoplasmática.

Número de células (0-100)

Lâmina 01..... %.

Lâmina 02..... %.

Lâmina 03..... %.

Lâmina 04..... %.

MÉDIA NOS 04 CAMPOS..... %

➤ ESCORE FINAL : TOTAL ()

* Mínimo de 0 e máximo de 16

4) **Biomarcador tecidual citoplasmático COX-2**

➤ **Intensidade da imunomarcação citoplasmática :**

- () 0+ = Marcação negativa ou ausência de expressão;
- () 1+ = Marcação positiva focal;
- () 2+ = Marcação positiva multifocal;
- () 3+ = Marcação positiva - moderada e difusa;
- () 4+ = Marcação positiva intensa.

➤ **Intensidade da expressão antigênica citoplasmática :**

- () 1= <25% células com marcação citoplasmática;
- () 2= 25-50% células com marcação citoplasmática;
- () 3= >50-75% células com marcação citoplasmática;

() 4= > 75% células com marcação citoplasmática.

Número de células (0-100)

Lâmina 01..... %.

Lâmina 02..... %.

Lâmina 03..... %.

Lâmina 04..... %.

MÉDIA NOS 04 CAMPOS..... %

➤ ESCORE FINAL : TOTAL ()

* Mínimo de 0 e máximo de 16

5) Biomarcador tecidual c-erbB-2

➤ **Intensidade da imunomarcação de membrana citoplasmática**

() 0+ = Ausência de marcação de membrana celular ou marcação apenas citoplasmática.

() 1+ = Marcação positiva focal ou fracamente perceptível em membranas celulares. Este padrão é imunistoquimicamente reportado como negativo.

() 2+ = Marcação moderada de membrana, na maioria das células.

() 3+ = Forte marcação de membrana celular (superexpressão).

Escore final () Mínimo de 1 e máximo de 4

ANEXO 2

AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB).

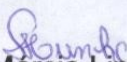


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

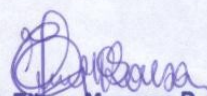
Certidão

Certifico, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em sua 59ª reunião ordinária, realizada no dia 25/05/2005, protocolo nº111/05, aprovou por unanimidade parecer favorável do relator Profº Iraquitã de Oliveira Caminha, referente Projeto de Pesquisa do Pesquisador Gluácio Nóbrega de Souza, intitulado "DOENÇA DE REFLUXO GASTROESOFÁGICO: Análise Comparativa entre os aspectos histopatológicos e de biologia molecular na esofagite por refluxo, no esôfago de Barrett e na displasia e adenocarcinoma associados ao esôfago de Barrett".

João Pessoa 27 de maio de 2005.


Andréia Márcia Lima D'Assunção
Secretária do CEP/CCS

Visto, encaminha-se ao interessado.


Profª. Eliane Marques D. de Sousa
Coordenadora CEP/CCS

ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título: DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO : *Análise comparativa entre os aspectos histopatológicos e de biologia molecular na esofagite por refluxo, no esôfago de Barrett e na displasia e adenocarcinoma associados ao esôfago de Barrett.*

Você tem um tipo de doença denominada ()esofagite por refluxo, ()esôfago de Barrett, ()esôfago de Barrett com displasia, ()esôfago de Barrett complicado com adenocarcinoma, que teve como causa principal e inicial o retorno anormal do líquido do seu estômago para o seu esôfago, chamado, cientificamente, de refluxo gastroesofágico patológico, e que progrediu, no seu caso, para uma das fases da doença, descritas acima. O seu diagnóstico médico foi dado, inicialmente, quando você realizou a sua endoscopia digestiva alta no Endocentro - clínica de gastroenterologia e endoscopia digestiva, ou na clínica (.....). Neste exame, também foram realizadas as biópsias, que é quando se coletam alguns pequenos fragmentos do tecido do seu esôfago, para uma análise em laboratório, chamada análise anatomopatológica, em que, com técnicas especiais, estuda-se esse material colhido com um microscópio especial. Esse segundo exame foi feito no Virchow – laboratório médico de patologia celular, ou no laboratório (.....) e permitiu a conclusão do seu diagnóstico endoscópico. Como é do seu conhecimento, os pacientes portadores dessa doença devem ser submetidos a tratamento clínico continuado, ou cirúrgico, dependendo do caso, e acompanhados, em algumas situações, de repetidos exames endoscópicos e de biópsias do esôfago, realizados periodicamente.

Estamos, neste momento, convidando você a participar do estudo denominado DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO : *Análise comparativa entre os aspectos histopatológicos e de biologia molecular na esofagite por refluxo, no esôfago de Barrett e na*

displasia e adenocarcinoma associados ao esôfago de Barrett. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como esse, por isso a sua participação (voluntária) é importante.

O objetivo desse estudo é, em uma primeira fase, aprofundar a análise do seu material de biópsia, que se encontra arquivado no laboratório Virchow ou no laboratório (.....), com técnicas especiais e mais modernas, que foram obtidas com o avanço da Medicina. Essa nova técnica chama-se imunoistoquímica.

Serão selecionadas, no seu arquivo de biópsias do laboratório Virchow, ou no laboratório (.....) as lâminas ideais para que possam ser pesquisadas a presença, ou não, de algumas substâncias, chamadas, tecnicamente, de biomarcadores moleculares teciduais, e que são as seguintes: Ki-67, COX-2, p53, E-caderina e c-erbB-2. A presença dessas substâncias, nas biópsias do esôfago, daqueles pacientes que têm a doença do refluxo gastroesofágico, têm sido descritas, nos artigos médicos nacionais e internacionais, como possivelmente relacionadas ao surgimento do câncer do esôfago.

Em uma segunda etapa, com as informações obtidas a partir dessas duas técnicas descritas anteriormente, a anatomopatológica e a imunoistoquímica, faremos uma comparação desses resultados entre si, e, também, com os seus dados clínicos e da sua endoscopia digestiva, que constam no seu prontuário no Endocentro ou na clínica (.....). Dessa forma obteremos, então, as conclusões do nosso projeto.

A sua participação durante todo o estudo será restrita a unicamente autorizar, livre e espontaneamente, o acesso a todos esses dados clínicos e laboratoriais descritos acima.

Não será feito nenhum procedimento outro que lhe traga qualquer desconforto ou risco à sua vida, bem como não será realizado nenhum exame médico ou laboratorial em você. Além disso, todas as informações sobre o estudo, solicitadas, poderão ser obtidas a qualquer tempo. Você também poderá não participar da pesquisa, ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você

não receberá qualquer valor em dinheiro. Também não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outras pacientes, que também não serão identificados.

Deixamos claro que somente ao final do trabalho é que poderemos tirar conclusões a respeito, quando então serão apresentados os resultados integralmente aos pacientes, com os quais se discutirá individualmente, caso a caso, oferecendo, aos mesmos, possíveis e novas contribuições no diagnóstico ou nas estratégias de tratamento.

O pesquisador utilizará todos os dados obtidos somente para esta pesquisa.

O principal investigador é o Dr. Gláucio Nóbrega de Souza, CRM 4299-PB, que pode ser encontrado no Endocentro, na Av. Camilo de Holanda 280 em João Pessoa-PB, fone 0 xx 83 - 32227300, em período integral.

Declaro que compreendi as informações do que li ou que me foram explicadas sobre o trabalho em questão.

Discuti com o Dr. Gláucio Nóbrega de Souza sobre minha decisão em participar nesse estudo, ficando claros para mim, quais são os propósitos da pesquisa, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e dos esclarecimentos permanentes.

Ficou claro também que minha participação não tem despesas, de que tenho livre acesso as informações parciais, a qualquer momento, ou integrais, ao término do estudo.

Concordo, voluntariamente, em participar desse estudo, podendo retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido, ou no meu atendimento no Endocentro ou na clínica (.....) ou no laboratório Virchow, ou no laboratório (.....).

João Pessoa, _____, de _____ de 2005.

Assinatura do(a) paciente ou do seu representante legal

Declaro que assisti a explicação do Dr. Gláucio Nóbrega de Souza a(o) paciente, que compreendeu e retirou suas dúvidas, assim como eu, a tudo o que será realizado na pesquisa.

Assinatura da testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido desta paciente ou representante legal para participação no presente estudo.

Dr. Gláucio Nóbrega de Souza

Pesquisador responsável

Em caso de dúvida em relação a esse documento, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, pelo telefone 0XX83-32167791.

Normas adotadas

Esta dissertação seguiu as normas estabelecidas pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas, denominadas Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomed Journals, e conhecidas como o estilo de Vancouver. Atualmente, mais de 500 periódicos em todo o mundo seguem essas normas, podendo ser localizado na Internet no endereço:

<http://www.cma.ca/publications/mwc/uniform.htm>