

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia**

**AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO ANTÍGENO KI-67 NA  
SEQÜÊNCIA BARRETT-ADENOCARCINOMA DE ESÔFAGO**

**Autor: Bernardo Silveira Volkweis**

**Orientador: Prof. Dr. Richard Ricachenevsky Gurski  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Luíse Meurer**

**Dissertação de Mestrado**

**2006**

**V921a** Volkweis, Bernardo Silveira

Avaliação imuno-histoquímica do antígeno KI-67 na seqüência Barrett-adenocarcinoma de esôfago / Bernardo Silveira Volkweis ; orient. Richard Ricachenevsky Gurski ; co-orient. Luise Meurer. – 2006. ix, 114 f. ; il. color.

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

1. Neoplasias esofágicas 2. Adenocarcinoma 3. Esôfago de Barrett 4. Marcadores biológicos de tumor 5. Antígeno Ki-67 6. Metaplasia I. Gurski, Richard Ricachenevsky II. Meurer, Luise III. Título.

NLM: WI 250

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

*Dedicatória:*

*Aos meus pais, Gaspar Estevão Volkweis e Margaret Silveira Volkweis, maiores responsáveis pela conclusão desta obra, pela dedicação incansável aos seus filhos, motivo prioritário de suas vidas, pelo apoio e incentivo constantes, pela educação privilegiada proporcionada, pelo seu caráter exemplar, pelo núcleo familiar sólido que criaram, pelo afeto e carinho.*

*À minha esposa, Juliana Fiedler Ryzewski, pelo amor, pela cumplicidade, pelo incentivo na realização deste trabalho, pela capacidade de vencer obstáculos, pela paz interior contagiante, pela perseverança e pela manutenção de um lar sempre acolhedor.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Richard Ricachenevsky Gurski, meu orientador, pelos ensinamentos de grande valor, tanto no âmbito profissional quanto pessoal, pelo exemplo de carreira acadêmica a ser seguido, pela amizade e pelas grandes oportunidades a mim proporcionadas.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Luíse Meurer, minha co-orientadora, pelos esforços dedicados à concretização desta obra, por sua disponibilidade, pela personalidade acessível, pelo exemplo de capacidade profissional e científica.

Ao Dr. Marcelo Krueel Schmidt, pela colaboração inestimável para a realização deste trabalho, pelos ensinamentos, pelo exemplo de profissional responsável e competente, pela grande amizade consolidada.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Isabel Edelweiss, pela participação fundamental na realização deste trabalho, pelo exemplo de dedicação às atividades acadêmicas e interesse pelos seus alunos.

Ao Prof. Dr. Carlos Cauduro Schirmer, pelos ensinamentos, pelo exemplo de profissional, pela amizade e pelo convívio agradável que tivemos no decorrer deste trabalho.

Ao Dr. André Ricardo Pereira da Rosa, pelo grande apoio profissional, pela colaboração na revisão deste trabalho e pelo exemplo de caráter e integridade pessoal.

Ao Dr. Alessandro Bersch Osvaldt, por estar sempre disposto a ajudar, compartilhando seu conhecimento privilegiado, de forma natural e espontânea, sendo uma referência de postura profissional e ética.

Ao Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Krueel, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao acadêmico Gustavo Morellato, pela atitude solícita e pela colaboração na coleta de dados.

Ao Sr. Wolfgang William Schmidt Aguiar, à Dra. Vânia Naomi Hirakatu e ao Dr. Mário Wagner, pela colaboração na realização da análise estatística.

À Sra. Neiva Copetti, pela colaboração inestimável na confecção das lâminas.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA), pelo suporte na elaboração e na realização deste trabalho.

Aos Serviços de Cirurgia Geral e de Patologia do HCPA, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Centro de Pesquisas do HCPA, pelo auxílio na elaboração do orçamento, aquisição do material e na realização da técnica imunohistoquímica.

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, pelo incentivo à pesquisa, pela oportunidade de especialização e de participação de um programa de tão elevada qualidade.

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	VIII
Lista de Figuras.....	IX
Resumo do Artigo de Revisão.....	1
Abstract do Artigo de Revisão.....	2
Artigo de Revisão.....	3-40
1. Aspectos Históricos.....	4
2. Definição.....	5
3. Epidemiologia.....	6
4. Etiologia e Patogênese.....	8
5. Displasia e Avaliação Prognostica Atual.....	12
6. Biologia Molecular e Carcinogênese.....	14
6.1. O Ciclo Celular.....	14
6.2. Marcadores celulares.....	15
6.2.1. Proteína do Retinoblastoma, Ciclinas e Quinases Dependente de Ciclinas (cdks).....	16
6.2.2. Fatores de Crescimento.....	17
6.2.3. Família INK-4 de Inibidores de Ciclo Celular.....	18
6.2.4. Cateninas, caderinas e gene da polipose adenomatosa colônica (APC).....	18
6.2.5. Apoptose.....	19

6.2.6. Telômeros.....	20
6.2.7. Ploidia do DNA.....	21
6.2.8. A Proteína P53.....	21
7. Atividade Proliferativa e Ki-67.....	23
8. Ki-67 e a Seqüência Metaplasia-Displasia-Adenocarcinoma.....	26
9. Análise do Autor.....	29
Referências Bibliográficas.....	31
Justificativa.....	41
Objetivos.....	42
Resumo do Artigo Original.....	43
Artigo Original.....	43-75
1. Introdução.....	45
2. Materiais e Métodos.....	47
2.1. Pacientes.....	47
2.2. Critérios Diagnósticos de Barrett, displasia e adenocarcinoma.....	49
2.3. Análise Imuno-histoquímica.....	49
2.4. Análise estatística.....	52
2.5. Considerações Éticas.....	53
3. Resultados.....	54
4. Discussão.....	62
4.1. Métodos.....	62
4.2. Resultados.....	64
5. Conclusões.....	70
Referências Bibliográficas.....	71

Abstract.....	76
Artigo em Inglês.....	77-103
1. Introduction.....	78
2. Materials and Methods.....	80
2.1. Patients.....	80
2.2. Diagnostic Criteria for Barrett's Esophagus, Dysplasia and Adenocarcinoma.....	81
2.3. Immunohistochemical Analysis.....	82
2.4. Statistical Analysis.....	84
2.5. Ethical Aspects.....	85
2.6. Results.....	85
3. Discussion.....	91
3.1. Methods.....	92
3.2. Results.....	93
4. Conclusions.....	98
Reference list.....	99
Anexo A.....	104



**Lista de Abreviaturas**

ACE	– Adenocarcinoma de esôfago
APC	– Polipose adenomatosa colônica
CDKS	– Quinases dependente de ciclinas
COX-2	– Ciclooxygenase-2
DAB	– diaminobenzidina
DAG	– Displasia de alto grau
DBG	– Displasia de baixo grau
DNA	– Ácido desoxirribonucléico
DRGE	– Doença do refluxo gastroesofágico
EDA	– Endoscopia digestiva alta
EB	– Esôfago de Barrett
EGF	– Fator de crescimento epidérmico
FasL	– <i>Fs-ligand</i>
GCEEID	– Grupo de Cirurgia do Esôfago, Estômago e Intestino Delgado
HCPA	– Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HP	– <i>Helicobacter pylori</i>
kDa	– Quilodaltons
LEF-1	– <i>Lymphoid enhanced binding factor</i>
LSAB	– complexo streptavidina-biotina
MAPK	– <i>Ras/Raf/mitogen-activated protein kinases</i>
MIC	– Metaplasia intestinal do cárdia
PBS	– Tampão salina-fosfato
PCNA	– Antígeno nuclear de proliferação celular
Rb	– Retinoblastoma
RNA	– Ácido ribonucléico
TCF	– Fator de células T
TGF- $\alpha$	– Fator de crescimento transformador alfa
UICC	– União Internacional contra o Câncer

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo de Revisão

<b>Figura 1.</b> O ciclo celular.....	15
---------------------------------------	----

### Artigo Original

<b>Figura 1.</b> Índice de Expressão do Ki-67.....	51
<b>Figura 2.</b> Exemplo da marcação imuno-histoquímica para o Ki-67.....	52
<b>Tabela 1.</b> Características demográficas dos pacientes.....	54
<b>Figura 3.</b> Exemplo da marcação imuno-histoquímica para o Ki-67 em paciente com EB.....	56
<b>Figura 4.</b> Exemplo da marcação imuno-histoquímica para o Ki-67 em paciente com ACE.....	57
<b>Figura 5.</b> Atividade do Ki-67 na seqüência Barrett-adenocarcinoma.....	58
<b>Figura 6.</b> Correlação entre Ki-67 e progressão Barrett-Adenocarcinoma...	59

### Artigo Original (Versão em Inglês)

<b>Figure 1.</b> Ki-67 Index.....	83
<b>Figure 2.</b> Example of Ki-67 immunohistochemical staining.....	84
<b>Table 1.</b> Demographic data.....	86
<b>Figure 3.</b> Example of Ki-67 Immunohistochemistry in BE.....	87
<b>Figure 4.</b> Example of Ki-67 Immunohistochemistry in EAC.....	88
<b>Figure 5.</b> Ki-67 index variation in patient groups.....	89
<b>Figure 6.</b> Correlation between Ki-67 and Barrett-adenocarcinoma sequence.....	90

Resumo

## **ESÔFAGO DE BARRETT: ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E MOLECULARES DA SEQÜÊNCIA METAPLASIA-DISPLASIA-ADENOCARCINOMA – ARTIGO DE REVISÃO**

**Objetivos.** Realizar uma revisão da literatura sobre os aspectos fisiopatológicos e moleculares da carcinogênese do esôfago de Barrett.

**Introdução.** O esôfago de Barrett (EB) é definido pela presença de mucosa colunar no esôfago distal, visível à endoscopia digestiva alta, e que, à biópsia, demonstre metaplasia do tipo intestinal, com células caliciformes. O EB representa o estágio avançado da doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) e constitui fator de risco importante para o desenvolvimento de adenocarcinoma de esôfago (ACE). Esses pacientes, portanto, necessitam seguimento apropriado, que possibilite o diagnóstico precoce dessa neoplasia.

**Etiologia e Patogênese.** O EB associa-se com alterações acentuadas em estudos da fisiologia esofágica e o refluxo alcalino duodenogastroesofágico parece ter papel importante no seu aparecimento. O desenvolvimento do EB ocorre em etapas, iniciando-se com a formação do epitélio metaplásico colunar tipo cárdico, e posterior especialização do mesmo para o tipo intestinal com células caliciformes. A partir de então, a progressão pode seguir uma seqüência, com o aparecimento da displasia de baixo grau, alto grau e adenocarcinoma de esôfago.

**Avaliação prognostica atual.** Fundamenta-se na avaliação da displasia. Possui várias limitações, constituindo grupos heterogêneos de pacientes.

**Marcadores Moleculares.** Marcadores de diferentes etapas da carcinogênese têm sido pesquisados, para se encontrar um indicador prognóstico ideal. Vários mecanismos têm sido implicados no surgimento do câncer, como atividade proliferativa descontrolada, inibição da apoptose, angiogênese, capacidade de invasão tecidual e metastatização. Várias moléculas reguladoras do ciclo celular foram estudadas no EB, como a proteína do retinoblastoma, as ciclinas, as quinases dependente de ciclinas e os inibidores do ciclo celular. A proteína P53 tem sido uma das mais investigadas na progressão metaplasia-adenocarcinoma. Fatores de crescimento, proteínas apoptóticas, telômeros e ploidia do DNA também estão sendo pesquisados. A atividade proliferativa aumentada tem sido implicada na carcinogênese do EB e o antígeno Ki-67, aferido por análise imuno-histoquímica, tornou-se o método de eleição para sua determinação. Localizado no núcleo, está presente em células nas fases de proliferação e ausente na fase de repouso. Vários estudos demonstram boa associação da expressão do Ki-67 com a seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma.

**Conclusão.** Não existe um marcador prognóstico ideal da evolução metaplasia-displasia-adenocarcinoma até o momento. A avaliação da atividade proliferativa pelo índice de expressão do Ki-67 tem apresentado boa correlação com esta progressão, assim como outros marcadores. Os resultados, porém, ainda são inconclusivos e essa linha de pesquisa deve seguir em desenvolvimento.

**Palavras-chave:** Esôfago de Barrett, Adenocarcinoma, Neoplasias esofágicas, Antígeno Ki-67, Marcadores biológicos de tumor, Metaplasia

## ABSTRACT

### BARRETT'S ESOPHAGUS: PATHOPHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR ASPECTS OF METAPLASIA-DYSPLASIA-ADENOCARCINOMA SEQUENCE – REVIEW ARTICLE

**Objectives.** To review the pathophysiological and molecular aspects of Barrett's carcinogenesis.

**Introduction.** The Barrett's esophagus (BE) is defined as endoscopically visible columnar mucosa at the distal esophagus, of any extension, proved to harbor intestinal metaplasia on biopsy, highlighted by the presence of goblet cells. BE denotes long-standing gastroesophageal reflux disease (GERD) and is an important risk factor for the development of esophageal adenocarcinoma (EAC). Therefore, these patients must be on follow-up, in order to diagnose cancer early.

**Etiology and Patogenesis.** BE patients have frequent alterations in esophageal physiologic studies. Alkaline duodenogastroesophageal reflux seems to have important role. The development BE occurs in steps, initially with formation of cardiac type mucosa subsequent intestinalization. Further progression can follow a sequence, from low grade dysplasia, to high grade dysplasia and esophageal adenocarcinoma.

**Prognostic Evaluation.** Current follow-up is based on the presence of dysplasia. It has limitations, grouping patients heterogeneously.

**Molecular Markers.** Different steps of carcinogenesis have been studied looking for an ideal prognostic marker. Uncontrolled proliferative activity, apoptosis inhibition, angiogenesis, tissue invasion and metastases formation are all implicated in cancer origin. Some cycle cell molecules have been studied in BE, such as retinoblastoma protein, cyclins, kinase dependent cyclins and cell cycle inhibitors. The P53 protein is one of the most investigated in the metaplasia-adenocarcinoma progression. Growth Factors, apoptotic proteins, telomers and DNA ploidy have also been searched. Increased proliferative activity has been implicated in Barrett's carcinogenesis and the Ki-67 antigen, through immunohistochemical analysis, has become the method of choice. Present in the nucleus, it is found in proliferative cells only. Some studies support association between Ki-67 activity and the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence.

**Conclusion.** The ideal prognostic marker of metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma evolution is still unknown. Ki-67 proliferative activity correlates with that progression, as well as other markers. The results, however, are inconclusive and research should follow this way.

**Keywords:** Barrett's esophagus, Adenocarcinoma, Esophageal neoplasms, Ki-67 antigen, Biological tumour markers, Metaplasia

**Esôfago de Barrett: Aspectos Fisiopatológicos e Moleculares da Sequência  
Metaplasia-Displasia-Adenocarcinoma - Artigo de Revisão**

***Barrett's Esophagus: Physiopathological and Molecular Aspects of Metaplasia-  
Dysplasia-Adenocarcinoma Sequence – Review Article***

*(pré-artigo para ser enviado à Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões)*

**Autores:**

**Bernardo Silveira Volkweis**

**Richard Ricachenevsky Gurski**

**Luise Meurer**

**Maria Isabel Edelweiss**

***Local de Realização:***

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

*Rua Ramiro Barcelos, 2350 - CEP 90035-003. Bairro Rio Branco - Porto Alegre - RS*

*– Brasil. Fone: (51) 2101.8000.*

***Endereço para Correspondências:***

*Bernardo Silveira Volkweis*

*Rua Dr. Paulo Franco dos Reis Nº 100/ 302 CEP 90480090*

*Porto Alegre - RS – Brasil. Fone: (51) 30281841*

*Email: bvolkweis@terra.com.br*

## 1. Aspectos Históricos

Em 1950, um cirurgião britânico chamado Norman Barrett descreveu a presença de úlceras distais à junção escamo-colunar esofágica, a qual encontrava-se mais proximal que o habitual. Naquela época, considerava-se que a transição mucosa definia o órgão e que, portanto, as úlceras eram em tecido gástrico deslocado proximalmente por aderências mediastinais ou por esôfago curto congênito (1). Posteriormente, em 1953, Allison e Johnston reconheceram que o órgão se tratava de esôfago, porém com revestimento semelhante ao do estômago. Em 1957, Barrett publicou a descrição de esôfago distal com revestimento colunar, não justificado simplesmente por uma hérnia hiatal, e cujo epitélio não satisfazia as características do epitélio gástrico. Logo foi reconhecido que esse epitélio se tratava de uma condição adquirida, às custas de uma agressão ácida prolongada, sendo após denominada esôfago de Barrett (EB) (2).

## 2. Definição

Inicialmente, utilizava-se como critério diagnóstico a extensão mínima de 3 cm de epitélio colunar, com o conceito de que até 2 cm seria “normal” e que, com o ponto de corte de 3 cm, evitar-se-ia o exagero diagnóstico. Posteriormente, identificou-se que um fator importante para o risco de malignidade era o tipo de epitélio, sendo o tipo especializado intestinal, com células caliciformes, o que se associava com alterações displásicas e adenocarcinoma. Portanto, esse achado foi incorporado à definição de EB. Da mesma forma, pequenos segmentos (<3cm) também apresentavam risco de malignização, ampliando a definição de EB. A situação de metaplasia intestinal à biópsia da transição esôfago-gástrica, sem epitélio colunar endoscópico, caracteriza a metaplasia intestinal do cárdia (MIC), situação associada a DRGE, provavelmente em estágio mais inicial que o EB (1;3;4).

O esôfago de Barrett (EB) é atualmente definido pela presença de mucosa colunar em esôfago distal, visível na Endoscopia Digestiva Alta (EDA), de qualquer extensão, e que à biópsia demonstre metaplasia intestinal especializada, caracterizada pela presença de células caliciformes (5). Representa estágio avançado da doença do refluxo gastro-esofágico (DRGE) e constitui fator de risco importante ao desenvolvimento do adenocarcinoma de esôfago (ACE) (6-8).

### 3. Epidemiologia

O EB tem sua prevalência bastante variável na literatura, devido principalmente a diferentes critérios diagnósticos já utilizados, bem como à diversidade dos grupos analisados. Cerca de 15 a 30% das pessoas apresentam refluxo gastro-esofágico regularmente, dos quais 5-10% poderão desenvolver EB. Portanto, até 3% da população ocidental pode desenvolver EB (3). EB foi encontrado em cerca de 20% dos pacientes com sintomas digestivos altos (n=556) (9).

O adenocarcinoma de esôfago tem apresentado incidência crescente, no mundo ocidental, superando o carcinoma epidermóide e tornando-se o tipo mais comum das neoplasias de esôfago em algumas populações (10-12). Existem poucas publicações sobre a distribuição do adenocarcinoma de esôfago no Brasil e em nosso meio. Um estudo conduzido em Porto Alegre (RS), em um serviço de referência, descreveu proporção de 15% de adenocarcinomas dentre os tumores do esôfago e junção esôfago-gástrica (53/349) no período de 1987-1996 (13). Constitui uma doença de elevada mortalidade e sua curabilidade depende do diagnóstico precoce. Mesmo assim, as metástases linfáticas estão presentes em 6% dos carcinomas intramucosos e 24% dos submucosos.

O risco de evolução para câncer em pacientes com EB é elevado, sendo relatado de 0,2 a 2,9% ao ano, cerca de 30 a 125 vezes o da população (1;14). No entanto, a maioria dos estudos apresenta amostras pequenas e não representativas da população. Por outro lado, estudos populacionais freqüentemente sofrem limitação por estabelecerem critérios diagnósticos imperfeitos para EB. A



mortalidade dos pacientes com EB tem resultados conflitantes, muitos deles semelhantes à da população (15-19).

A incidência de ACE em pacientes com metaplasia colunar do esôfago distal, visível ou não à endoscopia, foi avaliada em grande estudo populacional na Irlanda do Norte no período de 1993 a 2000 (20). Foram diagnosticados 29 pacientes com câncer em 2.373 pacientes com metaplasia colunar esofágica. Com um seguimento médio de 11.068 pessoas-ano, o risco de ACE foi de 0,26% ao ano e de 0,4% ao ano para o subgrupo com metaplasia do tipo intestinal. Apenas homens com metaplasia colunar e com mais de 70 anos tiveram risco para neoplasia maior que 1% ao ano. A mortalidade proporcional por ACE foi significativamente maior nos pacientes com EB, especialmente nos com metaplasia intestinal, a qual foi 8 vezes maior (15).

#### 4. Etiologia e Patogênese

O EB está associado com DRGE de longa duração (9), embora os sintomas não tenham correlação precisa com refluxo patológico. As alterações manométricas do esfíncter esofageano inferior estão presentes em mais de 90% dos casos. A pHmetria de 24 horas demonstra refluxo ácido patológico em quase todos os pacientes. A motilidade ineficaz do corpo esofágico é freqüente nos pacientes com EB (1;5;21;22).

O refluxo alcalino duodenogastroesofágico, especialmente pela participação dos sais biliares, tem recebido atenção crescente no estudo da fisiopatogenia do EB e do ACE. O efeito carcinogênico dos sais biliares parece estar relacionado com sua capacidade de penetrar nas células, o que é dependente do pH do meio. Em pH intermediário, entre 3 e 5, parece haver um ambiente favorável aos efeitos tóxicos dos sais biliares, devido ao componente não-ionizado que penetra nas células. Esse pH é freqüentemente encontrado em pacientes com uso de doses baixas e usuais de medicações anti-secretoras de ácido (1).

Apesar de controvérsias em sua patogenia, o EB parece surgir de um processo que se inicia na “colunarização” da mucosa (1º passo) e posterior “intestinalização” (2º passo), com aumento gradual da extensão da mucosa colunar metaplásica (21;22). A região do esôfago distal entre o ligamento freno-esofágico e a junção esôfago-gástrica foi descrita por Hayward como o cárdia (2). Estudos demonstraram que, no estado normal, essa região deveria ser revestida por epitélio escamoso, como o restante do esôfago proximal, e que a transição para o estômago se daria de forma abrupta, para uma mucosa oxíntica.

Em situações de refluxo gastroesofágico patológico, pode ocorrer uma transformação do epitélio escamoso para um epitélio colunar semelhante ao gástrico, porém mais simples e composto apenas por células colunares e mucosas, desprovido de células especializadas – parietais, principais e caliciformes, denominado epitélio juncional ou cárdico. Esse epitélio está usualmente presente em pacientes com sintomas de refluxo gastroesofágico, além de freqüentemente apresentar reação inflamatória à análise histológica. Essa situação, denominada de cardite, tem-se associado positivamente com demais evidências laboratoriais de refluxo gastroesofágico. Uma das hipóteses causais dessa transformação seria a estimulação de células-tronco do epitélio escamoso (3).

A exposição continuada do esôfago ao refluxo patológico pode determinar a progressão em extensão proximal da mucosa cárdica. Quanto maior o seu comprimento, maior a chance desse epitélio apresentar diferenciação do tipo intestinal, com a presença de células caliciformes, caracterizando o EB (9). A intestinalização da mucosa colunar associa-se com diminuição da atividade inflamatória, supostamente por uma maior resistência à agressão ácida. A metaplasia intestinal ocorre principalmente na área mais proximal da mucosa colunar, próximo da transição escamo-colunar, com progressão distal variável (9). Esse fato pode ser explicado pelo ambiente menos ácido dessa região (pH entre 3 e 5), pela maior neutralização da saliva e pela distância da junção esôfago-gástrica, levando a um pH que favorece a intestinalização. O período entre a formação do epitélio colunar simples e sua posterior diferenciação intestinal tem sido relatado como de 5 a 10 anos, em média (1;9;23).

A “intestinalização” da mucosa cárdica caracteriza um estágio pré-maligno, visto que a mesma pode progredir para displasia e adenocarcinoma. Os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo não estão bem esclarecidos. Sabe-se, todavia, que pacientes com EB apresentam maior duração dos sintomas e maior refluxo biliar. Estudos experimentais demonstraram que o epitélio intestinal sofre maior atividade proliferativa quando submetido a estímulo ácido e alcalino alternados, e não apenas ao estímulo ácido (24).

O processo de “intestinalização” parece ser de instalação gradual e progressiva (1). De acordo com a extensão do epitélio colunar, o EB pode ser classificado em curto ( $\leq 3\text{cm}$ ) ou longo ( $> 3\text{cm}$ ). Estudos têm demonstrado que a extensão do EB tem correlação inversa à pressão e ao comprimento do esfíncter esofágico inferior e direta à intensidade do refluxo ácido esofágico (9;24). Também o clearance esofágico está prejudicado, quanto maior a extensão do epitélio metaplásico (1;9;21;24).

A metaplasia intestinal encontrada em mucosa cárdica da junção gastroesofágica, não-visível à endoscopia digestiva alta, não é considerada EB, porém parece ser resultado de refluxo gastroesofágico, e não da infecção por *Helicobacter pylori* (HP), como se pensava anteriormente. A infecção pelo HP está associada à metaplasia intestinal que ocorre no epitélio fúndico, de qualquer localização. Portanto, a presença de epitélio metaplásico do tipo intestinal, na junção gastroesofágica, pode estar associada a DRGE, se ocorrer em epitélio cárdico, ou ser devida à infecção por HP, se em epitélio fúndico, com células oxínticas e parietais.(22)

A progressão do EB para o ACE decorre de uma série de eventos genéticos e

epigenéticos que se manifestam fenotipicamente em uma seqüência: metaplasia, displasia de baixo grau, displasia de alto grau e adenocarcinoma (25-28).

## 5. Displasia e avaliação prognóstica atual

Displasia significa a presença de epitélio neoplásico restrito à membrana basal, sendo, portanto, uma lesão pré-maligna e que também pode ser chamada de neoplasia intra-epitelial. Encontra-se entre o espectro que vai desde alterações regenerativas não neoplásicas (atipias indefinidas para displasia) até neoplasia com invasão da lâmina própria (carcinoma). Seu diagnóstico compreende aspectos arquiteturais e citológicos. Identificam-se proliferação e distorção glandular. Alterações citológicas incluem variação de tamanho e forma nuclear, aumento nuclear e nucleolar e da relação núcleo/citoplasma, hipercromatismo e aumento das mitoses anormais.(29;30)

De acordo com o grau de anormalidades, as alterações citológicas podem ser classificadas em: indeterminada para displasia, displasia de baixo grau (DBG) e displasia de alto grau (DAG). A avaliação prognóstica atual é baseada na presença e graduação da displasia, sendo os pacientes arrolados em seguimento endoscópico com biópsias seriadas, segundo essa classificação (3;31).

A displasia significa risco aumentado de ACE. Contudo, a história natural dos pacientes com diferentes estágios de displasia é variável, sugerindo que tal classificação é heterogênea. Isso pode ser explicado por vários fatores: variabilidade diagnóstica intra e inter-observador, problemas de amostragem e regressão variável para epitélio não-neoplásico.(30;32;33) Montgomery et al realizaram estudo prospectivo avaliando a concordância do diagnóstico de displasia no EB, sua evolução e sobrevida. O diagnóstico “majoritário” da displasia foi possível em 72% (39/138) dos casos, definido pela concordância em 13 ou mais de um total

de 24 avaliações. Pacientes sem displasia não evoluíram para câncer em seguimento médio de 48 meses. Pacientes indefinidos para displasia ou com DBG apresentaram com progressão para câncer em 14 a 20% dos casos, após seguimento médio de 39 meses. Pacientes com displasia de alto grau foram submetidos a ressecção precoce e apresentaram câncer em até 60% dos casos. Não houve mortalidade nos pacientes sem displasia. Um paciente dos 15 (7%), com diagnóstico inicial de DBG, morreu aos 46 meses de ACE, ao passo que 13% (2/15) dos pacientes com DAG morreram dentro de 20 meses em média. A mortalidade dos pacientes com diagnóstico inicial de câncer foi de 33% (4/12).(34) A progressão para câncer também correlaciona-se com a extensão e com a presença de úlceras no epitélio colunar (31;34;35).

## 6. Biologia Molecular e Carcinogênese

Considerando-se o risco elevado de ACE nos pacientes com EB e as limitações da avaliação da displasia, vários marcadores moleculares têm sido pesquisados, a fim de indicar o prognóstico de forma mais precisa, uma vez que pacientes com EB progridem de forma heterogênea e variável na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma (3;29;29;36;37).

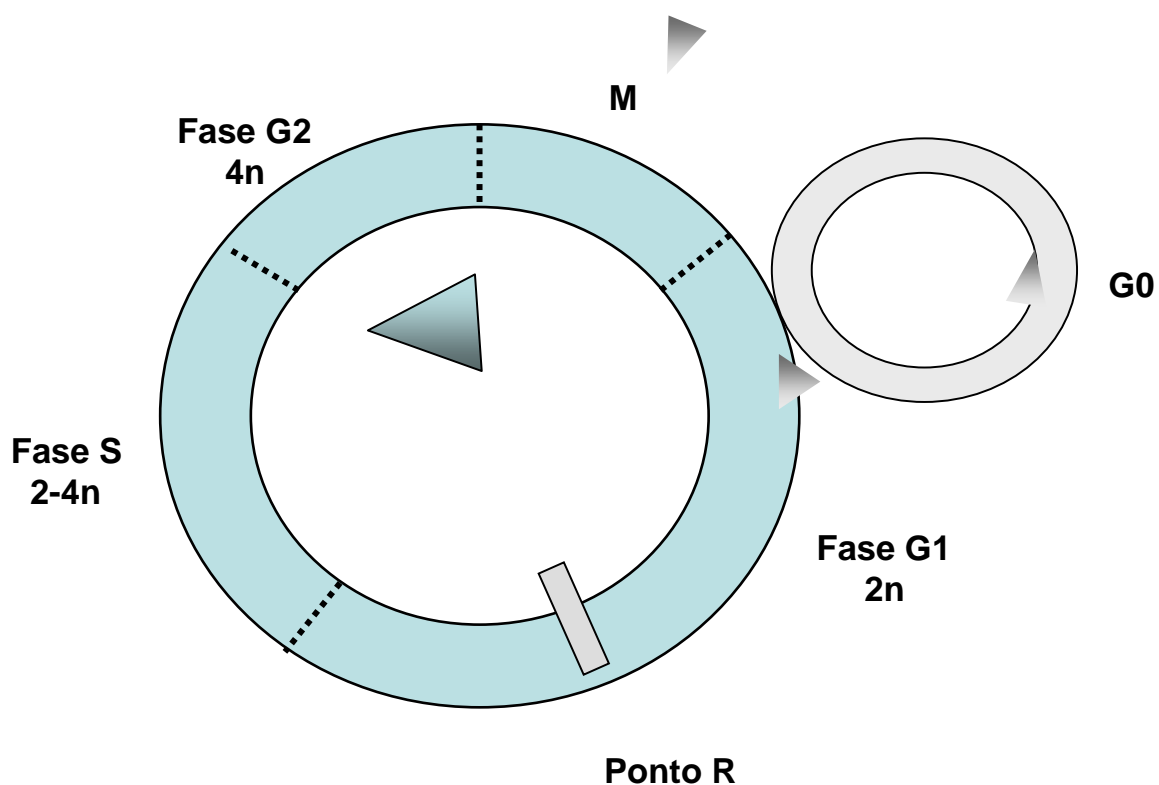
O processo da carcinogênese do EB envolve uma série de anormalidades genéticas e epigenéticas que ocorrem em múltiplas etapas e resultam em atividade proliferativa descontrolada, independente dos controles estimulatórios e inibitórios, bloqueio da morte celular programada (apoptose), estímulo à angiogênese e invasão tecidual (36-39). Os eventos com correlação mais constante e de maior aplicação prognóstica no EB, até o momento, são a atividade proliferativa, as alterações de ploidias do ácido desoxirribonucléico (DNA) e mutações do gene p53 (29). As fases do ciclo celular e os principais marcadores moleculares em estudo no esôfago de Barrett serão descritas sumariamente a seguir.

### 6.1. O Ciclo Celular

O ciclo celular compreende todo o período entre duas divisões mitóticas. É controlado por uma série de moléculas presentes no núcleo celular, que determinam se a célula entrará em mitose, diferenciação, repouso ou morte. Apresenta cinco fases: G1 (*first gap*), S (*DNA synthesis*), G2 (*second gap*), M (mitose) e G0



(repouso) (figura 1). Durante a fase G1, ocorre a síntese de proteínas e de ácido ribonucléico (RNA). Nessa fase, há um ponto crítico, denominado ponto de restrição (Ponto R), quando a célula pode seguir o ciclo para a divisão ou sair e entrar em repouso. Na fase S, ocorre a duplicação do DNA e a célula torna-se tetraplóide ( $4n$ ). Em G2, a célula prepara-se para a mitose. Na fase M, ocorre a divisão celular em duas células filhas diplóides ( $2n$ ). Após a mitose, a célula pode entrar na fase G0, na qual fica em repouso, ou reiniciar outro ciclo.(40)



**Figura 1. O ciclo celular.** Esquema representativo das fases do ciclo celular. O número cromossômico é referido pela letra “n”. (Adaptado de Souza RF, Morales CP, Spechler SJ. Review article: a conceptual approach to understanding the molecular mechanisms of cancer development in Barrett's oesophagus. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15(8):1087-1100.)

## 6.2. Marcadores Celulares

### 6.2.1. *Proteína do Retinoblastoma, Ciclinas e Quinases Dependente de Ciclinas (CDKS)*

Ao entrar na fase S, a célula segue o ciclo celular automaticamente, pouco suscetível a interrupções. Por outro lado, a transição G1-S é altamente regulada por fatores externos, principalmente de interações entre a proteína do retinoblastoma (Rb), ciclinas e quinases dependente de ciclinas (CDKs). O gene do Rb é um gene supressor tumoral, com papel no controle do ciclo celular e da apoptose. A proteína do Rb parece ser a controladora molecular da transição do ponto R. Quando fosforilada, a proteína Rb é inativada e permite a progressão da célula para a fase S. Por outro lado, quando não fosforilada, bloqueia o ciclo celular no ponto R. A fosforilação ocorre através da interação das ciclinas com CDKs.(41)

Os níveis de CDKs mantêm-se constantes no ciclo celular. Os de ciclina, porém, são variáveis. As ciclinas D1 e E têm sido implicadas na carcinogênese do esôfago de Barrett, tendo sido caracterizados seus respectivos oncogenes (11q13;19q12). Pacientes com EB têm expressão aumentada de ciclina D1 em 46% dos casos, e sua presença correlaciona-se com risco 6 a 7 vezes maior de ACE, em que está presente em até 70% dos casos.(42-44)

A perda do alelo 13q, locus do gene do Rb, tem sido encontrada em até 50% dos ACE, com perda da heterozigotidade em 36-48% dos casos, bem como alterações da transcrição do seu RNAm e perda imuno-histoquímica na progressão metaplasia-displasia-adenocarcinoma.(3;40;45;46)

### 6.2.2. Fatores de Crescimento

A atividade proliferativa aumentada também pode ser desencadeada por desequilíbrio dos fatores de crescimento, seus receptores ou nos seus mecanismos de transdução celular. Níveis elevados de Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) e do Fator de Crescimento Transformador-alfa (TGF- $\alpha$ ) seus receptores (ErbB-1 e ErbB-2) têm sido encontrados no EB e no ACE. Expressão aumentada dos genes dos receptores cErb-1 (17p12-13) e cErb-2 (17q21) tem sido relatada no ACE. Os resultados, contudo, são ainda inconclusivos. (3;40;47-50)

A interação dos fatores de crescimento com seus receptores, os quais têm propriedade de tirosina quinase, resulta na ativação da via Ras/Raf/mitogen-activated protein kinases (MAPK), que, por sua vez, culmina com o aumento dos níveis de ciclina D1. Até o momento, o oncogene K-Ras não se mostrou como um marcador promissor no EB.(50-52)

O TGF- $\beta$ 1 pode originar estímulos proliferativos ou inibitórios, através de 2 receptores, tipo 1 e tipo 2. Células normais usualmente respondem ao TGF- $\beta$ 1 com inibição proliferativa, ao passo que as cancerígenas, de forma oposta. Sua sinalização intracelular ocorre através das proteínas SMAD2 e SMAD3, que se unem com SMAD4, formando o complexo SMAD2,3,4, que migra ao núcleo, determinando a transcrição genética. Foram detectadas mutações dos receptores e das proteínas SMAD no ACE originado do EB, ainda com resultados controversos.(40;53;54)

### 6.2.3. Família INK4 de inibidores do ciclo celular

A ativação dos genes p15 e p16 resulta em inibição da proliferação celular. Ambos são membros da família INK-4 de inibidores celulares, os quais sintetizam proteínas que bloqueiam a fosforilação do Rb, induzida pelo complexo ciclina-cdk. Estudos sugerem que p15 e p16 são genes de supressão tumoral. A hipermetilação do p16, uma forma de inativação da transcrição de um gene, tem sido encontrada em 45 a 75% na carcinogênese de Barrett, sugerindo papel do p16 como supressor tumoral no ACE.(40;55-57)

### 6.2.4. Cateninas, caderinas e gene da polipose adenomatosa colônica (APC)

Caderinas são moléculas responsáveis pela adesão célula-célula, através de sua ligação com proteínas citoplasmáticas chamadas cateninas, que estão ligadas ao citoesqueleto celular. Defeitos na interação caderinas-cateninas poderiam contribuir para aumento da agressividade tumoral. Alguns tumores que apresentam diminuição da função da E-caderina apresentam maior agressividade e metastatização.(58;59)

A  $\beta$ -catenina também participa de vias de transdução celular, através da ativação no núcleo do fator de células T/lymphoid enhanced binding factor (TCF/LEF-1), os quais aumentam transcrição de genes de crescimento. Na ausência de sua ativação,  $\beta$ -catenina é degradada pela proteína da APC, a qual compete com

as caderinas. Carcinogênese pode ocorrer por ativação da via da  $\beta$ -catenina ou por inibição de sua degradação. Estudos com as caderinas e  $\beta$ -catenina ainda têm resultados controversos na carcinogênese de Barrett. A inativação do gene APC por metilação do promotor, no entanto, está presente em 80-90% dos casos com ACE e em 40-50% dos pacientes com EB sem displasia.(60-65)

#### 6.2.5. Apoptose

A apoptose consiste na morte celular programada, ocorrendo na presença de danos irreparáveis ao DNA da célula. O gene p53 tem papel importante em induzir apoptose, presumivelmente através da indução de BAX (proteína pro-apoptótica), do Faz (receptor da superfície celular) e da diminuição das  $\beta$ -cateninas.(66;67)

O aumento da ciclooxigenase-2 (COX-2) tem sido associado com resistência à apoptose. A produção da COX-2 pode ser estimulada por uma série de fatores, podendo ser produto da ativação da via Ras/Raf/MAPK. A COX-2 tem sido encontrada em níveis aumentados no ACE e no EB. (68;69)

A sistema Fas-Fas ligand participa na apoptose mediada por linfócitos. Fas é um receptor celular que, quando ativado por Fas-ligand (FasL), induz à apoptose. Fas-ligand está presente na superfície de linfócitos. Tumores podem apresentar diminuição do Fas, com resistência à apoptose mediada por linfócitos. Também pode ocorrer expressão de FasL na superfície de alguns tumores, induzindo a apoptose de linfócitos que expressem receptores Fas. FasL esteve presente até 100% dos pacientes com ACE e EB com displasia. O papel do sistema Fas-FasL é ainda controverso na carcinogênese do EB.(70;71)

### 6.2.6. *Telômeros*

Os telômeros são seqüências de DNA que ocupam as extremidades dos cromossomos, que não são codificadas, e servem como reguladoras da divisão celular. A cada divisão, ocorre um pequeno encurtamento dessa região, com progressiva diminuição, até que o ponto crítico seja atingido, em que a célula deverá parar sua divisão, entrando em estado de repouso (G0). Células em processo de carcinogênese podem expressar uma enzima chamada telomerase, que permite a manutenção dos telômeros e confere à célula capacidade proliferativa ilimitada. Estudos sugerem papel importante da ativação da telomerase no ACE, presente em até 100% dos casos. Essa enzima apresentou atividade crescente na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma no EB.(72;73)

### 6.2.7. Ploidia do DNA

Células são denominadas aneuplóides quando seu conteúdo de DNA não for diplóide ( $2n$ ) nem tetraplóide ( $4n$ ). A ploidia é aferida por citometria de fluxo de uma suspensão de células marcadas com corante fluorescente. Aneuploidias refletem grandes alterações do DNA. Mais de 90% dos casos de DAG e ACE apresentam aneuploidias segundo alguns estudos. Pacientes com EB sem displasia com aneuploidias parecem progredir mais para a seqüência displasia-adenocarcinoma. Os resultados da literatura, contudo, ainda são conflitantes e o método continua sendo objeto de pesquisa.(38;73-75)

### 6.2.8. A Proteína p53

A proteína p53 representa o produto de um gene supressor tumoral. Sua forma normal ou selvagem tem meia-vida curta e rapidamente desaparece do meio celular. Contudo, o resultado de sua mutação é uma proteína que se acumula na célula, podendo ser identificada por vários métodos, dentre os quais se destaca a técnica imuno-histoquímica.(40) Quando ocorre dano no DNA, a proteína p53 acumula-se, com a finalidade de bloquear o ciclo celular até que se suceda o reparo do DNA. Um dos mecanismos que permite essa atividade é a inibição das ciclinas D1 e E e, conseqüentemente, da fosforilação e inativação da proteína Rb.(76)

Um dos marcadores mais estudados na carcinogênese de Barrett até o momento, o p53 tem apresentado boa correlação com a evolução metaplasia-

displasia-adenocarcinoma.(77-83) O p53 tem apresentado especificidade para alterações displásicas, sendo negativo em casos de EB sem displasia na maioria dos estudos. Está presente em 20% dos casos indeterminados para displasia, em 10 a 55% na DBG e 50 a 80% na DAG. Sua positividade no câncer é freqüente, relatada de 55 a 95%.(77;78;82-85) Além disso, o p53 mostrou-se melhor preditor da evolução para câncer que a presença de displasia (78). A inativação do gene p53 também foi estudada, ocorrendo freqüentemente por meio da perda da heteroziguidade, estando presente em 50-90% dos casos de ACE (86;87).



## 7. Atividade Proliferativa e Ki-67

A atividade proliferativa pode ser estudada através da incorporação de timidina tritiada ao DNA celular, mensuração de antígenos nucleares, como o Ki-67 e o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), e da expressão da enzima ornitina decarboxilase. A timidina tritiada é uma técnica realizada *in vivo* e daí decorrem suas inúmeras limitações técnicas e éticas. PCNA expressa a progressão da transição G1/S e Ki-67 representa as células proliferativas (G1,S,G2,M). Ambos podem ser aferidos por análise imuno-histoquímica de material conservado em parafina. A expressão do PCNA pode ocorrer em situações de não-proliferação, como no reparo do DNA, determinando resultado em falso-positivo.(88-92)

A proteína Ki-67, localizada no núcleo celular, está intimamente associada com proliferação celular, e sua aferição, através do índice de expressão do Ki-67, por técnica imuno-histoquímica, tem se destacado em relação aos métodos anteriormente citados, por sua elevada acurácia e maior factibilidade técnica. Seu gene encontra-se no cromossomo 10 e consiste de 15 éxons e 30.000 pares de bases que transcreve duas formas predominantes, uma de 320 e outra de 359kDa. A estrutura protéica é caracterizada por 10 supostas seqüências nucleares, 143 sítios potenciais de fosforilação de proteína quinase C, 89 sítios para caseína quinase II, 2 sítios de tirosina quinase e 8 sítios para CDKs (88;93).

O ki-67 localiza-se predominantemente no nucléolo. Durante a dissociação nucleolar da mitose, concentra-se na periferia dos cromossomos (94). Até o momento, não é reconhecida sua função precisa no ambiente celular, porém existem especulações de que ela se ligue aos cromossomos na divisão celular e que

participe da dissolução nucleolar. A sua fosforilação e desfosforilação coincidem com o trânsito de células pela mitose e são reguladas pelo complexo ciclina B/cdc2 (93-95).

Algumas mutações do gene da proteína ki-67 já foram descritas em diferentes linhagens tumorais (96). Ela está presente em células que entram em G1, aumenta durante o ciclo celular e declina rapidamente após a mitose. Sua alta associação com células em proliferação permitiu estudos em tumores de diversos tecidos, na busca de indicadores prognósticos (88). O desenvolvimento de anticorpos que reconhecem o antígeno ki-67 em material fixado em formalina e conservado em parafina, como o MIB-1, facilitou grandemente o estudo do ki-67, cujo anticorpo inicial podia ser utilizado apenas em peças congeladas ou frescas (94).

Sua distribuição foi inicialmente estudada em tecidos normais. Tecidos que apresentam regeneração constante (intestino, pele, testículos) costumam apresentar maior marcação nos compartimentos proliferativos, ao passo que tecidos não proliferativos não apresentam marcação ou o fazem de forma escassa. O processo de reparo de DNA pela célula não parece associar-se com participação do Ki-67, o que lhe confere vantagem em relação ao PCNA.(97)

A atividade proliferativa foi determinada através da análise do Ki-67 em vários tumores do aparelho digestivo, bem como nas neoplasias de mama, melanomas e linfomas. O índice do Ki-67 (percentual de células marcadas/total de células avaliadas) tem sido utilizado para quantificar a atividade proliferativa de determinado tumor ou tecido. A contagem pode ser realizada pelo patologista ou de forma eletrônica. Porschen et al demonstraram a positividade do ki-67 em 165 carcinomas digestivos, através da contagem eletrônica, sendo as médias de 24% para os

tumores gástricos, 36% para os esofágicos (n=27), 37% para os colônicos e 34% para os retais. Todos os tumores esofágicos, contudo, eram carcinomas epidermóides.(97)

## 8. Ki-67 e a Seqüência Metaplasia-Displasia-Adenocarcinoma

Há poucos estudos sobre o ki-67 na carcinogênese do esôfago de Barrett. Sugere-se um aumento da atividade proliferativa na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma. Contudo, os resultados preliminares são conflitantes, tanto no que se refere à prevalência do ki-67 no ACE, quanto à sua correlação com a evolução metaplasia-displasia-adenocarcinoma.

Hong e cols (98) conduziram estudo imuno-histoquímico com MIB-1 em 43 pacientes com biópsias de estômago normal (n=17), EB sem displasia (n=17), EB com displasia de baixo grau (n=21), EB com displasia de alto grau (n=14) e adenocarcinoma (n=5). Foram estratificadas as diversas regiões do epitélio colunar (superfície, cripta superficial, cripta profunda e glândulas profundas). Houve diferença significativa entre as displasias de baixo e de alto grau, no que se referiu ao local de marcação pelo ki-67, com aumento do compartimento superficial marcado na última, em detrimento do predomínio profundo, na primeira. Também houve diferença significativa no índice do ki-67 entre os casos sem displasia e os com displasia de baixo grau. O escore médio para os casos de adenocarcinoma foi de 38%.(98)

Outro estudo avaliando a correlação da expressão do Ki-67 na seqüência displasia-adenocarcinoma foi conduzido em 44 peças de esofagectomias, dos quais 39 eram por ACE e 5, por EB com displasia de alto grau. Os autores encontraram diferença significativa entre os grupos, com incremento progressivo na positividade do Ki-67 de 14% na DBG, para 73% na DAG e 87% no ACE. (99).

Feith et al, em estudo com 24 pacientes com adenocarcinoma do esôfago

distal ressecado, avaliaram a prevalência do Ki-67, p53 e E-caderina nas respectivas peças cirúrgicas, em áreas de adenocarcinoma, esôfago de Barrett e esôfago normal. Apenas pacientes com a seqüência completa metaplasia-displasia-adenocarcinoma na mesma peça foram avaliados. A prevalência do Ki-67 diferiu significativamente entre os grupos, com aumento progressivo na seguinte seqüência: epitélio escamoso (20%), Barrett sem displasia (34%), Barrett com displasia (44%) e adenocarcinoma (60%). Não houve associação da atividade do Ki-67 com o estadiamento tumoral. Também não houve correlação entre o ki-67, p53 e a expressão de E-caderina.(85)

Polkowski et al analisaram a atividade proliferativa pelo índice do Ki-67 em 25 peças de esofagectomia, em diversas áreas histológicas. Houve pequena diferença entre os diferentes estágios de displasia, com 45% no EB sem displasia, 46% no EB com DBG e 55% na DAG. Apesar dos resultados, houve correlação linear significativa entre a atividade proliferativa e a progressão histológica. Também houve aumento do compartimento proliferativo em direção à superfície da cripta na progressão para DAG. Não foi avaliada a positividade no câncer e não foi utilizado grupo controle.(84)

Lauwers et al analisaram a atividade do Ki-67 em 20 peças de esofagectomia, apresentando índices de 10% no epitélio gástrico normal, 20% no EB com DBG e 50% no EB com DAG. Houve progressão superficial do compartimento proliferativo na DAG. Não foi relatada a atividade proliferativa no câncer.(100)

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada previamente em alguns estudos para aferição do ki-67. Os resultados não mostraram diferenças na contagem total do Ki-67 quando da estratificação de pacientes com EB sem displasia, displasia de

baixo grau, displasia de alto grau e adenocarcinoma (101;102). Além disso, a técnica de citometria de fluxo requer amostras de tecido fresco, compromete a arquitetura tecidual, necessita equipamento dispendioso e é uma técnica de execução trabalhosa (74;75;103;104).

## 9. Análise do Autor

O ACE tem apresentado incidência crescente em nosso meio. Sua mortalidade é elevada, e a cura depende do diagnóstico em estágios iniciais (105). O Esôfago de Barrett caracteriza-se como lesão pré-maligna, podendo levar ao desenvolvimento do ACE. O seguimento atual é baseado na avaliação anatomopatológica convencional da presença de displasia e sua graduação. Essa avaliação prognostica, entretanto, possui inúmeras limitações, selecionando grupos heterogêneos de pacientes quanto ao risco de câncer, de forma que muitos pacientes são submetidos a endoscopias e a reavaliações desnecessárias e onerosas sem confirmação da evolução para ACE. Por outro lado, há pacientes que, mesmo em seguimento, evoluem para câncer, sendo diagnosticados tardiamente, já com metástases linfáticas e, conseqüentemente, com comprometimento dos resultados do tratamento.(34;106)

Torna-se necessária, portanto, a identificação de marcadores moleculares que possam prever com precisão o risco de evolução para câncer nos diferentes pacientes. A biologia molecular tem evoluído bastante no estudo da carcinogênese no EB, principalmente devido à progressão deste conhecimento na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma.

São inúmeros os mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese de Barrett. Há empenho progressivo no estudo e na descoberta das mais diversas rotas metabólicas, com o intuito de aperfeiçoar em última instância o manejo clínico desses pacientes. Os trabalhos analisando o Ki-67, marcador de nosso especial interesse, apesar de concordarem que há correlação entre a atividade proliferativa e

a progressão metaplasia-adenocarcinoma, demonstram que a expressão do Ki-67 nos diferentes estágios dessa evolução é bastante variável. Sua expressão no ACE é relatada de 38 a 60%, ao passo que no EB sem displasia, de 10 a 45%. Ademais, as diferenças absolutas são pequenas entre os grupos. Esses resultados podem ser atribuídos a amostras pequenas e pouco representativas, baseadas em peças de esofagectomia, na maioria das vezes, estudando-as em suas diferentes áreas histológicas, e não baseada em pacientes, cada um representando um único diagnóstico na constituição das amostras. Além disso, a técnica imuno-histoquímica pode sofrer pequenas modificações nos diversos serviços, como diferentes anticorpos e concentrações, variações nas etapas da apresentação antigênica e diferentes técnicas para contagem do Ki-67, explicando as diferenças nos resultados.

O objetivo dessa revisão da literatura foi apresentar as principais áreas de investigação na carcinogênese do EB, sem, no entanto, esgotá-las, devido à amplitude do tema. Estamos estudando estes aspectos de forma sistemática, em linha de pesquisa específica, já tendo sido avaliados marcadores como c-myc, CdX2, p53 e p16. Tais estudos já tiveram seus resultados encaminhados à publicação. A presente revisão da literatura embasa outro estudo, objeto de dissertação de mestrado, que avalia a expressão do antígeno Ki-67 na carcinogênese do esôfago de Barrett, cujos resultados serão também encaminhados para publicação em artigo original.



## Referências Bibliográficas

- (1) DeMeester SR, DeMeester TR. Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus: fifty years of controversy. *Ann Surg* 2000 Mar;231(3):303-21.
- (2) HAYWARD J. The lower end of the oesophagus. *Thorax* 1961 Mar;16:36-41.
- (3) Jenkins GJ, Doak SH, Parry JM, D'Souza FR, Griffiths AP, Baxter JN. Genetic pathways involved in the progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma. *Br J Surg* 2002 Jul;89(7):824-37.
- (4) Shaheen NJ. Advances in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 2005 May;128(6):1554-66.
- (5) Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR. Barrett's esophagus. *J Gastrointest Surg* 2004 Jan;8(1):1-17.
- (6) Cameron AJ, Carpenter HA. Barrett's esophagus, high-grade dysplasia, and early adenocarcinoma: a pathological study. *Am J Gastroenterol* 1997 Apr;92(4):586-91.
- (7) Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999 Mar 18;340(11):825-31.
- (8) Cameron AJ, Ott BJ, Payne WS. The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus. *N Engl J Med* 1985 Oct 3;313(14):857-9.
- (9) Oberg S, DeMeester TR, Peters JH, Hagen JA, Nigro JJ, DeMeester SR, et al. The extent of Barrett's esophagus depends on the status of the lower esophageal sphincter and the degree of esophageal acid exposure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999 Mar;117(3):572-80.
- (10) Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998 Nov 15;83(10):2049-53.
- (11) 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 May;80(5-6):834-42.
- (12) Watson A. Barrett's oesophagus--50 years on. *Br J Surg* 2000

May;87(5):529-31.

(13) de Barros SG, Vidal RM, Luz LP, Ghisolfi ES, Barlem GG, Komlos F, et al. [Prevalence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction in a 10 year period at a cancer referral center in southern Brazil]. *Arq Gastroenterol* 1999 Jan;36(1):32-6.

(14) Spechler SJ. The natural history of dysplasia and cancer in esophagitis and Barrett esophagus. *J Clin Gastroenterol* 2003 May;36(5 Suppl):S2-S5.

(15) Anderson LA, Murray LJ, Murphy SJ, Fitzpatrick DA, Johnston BT, Watson RG, et al. Mortality in Barrett's oesophagus: results from a population based study. *Gut* 2003 Aug;52(8):1081-4.

(16) Eckardt VF, Kanzler G, Bernhard G. Life expectancy and cancer risk in patients with Barrett's esophagus: a prospective controlled investigation. *Am J Med* 2001 Jul;111(1):33-7.

(17) van der BA, Dees J, Hop WC, van BM. Oesophageal cancer is an uncommon cause of death in patients with Barrett's oesophagus. *Gut* 1996 Jul;39(1):5-8.

(18) Macdonald CE, Wicks AC, Playford RJ. Final results from 10 year cohort of patients undergoing surveillance for Barrett's oesophagus: observational study. *BMJ* 2000 Nov 18;321(7271):1252-5.

(19) Van d, V, Dees J, Blankensteijn JD, van BM. Adenocarcinoma in Barrett's oesophagus: an overrated risk. *Gut* 1989 Jan;30(1):14-8.

(20) Murray L, Watson P, Johnston B, Sloan J, Mainie IM, Gavin A. Risk of adenocarcinoma in Barrett's oesophagus: population based study. *BMJ* 2003 Sep 6;327(7414):534-5.

(21) Chandrasoma P. Pathophysiology of Barrett's esophagus. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 1997 Jul;9(3):270-8.

(22) Oberg S, Peters JH, DeMeester TR, Chandrasoma P, Hagen JA, Ireland AP, et al. Inflammation and specialized intestinal metaplasia of cardiac mucosa is a manifestation of gastroesophageal reflux disease. *Ann Surg* 1997 Oct;226(4):522-30.

(23) 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 Aug;92(8):1293-7.

(24) DeMeester TR. Clinical biology of the Barrett's metaplasia, dysplasia to carcinoma sequence. *Surg Oncol* 2001 Nov;10(3):91-102.

- (25) Hameeteman W, Tytgat GN, Houthoff HJ, van den Tweel JG. Barrett's esophagus: development of dysplasia and adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1989 May;96(5 Pt 1):1249-56.
- (26) Reid BJ. Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 1991 Dec;20(4):817-34.
- (27) Reid BJ, Blount PL, Rubin CE, Levine DS, Haggitt RC, Rabinovitch PS. Flow-cytometric and histological progression to malignancy in Barrett's esophagus: prospective endoscopic surveillance of a cohort. *Gastroenterology* 1992 Apr;102(4 Pt 1):1212-9.
- (28) Skinner DB, Walther BC, Riddell RH, Schmidt H, Iacone C, DeMeester TR. Barrett's esophagus. Comparison of benign and malignant cases. *Ann Surg* 1983 Oct;198(4):554-65.
- (29) Flejou JF. Barrett's oesophagus: from metaplasia to dysplasia and cancer. *Gut* 2005 Mar;54 Suppl 1:i6-12.
- (30) Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Roth G, Surawicz CM, Van BG, et al. Observer variation in the diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus. *Hum Pathol* 1988 Feb;19(2):166-78.
- (31) Nobukawa B, Abraham SC, Gill J, Heitmiller RF, Wu TT. Clinicopathologic and molecular analysis of high-grade dysplasia and early adenocarcinoma in short- versus long-segment Barrett esophagus. *Hum Pathol* 2001 Apr;32(4):447-54.
- (32) 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 Jul;105(1):40-50.
- (33) Reid BJ, Weinstein WM, Lewin KJ, Haggitt RC, VanDeventer G, DenBesten L, et al. Endoscopic biopsy can detect high-grade dysplasia or early adenocarcinoma in Barrett's esophagus without grossly recognizable neoplastic lesions. *Gastroenterology* 1988 Jan;94(1):81-90.
- (34) Montgomery E, Goldblum JR, Greenson JK, Haber MM, Lamps LW, Lauwers GY, et al. Dysplasia as a predictive marker for invasive carcinoma in Barrett esophagus: a follow-up study based on 138 cases from a diagnostic variability study. *Hum Pathol* 2001 Apr;32(4):379-88.
- (35) Menke-Pluymers MB, Hop WC, Dees J, van BM, Tilanus HW. Risk factors for the development of an adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett) esophagus. The Rotterdam Esophageal Tumor Study Group. *Cancer* 1993 Aug 15;72(4):1155-8.

- (36) 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 Apr;154(4):965-73.
- (37) Morales CP, Souza RF, Spechler SJ. Hallmarks of cancer progression in Barrett's oesophagus. *Lancet* 2002 Nov 16;360(9345):1587-9.
- (38) Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001 Mar;233(3):322-37.
- (39) Sanders DAS, Tanriere P., Harrison R.F., Jankowski JAZ. Clinical and molecular pathology of the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in Barrett's oesophagus. *Curr Diag Pathol* 2003;9:235-41.
- (40) Souza RF, Morales CP, Spechler SJ. Review article: a conceptual approach to understanding the molecular mechanisms of cancer development in Barrett's oesophagus. *Aliment Pharmacol Ther* 2001 Aug;15(8):1087-100.
- (41) Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999 Apr;35(4):531-9.
- (42) Arber N, Gammon MD, Hibshoosh H, Britton JA, Zhang Y, Schonberg JB, et al. Overexpression of cyclin D1 occurs in both squamous carcinomas and adenocarcinomas of the esophagus and in adenocarcinomas of the stomach. *Hum Pathol* 1999 Sep;30(9):1087-92.
- (43) Arber N, Lightdale C, Rotterdam H, Han KH, Sgambato A, Yap E, et al. Increased expression of the cyclin D1 gene in Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996 Jun;5(6):457-9.
- (44) Sarbia M, Bektas N, Muller W, Heep H, Borchard F, Gabbert HE. Expression of cyclin E in dysplasia, carcinoma, and nonmalignant lesions of Barrett esophagus. *Cancer* 1999 Dec 15;86(12):2597-601.
- (45) Boynton RF, Huang Y, Blount PL, Reid BJ, Raskind WH, Haggitt RC, et al. Frequent loss of heterozygosity at the retinoblastoma locus in human esophageal cancers. *Cancer Res* 1991 Oct 15;51(20):5766-9.
- (46) Coppola D, Schreiber RH, Mora L, Dalton W, Karl RC. Significance of Fas and retinoblastoma protein expression during the progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 1999 Apr;6(3):298-304.
- (47) Jankowski J, McMenemin R, Hopwood D, Penston J, Wormsley KG. Abnormal expression of growth regulatory factors in Barrett's oesophagus. *Clin Sci (Lond)* 1991 Nov;81(5):663-8.

(48) Jankowski J, Hopwood D, Wormsley KG. Flow-cytometric analysis of growth-regulatory peptides and their receptors in Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *Scand J Gastroenterol* 1992;27(2):147-54.

(49) Jankowski J, Hopwood D, Pringle R, Wormsley KG. Increased expression of epidermal growth factor receptors in Barrett's esophagus associated with alkaline reflux: a putative model for carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1993 Mar;88(3):402-8.

(50) 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 Jan 3;60(1):27-32.

(51) Malumbres M, Pellicer A. RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 1998 Aug 6;3:d887-d912.

(52) Trautmann B, Wittekind C, Strobel D, Meixner H, Keymling J, Gossner L, et al. K-ras point mutations are rare events in premalignant forms of Barrett's oesophagus. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996 Aug;8(8):799-804.

(53) Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B. Going mad with Smads. *N Engl J Med* 1999 Oct 7;341(15):1144-6.

(54) Garrigue-Antar L, Souza RF, Vellucci VF, Meltzer SJ, Reiss M. Loss of transforming growth factor-beta type II receptor gene expression in primary human esophageal cancer. *Lab Invest* 1996 Aug;75(2):263-72.

(55) Klump B, Hsieh CJ, Holzmann K, Gregor M, Porschen R. Hypermethylation of the CDKN2/p16 promoter during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1998 Dec;115(6):1381-6.

(56) Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995 Jul;1(7):686-92.

(57) Wong DJ, Barrett MT, Stoger R, Emond MJ, Reid BJ. p16INK4a promoter is hypermethylated at a high frequency in esophageal adenocarcinomas. *Cancer Res* 1997 Jul 1;57(13):2619-22.

(58) Aberle H, Schwartz H, Kemler R. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* 1996 Jun 15;61(4):514-23.

- (59) Bracke ME, van Roy FM, Mareel MM. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;213 ( Pt 1):123-61.
- (60) 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 Jan;152(1):135-44.
- (61) Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 1996 May 17;272(5264):1023-6.
- (62) Seery JP, Syrigos KN, Karayiannakis AJ, Valizadeh A, Pignatelli M. Abnormal expression of the E-cadherin-catenin complex in dysplastic Barrett's oesophagus. *Acta Oncol* 1999;38(7):945-8.
- (63) 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 Sep;11(9):805-13.
- (64) Eads CA, Lord RV, Kurumboor SK, Wickramasinghe K, Skinner ML, Long TI, et al. Fields of aberrant CpG island hypermethylation in Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 2000 Sep 15;60(18):5021-6.
- (65) Kawakami K, Brabender J, Lord RV, Groshen S, Greenwald BD, Krasna MJ, et al. Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2000 Nov 15;92(22):1805-11.
- (66) Kannan K, Amariglio N, Rechavi G, Givol D. Profile of gene expression regulated by induced p53: connection to the TGF-beta family. *FEBS Lett* 2000 Mar 17;470(1):77-82.
- (67) Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995 Jan 27;80(2):293-9.
- (68) 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 Jul 15;58(14):2929-34.
- (69) Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schror K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1999 Jan 1;59(1):198-204.
- (70) Younes M, Schwartz MR, Ertan A, Finnie D, Younes A. Fas ligand

expression in esophageal carcinomas and their lymph node metastases. *Cancer* 2000 Feb 1;88(3):524-8.

(71) Younes M, Schwartz MR, Finnie D, Younes A. Overexpression of Fas ligand (FasL) during malignant transformation in the large bowel and in Barrett's metaplasia of the esophagus. *Hum Pathol* 1999 Nov;30(11):1309-13.

(72) Lord RV, Salonga D, Danenberg KD, Peters JH, DeMeester TR, Park JM, et al. Telomerase reverse transcriptase expression is increased early in the Barrett's metaplasia, dysplasia, adenocarcinoma sequence. *J Gastrointest Surg* 2000 Mar;4(2):135-42.

(73) Morales CP, Lee EL, Shay JW. In situ hybridization for the detection of telomerase RNA in the progression from Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Cancer* 1998 Aug 15;83(4):652-9.

(74) Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. Barrett's esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1987 Jul;93(1):1-11.

(75) Reid BJ, Levine DS, Longton G, Blount PL, Rabinovitch PS. Predictors of progression to cancer in Barrett's esophagus: baseline histology and flow cytometry identify low- and high-risk patient subsets. *Am J Gastroenterol* 2000 Jul;95(7):1669-76.

(76) Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 1998 Oct 1;12(19):2973-83.

(77) Younes M, Lebovitz RM, Lechago LV, Lechago J. p53 protein accumulation in Barrett's metaplasia, dysplasia, and carcinoma: a follow-up study. *Gastroenterology* 1993 Dec;105(6):1637-42.

(78) 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 Apr;42(4):697-701.

(79) Gimenez A, de Haro LM, Parrilla P, Bermejo J, Perez-Guillermo M, Ortiz MA. Immunohistochemical detection of p53 protein could improve the management of some patients with Barrett esophagus and mild histologic alterations. *Arch Pathol Lab Med* 1999 Dec;123(12):1260-3.

(80) 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 May;96(5):1355-62.

(81) Skacel M, Petras RE, Rybicki LA, Gramlich TL, Richter JE, Falk GW, et

al. p53 expression in low grade dysplasia in Barrett's esophagus: correlation with interobserver agreement and disease progression. *Am J Gastroenterol* 2002 Oct;97(10):2508-13.

(82) Flejou JF, Potet F, Muzeau F, Le Pelletier F, Fekete F, Henin D. Overexpression of p53 protein in Barrett's syndrome with malignant transformation. *J Clin Pathol* 1993 Apr;46(4):330-3.

(83) Flejou JF, Volant A, Diebold MD, Sagan C, Vissuzaine C, Croue A, et al. [Overexpression of protein p53 and Barrett esophagus. A frequent and early event in the course of carcinogenesis]. *Gastroenterol Clin Biol* 1995 May;19(5):475-81.

(84) Polkowski W, van Lanschot JJ, ten Kate FJ, Baak JP, Tytgat GN, Obertop H, et al. The value of p53 and Ki67 as markers for tumour progression in the Barrett's dysplasia-carcinoma sequence. *Surg Oncol* 1995 Jun;4(3):163-71.

(85) 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(4):322-7.

(86) Meltzer SJ, Yin J, Huang Y, McDaniel TK, Newkirk C, Iseri O, et al. Reduction to homozygosity involving p53 in esophageal cancers demonstrated by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Jun 1;88(11):4976-80.

(87) Blount PL, Ramel S, Raskind WH, Haggitt RC, Sanchez CA, Dean PJ, et al. 17p allelic deletions and p53 protein overexpression in Barrett's adenocarcinoma. *Cancer Res* 1991 Oct 15;51(20):5482-6.

(88) McCormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA. Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology* 1993 Apr;22(4):355-60.

(89) Garewal HS, Gerner EW, Sampliner RE, Roe D. Ornithine decarboxylase and polyamine levels in columnar upper gastrointestinal mucosae in patients with Barrett's esophagus. *Cancer Res* 1988 Jun 1;48(11):3288-91.

(90) Garewal HS, Sampliner R, Gerner E, Steinbronn K, Alberts D, Kendall D. Ornithine decarboxylase activity in Barrett's esophagus: a potential marker for dysplasia. *Gastroenterology* 1988 Mar;94(3):819-21.

(91) Gray MR, Hall PA, Nash J, Ansari B, Lane DP, Kingsnorth AN. Epithelial proliferation in Barrett's esophagus by proliferating cell nuclear antigen immunolocalization. *Gastroenterology* 1992 Dec;103(6):1769-76.



- (92) Gray MR, Wallace HM, Goulding H, Hoffman J, Kenyon WE, Kingsnorth AN. Mucosal polyamine metabolism in the columnar lined oesophagus. *Gut* 1993 May;34(5):584-7.
- (93) Endl E, Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 2000 Jun 15;257(2):231-7.
- (94) Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2002 Jan;40(1):2-11.
- (95) Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000 Mar;182(3):311-22.
- (96) Buban T, Schmidt M, Broll R, Antal-Szalmas P, Duchrow M. Detection of mutations in the cDNA of the proliferation marker Ki-67 protein in four tumor cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 2004 Feb;149(1):81-4.
- (97) Porschen R, Kriegel A, Langen C, Classen S, Hilse M, Lohe B, et al. Assessment of proliferative activity in carcinomas of the human alimentary tract by Ki-67 immunostaining. *Int J Cancer* 1991 Mar 12;47(5):686-91.
- (98) 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 Jan 15;75(2):423-9.
- (99) Rioux-Leclercq N, Turlin B, Sutherland F, Heresbach N, Launois B, Campion JP, et al. Analysis of Ki-67, p53 and Bcl-2 expression in the dysplasia-carcinoma sequence of Barrett's esophagus. *Oncol Rep* 1999 Jul;6(4):877-82.
- (100) 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 Dec;10(12):1201-8.
- (101) Iftikhar SY, Steele RJ, Watson S, James PD, Dilks K, Hardcastle JD. Assessment of proliferation of squamous, Barrett's and gastric mucosa in patients with columnar lined Barrett's oesophagus. *Gut* 1992 Jun;33(6):733-7.
- (102) Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS. Barrett's esophagus: cell cycle abnormalities in advancing stages of neoplastic progression. *Gastroenterology* 1993 Jul;105(1):119-29.

(103) Reid MM. Flow cytometry and Kleihauer tests. *J Clin Pathol* 1996 Apr;49(4):354.

(104) 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 Apr;131(1):53-61.

(105) Holscher AH, Bollschweiler E, Schneider PM, Siewert JR. Early adenocarcinoma in Barrett's oesophagus. *Br J Surg* 1997 Oct;84(10):1470-3.

(106) Edwards MJ, Gable DR, Lentsch AB, Richardson JD. The rationale for esophagectomy as the optimal therapy for Barrett's esophagus with high-grade dysplasia. *Ann Surg* 1996 May;223(5):585-9.

## Justificativa

Pacientes com esôfago de Barrett apresentam risco elevado de desenvolverem adenocarcinoma de esôfago. O ACE tem apresentado incidência crescente no mundo ocidental, com mortalidade elevada e cuja cura depende do diagnóstico em estágios iniciais.

O seguimento adequado dos pacientes com EB possibilitaria o diagnóstico precoce do ACE, com melhora na sua sobrevida. O seguimento atual, baseado na avaliação da displasia, possui inúmeras limitações, visto ter selecionado grupos heterogêneos de pacientes. Conseqüentemente, muitos pacientes são submetidos a endoscopias e reavaliações muitas vezes desnecessárias e onerosas. Por outro lado, há pacientes que são diagnosticados com câncer tardiamente.

Torna-se necessária, portanto, a identificação de marcadores moleculares que possam prever com maior precisão o risco de evolução para câncer, nos diferentes pacientes, determinando o seguimento necessário. A biologia molecular tem evoluído bastante na carcinogênese do EB, principalmente através do estudo da seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma.

O ki-67 é um antígeno nuclear intimamente associado à proliferação celular e tornou-se um dos principais marcadores de atividade proliferativa. Amplamente pesquisado em vários outros tumores, seu papel no ACE ainda tem resultados inconclusivos. Sua expressão, aferida por análise imuno-histoquímica, tem sugerido correlação com a carcinogênese de Barrett. A partir desses dados, julgamos que a avaliação do marcador, na seqüência metaplasia-adenocarcinoma, pode contribuir para o melhor entendimento dessa doença.

## **Objetivos**

1. Determinar a atividade do antígeno Ki-67 na mucosa esofágica de pacientes com EB e ACE
2. Avaliar a correlação da expressão do antígeno Ki-67 com a progressão metaplasia-adenocarcinoma no EB

## RESUMO

### ASSOCIAÇÃO DO ANTÍGENO KI-67 COM A SEQÜÊNCIA BARRETT-ADENOCARCINOMA DE ESÔFAGO

**Objetivos:** Avaliar a expressão do antígeno Ki-67 em pacientes com esôfago de Barrett e adenocarcinoma do esôfago e analisar sua correlação com a progressão metaplasia-adenocarcinoma de esôfago.

**Métodos:** Foi realizada a avaliação do índice do Ki-67, através de técnica imuno-histoquímica, em pacientes com esôfago de Barrett, adenocarcinoma do esôfago distal e controles, atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, entre 2002 e 2005. Foram incluídos pacientes com mucosa colunar visível à endoscopia digestiva alta, cuja biópsia tivesse revelado metaplasia do tipo intestinal, pacientes com tumores da junção esôfago-gástrica do tipo I e II e pacientes com sintomas dispépticos e mucosa gástrica histologicamente normal (grupo controle).

**Resultados:** Foram estudados 57 pacientes. Não houve diferença significativa entre os grupos, em relação à idade e à raça. Houve predomínio do sexo masculino nos pacientes com câncer. O índice do Ki-67 médio em pacientes com biópsia gástrica normal foi de  $10\pm 4\%$  (n=17), no esôfago de Barrett foi de  $21\pm 15\%$  (n=21) e no adenocarcinoma, de  $38\pm 16\%$  (n=19). Houve diferença significativa entre todos os grupos em relação à expressão do Ki-67 ( $P < 0,05$ ). Houve correlação significativa forte entre a atividade do ki-67 e a seqüência metaplasia-adenocarcinoma ( $P < 0,01$ ). Nos pacientes com adenocarcinoma, não houve diferença significativa na expressão do Ki-67, de acordo com o estadiamento clínico ou cirúrgico.

**Conclusões:** O ki-67 apresenta atividade crescente na seqüência controles-metaplasia-adenocarcinoma. Há correlação linear forte entre sua expressão e a progressão metaplasia-adenocarcinoma no EB.

**Palavras-chave:** Esôfago de Barrett, Adenocarcinoma, Neoplasias esofágicas, Antígeno Ki-67, Marcadores biológicos de Tumor, Metaplasia

**Associação do antígeno Ki-67 com a seqüência Barrett-adenocarcinoma de esôfago**

***Ki-67 Antigen overexpression is associated with metaplasia-adenocarcinoma sequence in Barrett's esophagus***

*(pré-artigo para ser enviado à Revista Diseases of The Esophagus)*

**Autores:**

**Bernardo Silveira Volkweis**

**Richard Ricachenevsky Gurski**

**Luíse Meurer**

**Maria Isabel Edelweiss**

**Marcelo Kruehl Schmidt**

**Gustavo Morellato**

***Local de Realização:***

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

*Rua Ramiro Barcelos, 2350 - CEP 90035-003. Bairro Rio Branco - Porto Alegre - RS*

*– Brasil. Fone: (51) 2101.8000.*

***Endereço para Correspondências:***

*Bernardo Silveira Volkweis*

*Rua Luiz Afonso n°307/Apto 1201 CEP 90050-310*

*Porto Alegre - RS – Brasil. Fone: (51) 32097100*

*Email: bvolkweis@terra.com.br*

## 1. Introdução

Descrito há cerca de 50 anos por Norman Barrett, o esôfago de Barrett (EB) é atualmente definido pela presença de mucosa colunar em esôfago distal, visível na endoscopia digestiva alta (EDA), de qualquer extensão, e que, à biópsia, demonstre metaplasia intestinal, caracterizada pela presença de células caliciformes (1). Constitui doença freqüente, acometendo cerca de 10% dos pacientes com doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) (2). Representa o estágio avançado desta doença e constitui fator de risco importante ao desenvolvimento do adenocarcinoma de esôfago (ACE) (3-5). O risco de evolução para câncer em pacientes com EB é relatado de 0,2 a 2,9% ao ano, cerca de 30 a 125 vezes o da população em geral (6;7).

O adenocarcinoma de esôfago tem apresentado incidência crescente no mundo ocidental, superando o carcinoma epidermóide e tornando-se o tipo mais comum das neoplasias de esôfago em algumas populações (8-10). Apesar de existirem poucas publicações sobre a epidemiologia do adenocarcinoma de esôfago no Brasil, de Barros et al demonstraram que os adenocarcinomas representaram 15% dos tumores do esôfago e junção esôfago-gástrica (53/349), no período de 1987-1996 (11). Szachnowicz et al descreveram prevalência de ACE de 5,7% em pacientes com EB (12). Trata-se de uma doença de elevada mortalidade e sua cura depende do diagnóstico precoce (13).

Pacientes com EB, portanto, merecem um seguimento racional que permita a identificação precoce de eventual transformação maligna. A avaliação prognóstica

atual é baseada na presença e graduação da displasia, sendo os pacientes encaminhados para seguimento endoscópico com biópsias seriadas. Tal seguimento possui várias limitações, fundamentalmente por constituir grupos heterogêneos. Pacientes com displasia de alto grau (DAG) podem apresentar ACE oculto em até 40% dos casos, e 40% dos doentes poderão progredir para câncer a longo prazo (2;14). A evolução natural dos casos de displasia de baixo grau (DBG) é incerta, devido a vários fatores: variabilidade diagnóstica intra e inter-observador, problemas de amostragem e maiores taxas de regressão para epitélio não-neoplásico (15-18). A evolução para DAG e câncer atinge 28% e 15%, respectivamente (19). Dessa forma, muitos pacientes são submetidos a endoscopias e reavaliações desnecessárias e onerosas. Por outro lado, há pacientes sendo diagnosticados tardiamente, já com metástases linfáticas e, conseqüentemente, com comprometimento dos resultados do tratamento (20;21).

Assim, diversos marcadores moleculares têm sido pesquisados, com o objetivo de indicar o prognóstico de forma mais precisa (19). A carcinogênese do ACE através do EB caracteriza-se por uma série de eventos genéticos e epigenéticos, que se manifestam fenotipicamente através de uma seqüência: metaplasia-displasia-adenocarcinoma (6;22;22-28). Entre outros mecanismos, ocorre atividade proliferativa descontrolada, independente de controles estimulatórios e inibitórios (29-32).

A atividade proliferativa tem recebido grande atenção nesse contexto, podendo ser estudada através de várias técnicas: incorporação de timidina tritiada ao DNA celular, mensuração de antígenos nucleares, como o Ki-67 e o antígeno nuclear da proliferação celular (PCNA), e da expressão da enzima ornitina



decarboxilase. A proteína Ki-67 tem se tornado o marcador de eleição para avaliação da proliferação celular, com elevada acurácia e maior factibilidade técnica que os métodos anteriormente citados. De função ainda incerta, o Ki-67, localizado no núcleo celular, está presente em células nas fases G1, S, G2 e M e ausente na fase G0 (33;34).

Um número cada vez maior de estudos tem sugerido um aumento da atividade proliferativa quando avaliada pelo Ki-67 na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma no EB (35-38). Entretanto, a prevalência da expressão do Ki-67 nos adenocarcinomas de esôfago é variável e seu desempenho como marcador da evolução metaplasia-adenocarcinoma necessita estudos com resultados mais conclusivos. O objetivo do nosso estudo é avaliar a atividade proliferativa pelo Ki-67 em pacientes com esôfago de Barrett e adenocarcinoma de esôfago e analisar sua correlação com a progressão metaplasia-adenocarcinoma.

## **2. Materiais e Métodos**

### *2.1. Pacientes*

A população constituiu-se de pacientes entre 16 e 90 anos de idade atendidos pelo Grupo de Cirurgia de Esôfago, Estômago e Intestino Delgado (GCEEID) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no período de agosto de 2002 a agosto de 2005, que apresentaram o diagnóstico de esôfago de Barrett ou

adenocarcinoma de esôfago.

A seleção inicial dos pacientes foi através da revisão dos laudos de exames anatomopatológicos de biópsias ou peças cirúrgicas dos arquivos do Serviço de Patologia do HCPA. Foram incluídos pacientes com diagnóstico de metaplasia intestinal em mucosa colunar esofágica, adenocarcinoma de esôfago ou da junção esôfago-gástrica ou cárdia e biópsias gástricas normais. Os dados clínicos foram coletados por revisão dos prontuários.

Os Critérios de Inclusão foram: 1) pacientes com sintomas dispépticos e biópsia gástrica normal; 2) pacientes com diagnóstico endoscópico de mucosa colunar e biópsia demonstrando metaplasia do tipo intestinal e 3) pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de esôfago e da junção esôfago-gástrica Siewert I e II (39). Foram critérios de exclusão: 1) pacientes com metaplasia intestinal à biópsia esofágica, porém sem a visualização endoscópica de mucosa colunar - Metaplasia Intestinal do Cárdia (MIC); 2) blocos de parafina com material insuficiente; 3) tratamento oncológico prévio; 4) adenocarcinomas da junção esôfago-gástrica subcárdicos, correspondentes à classificação de Siewert tipo III e 5) cirurgia anti-refluxo anterior à biópsia esofágica, nos pacientes com Esôfago de Barrett.

Após revisão dos dados clínicos e dos laudos anatomopatológicos, os pacientes foram divididos em 3 grupos: grupo 1 (controles), grupo 2 (esôfago de Barrett) e grupo 3 (adenocarcinoma do esôfago).

Os tamanhos amostrais calculados foram: grupo 1 (n=12), grupo 2 (n=12), grupo 3 (n=10) e total (n=34). Para variável de distribuição não-paramétrica, o tamanho amostral seria aproximadamente 10% maior, com n total de 38 pacientes.

## **2.2. Critérios diagnósticos de esôfago de Barrett e adenocarcinoma**

O estudo anatomopatológico convencional foi realizado separadamente por dois patologistas do Serviço de Patologia do HCPA.

A Metaplasia intestinal foi definida pela presença de epitélio colunar com células caliciformes. A displasia foi definida pela presença de alterações nucleares (aumento nuclear, atipias e nucléolo proeminente), citológicas (depleção de mucina e basofilia citoplasmática) e arquiteturais (irregularidade das glândulas). Foi classificada em 2 grupos: displasia de baixo grau (DBG) e displasia de alto grau (DAG), conforme descrições prévias.(15;40-42)

O diagnóstico de adenocarcinoma foi obtido ao se identificar a presença de glândulas atípicas além da membrana basal, invadindo a lâmina própria e a camada submucosa. Os pacientes com ACE foram estadiados de acordo com os critérios da União Internacional contra o Câncer (UICC – 2004).

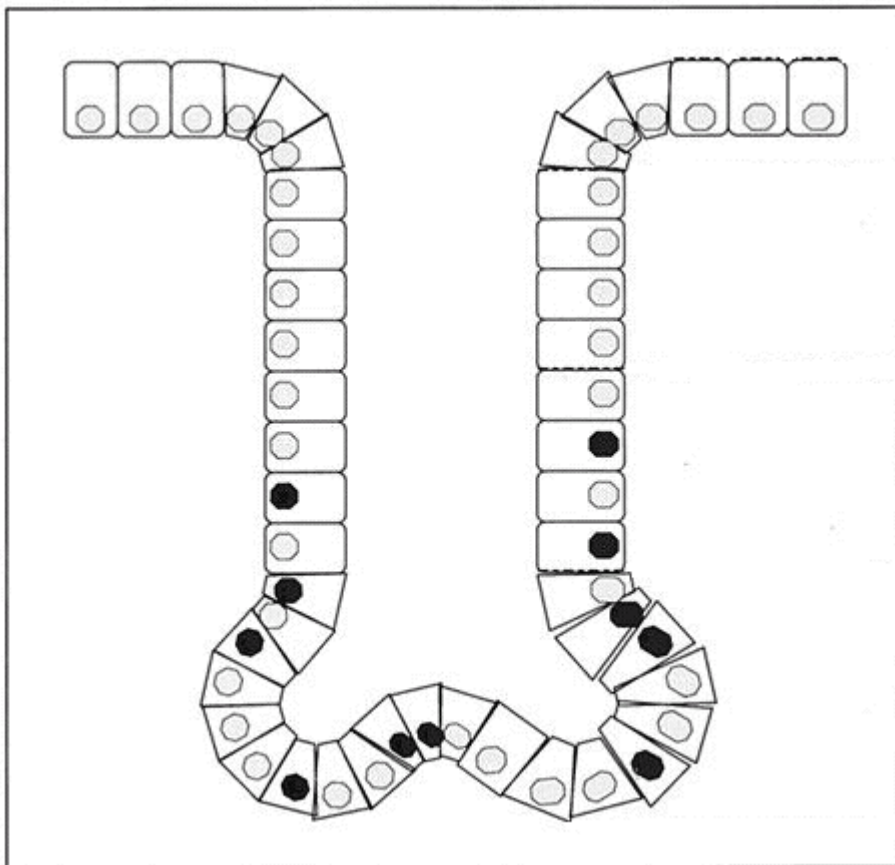
## **2.3. Análise Imuno-histoquímica**

A análise imuno-histoquímica foi realizada pelo Centro de Pesquisas do HCPA. Foram confeccionadas lâminas com material proveniente de blocos de parafina. A técnica foi realizada conforme rotina do Serviço de Patologia do HCPA, com utilização do sistema avidina-biotina, segundo descrições anteriores (34-37). As lâminas foram desparafinadas com xilol, hidratadas com álcool 100%, lavadas em água corrente e destilada. Após, eram banhadas em tampão salina-fosfato (PBS) e aquecidas em microondas com tampão citrato, para recuperação antigênica. As

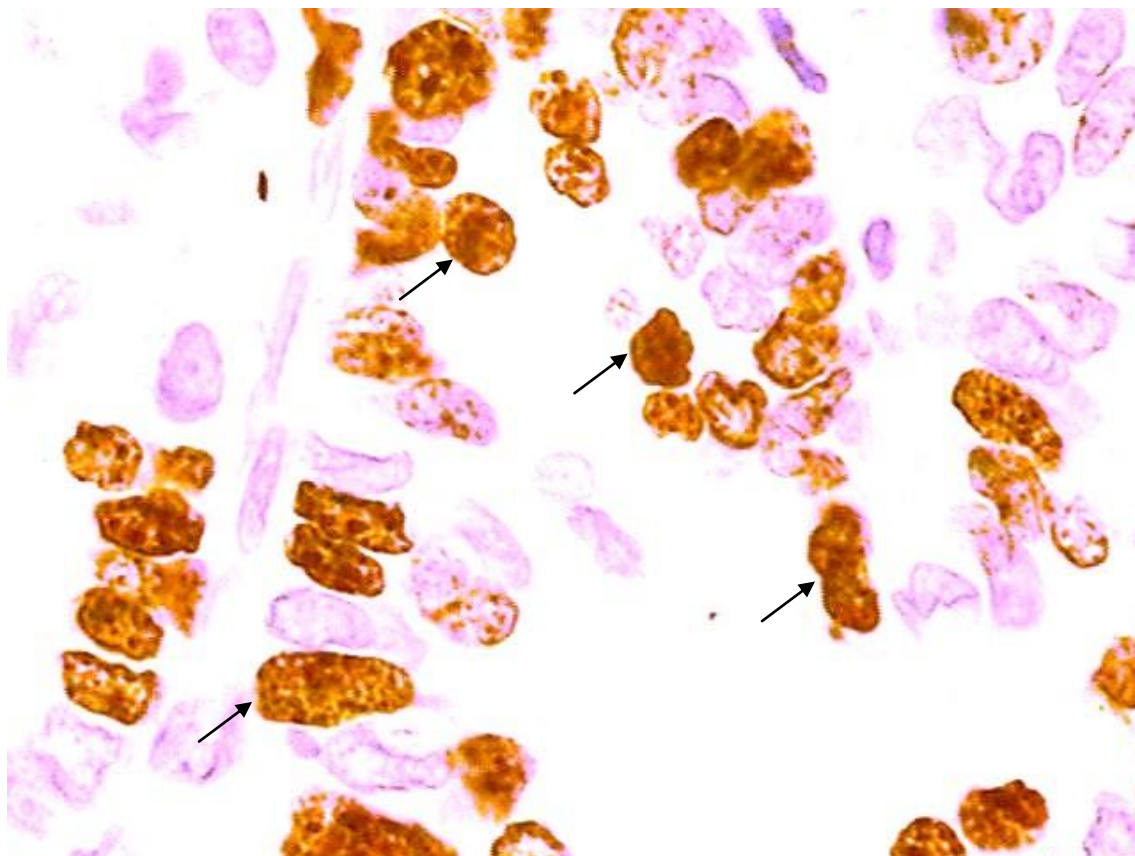
lâminas eram novamente passadas no PBS, banhadas no peróxido de hidrogênio a 5% (preparado com água destilada), para inativação da peroxidase endógena, sendo novamente lavadas e banhadas no PBS. O anticorpo monoclonal MIB-5 (DakoCytomation, Código M7248, Lote 8618, Edição 27/01/04, Dinamarca), que reconhece o antígeno Ki-67, em diluição de 1:50, foi então aplicado. As lâminas ficaram em *overnight* à temperatura de 4° Celsius. Após terem sido lavadas e banhadas no PBS, foi aplicado o complexo streptavidina-biotina (LSAB). A revelação da reação foi feita com diaminobenzidina (DAB), seguida da contra-coloração com hematoxilina de Harris e montagem.

O índice de expressão do Ki-67 foi aferido para cada paciente. Este índice consiste na proporção de células com núcleos marcados (de coloração marrom) sobre o total de células contadas em uma cripta esofágica ou gástrica (figura 1), ou na área tumoral (figura 2), com contagem de no mínimo 500 células, conforme descrito previamente (36). Foi escolhida para cada paciente a área de maior contagem (*hot spot*).

O índice de expressão do ki-67 foi aferido separadamente por duas patologistas com experiência na área, as quais foram cegadas das informações clínicas. Foi considerado como resultado definitivo a média dos dois escores de cada paciente, obtendo-se um único escore final.



**Figura 1.** Índice de Expressão do Ki-67. Esquema de uma cripta esofágica. Índice de Expressão do Ki-67 =  $(\bullet / (\bullet + \circ)) \times 100\%$ . (Adaptado de Chen LQ, Hu CY, Gaboury L, Pera M, Ferraro P, Duranceau AC. Proliferative activity in Barrett's esophagus before and after antireflux surgery. Ann Surg 2001; 234(2):172-180.)



**Figura 2.** Exemplo da marcação Imuno-histoquímica para o Ki-67 em paciente com adenocarcinoma de esôfago, em aumento de 400X (setas indicam núcleos marcados pelo Ki-67)

#### **2.4. Análise Estatística**

O índice de expressão do ki-67 apresentou distribuição paramétrica. Seus dados foram apresentados em médias e desvios-padrão. Variáveis contínuas foram comparadas entre as categorias através da análise das variâncias (ANOVA). A localização das diferenças, quando presente, foi realizada com o teste de Tukey. A

correlação linear entre variáveis foi analisada com o teste de correlação de Pearson. A comparação entre variáveis categóricas foi realizada com teste do Qui-quadrado. Foi utilizado o programa estatístico *Statistical Package for Social Science* (SPSS) versão 12.0, considerando-se significativo  $p < 0,05$ .

### 2.5. Considerações éticas

Este trabalho teve seu projeto previamente avaliado e aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA, seguindo todas as normas éticas preconizadas. O material utilizado foi proveniente do acervo de blocos de parafina do Serviço de Patologia do HCPA. Não houve participação direta dos pacientes no estudo, bem como não houve modificação no protocolo de tratamento em decorrência da pesquisa. Os dados clínicos, coletados por revisão de prontuários, foram utilizados de forma sigilosa e anônima, garantido com o Termo de Compromisso para Utilização de Dados.

### 3. Resultados

Inicialmente foram selecionados 80 pacientes, após revisão de laudos anatomopatológicos e prontuários, dos quais 23 foram excluídos: 6 casos de metaplasia intestinal do cárdia (ausência de mucosa colunar endoscópica), 5 casos de adenocarcinoma da JEG subcárdico (Siewert III), e 12 casos por material insuficiente, devido a cinco estudos anteriores com utilização do mesmo material. Foram, então, estudados 57 pacientes, dos quais 19 eram portadores de adenocarcinoma de esôfago ou JEG, 21 portadores de esôfago de Barrett e 17 controles. Os dados demográficos dos pacientes estão apresentados na tabela 1. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação à idade e raça. Houve predomínio de homens no grupo 3, ao contrário do que ocorreu nos demais grupos.

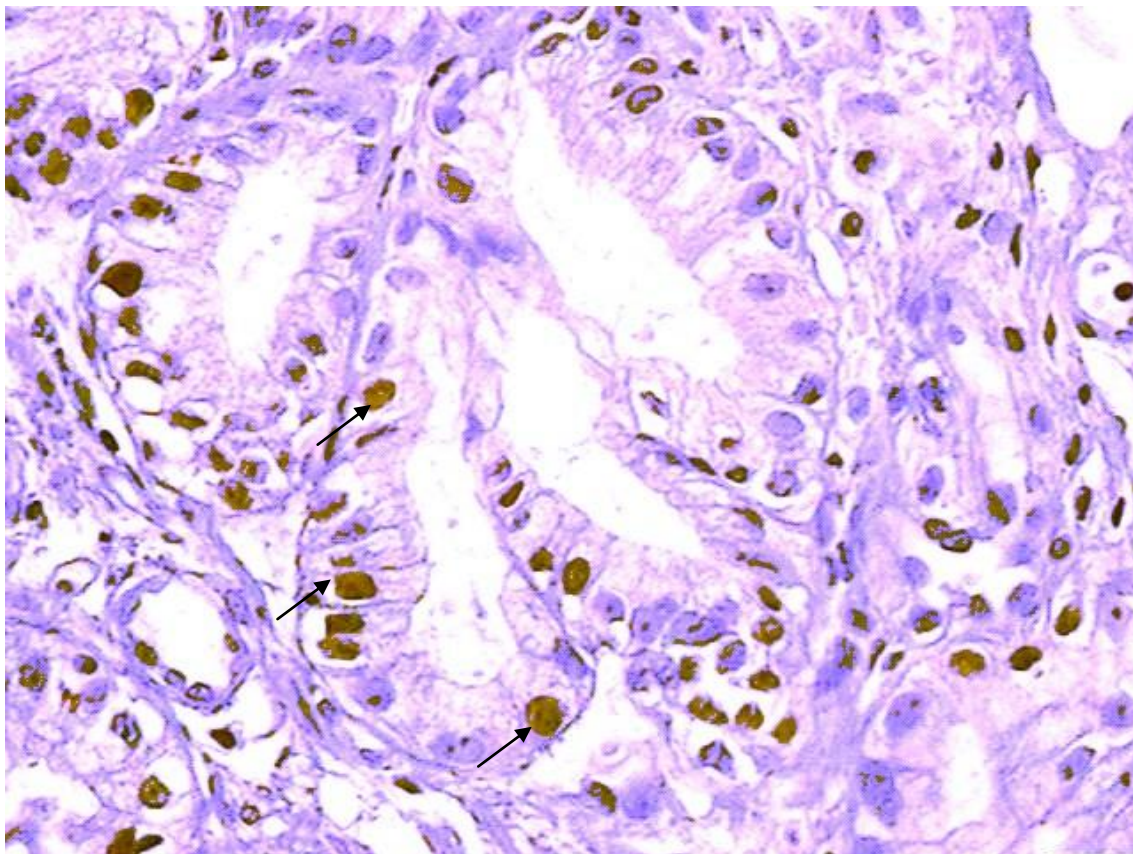
**Tabela 1.** Características demográficas dos pacientes

	<b>Grupo 1 (Controle) n=17</b>	<b>Grupo 2 (Barrett) n=21</b>	<b>Grupo 3 (Câncer) n=19</b>	<b>Total n=57</b>	<b>Valor P</b>
<b>Idade (média±DP)</b>	55,7±12,1	52,52±20,28	62,89±13,54	56,26±16,48	<i>P=0,082</i>
<b>Sexo (%)</b>					<i>P=0,048*</i>
<b>Masculino</b>	8 (47)	9 (42,9)	15 (78,9)	32 (56,1)	
<b>Feminino</b>	9 (52,9)	12 (57,1)	4 (21,1)	25 (43,9)	
<b>Raça</b>					<i>P=0,20</i>
<b>Caucasiana</b>	16 (94,1)	18 (85,7)	19 (100)	53 (93)	
<b>Negra/Mista</b>	1 (5,9)	3 (14,3)	0 (0)	5 (7)	

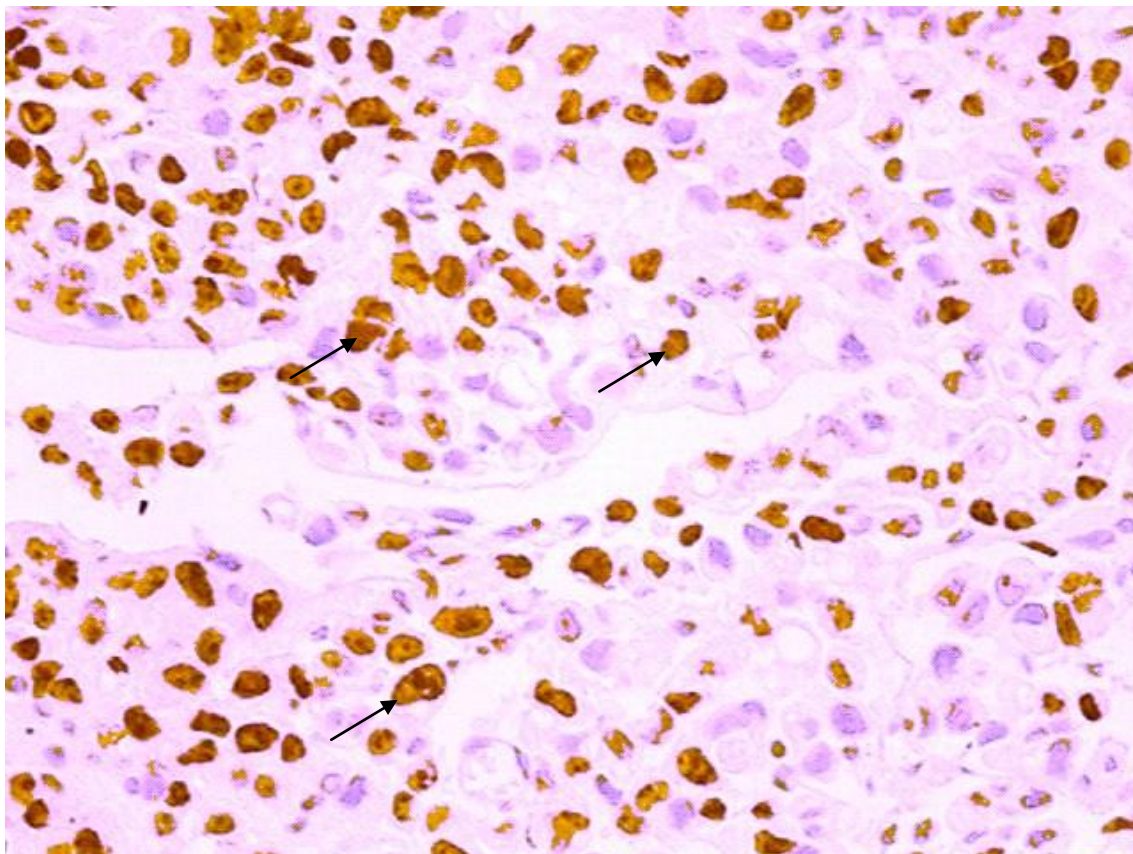
\* Predomínio do sexo masculino nos pacientes com câncer



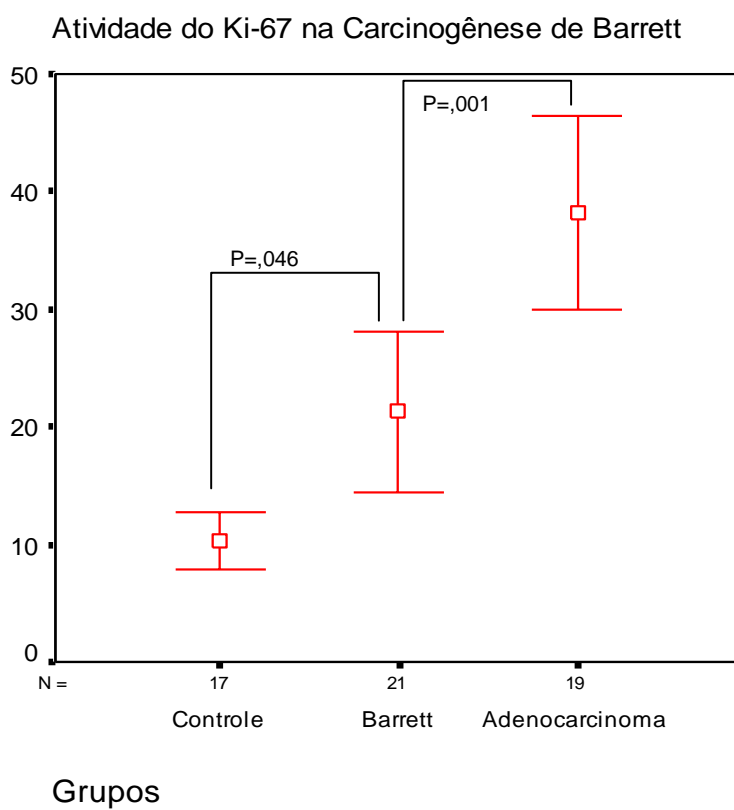
A média geral do índice do ki-67 foi de  $23,62 \pm 17,6\%$ . As médias foram de  $10,29 \pm 4,6\%$  nos controles, de  $21,26 \pm 15,1\%$  nos pacientes com EB e de  $38 \pm 16\%$  nos pacientes com ACE (figuras 3 e 4). O ki-67 apresentou distribuição crescente nos grupos, de 1 a 3. Houve diferença significativa no índice do ki-67 entre todos os 3 grupos estudados (figura 5). Identificou-se correlação linear forte ( $r = 0,6$ ) entre o aumento do Ki-67 e a seqüência controles-metaplasia-adenocarcinoma ( $P < 0,01$ ) (figura 6). Não ocorreu variação significativa inter-observador na aferição do índice de expressão do Ki-67.



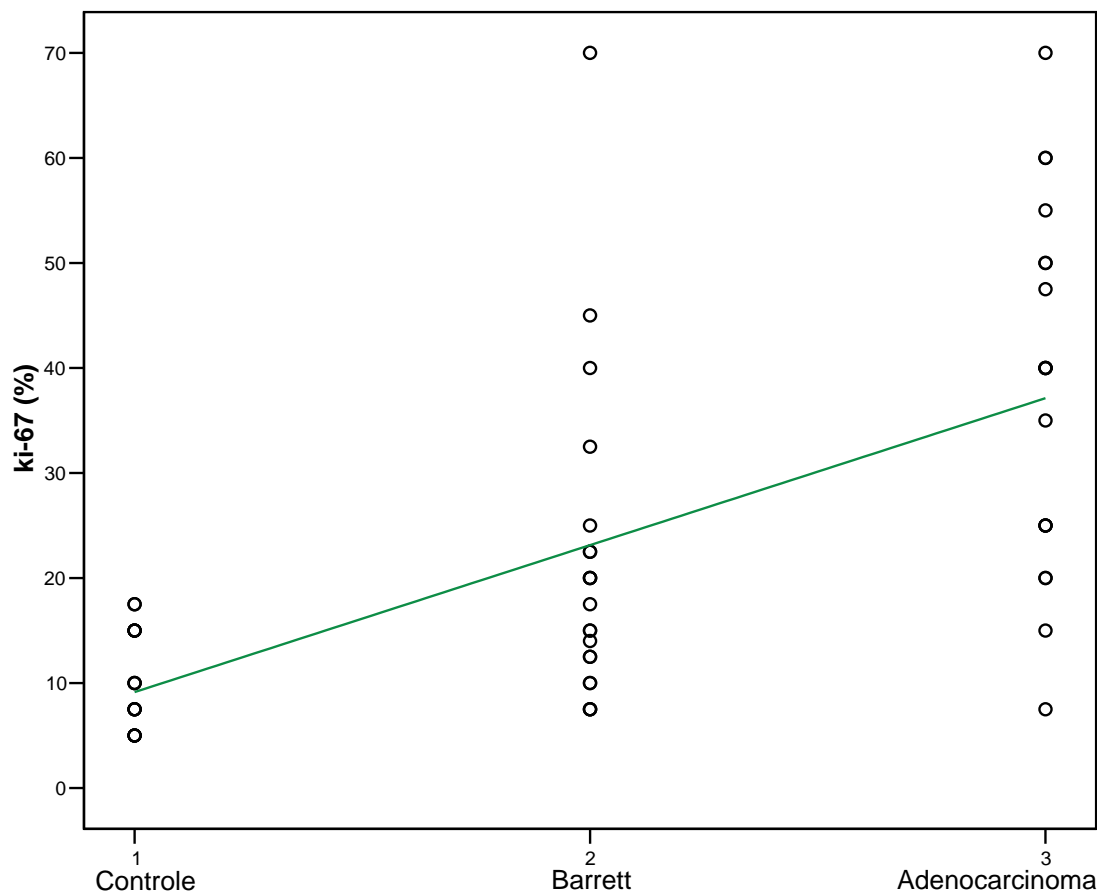
**Figura 3. A.** Exemplo da marcação imunohistoquímica para o Ki-67 com índice de expressão de 22% em um paciente com EB, em aumento de 200X (setas indicam núcleos marcados).



**Figura 4.** Exemplo da marcação imunohistoquímica para o Ki-67 com índice de expressão de 60% em um paciente com ACE, em aumento de 200X (setas indicam núcleos marcados)



**Figura 5.** Variação do índice de expressão do Ki-67 nos diferentes grupos, mostrando progressão crescente na seqüência Barrett-Adenocarcinoma.



**Figura 6** . Correlação entre o Ki-67 e progressão Barrett-Adenocarcinoma.

Coefficiente de Pearson=0,6 ( $p<0,01$ ).

A extensão do epitélio colunar nos pacientes com EB foi de  $5,29 \pm 3,39$ . Pacientes com extensão  $<3$  cm representaram 23,8% dos pacientes com EB, ao passo que os pacientes com Barrett longo corresponderam a 76,2%. Não houve correlação entre o comprimento do epitélio colunar e o índice de expressão do ki-67 ou o tamanho da hérnia hiatal. Apenas 3 (15%) dos pacientes apresentaram EB com displasia de baixo grau, cuja média do índice do Ki-67 foi de  $17,5 \pm 13,2\%$ . Devido ao pequeno número de pacientes com displasia, não foi feita análise separadamente em relação à atividade proliferativa ou outras variáveis. Noventa por cento dos pacientes com EB apresentaram hérnia hiatal, sendo o tamanho médio da hérnia hiatal de  $2,95 \pm 1,9$ cm. Não houve correlação entre o tamanho da hérnia hiatal e a atividade proliferativa.

Os pacientes com ACE foram estratificados de acordo com o estadiamento. Apenas 5,9% apresentaram-se no estágio 1. Os estágios 2, 3 e 4 corresponderam, cada um, a 31,6% dos casos. Não houve diferença significativa no índice do Ki-67 entre os diferentes estágios. Onze pacientes foram submetidos à ressecção do tumor, com intenção curativa em 5 e com intenção paliativa em 6. Em oito pacientes, a cirurgia foi contra-indicada por doença avançada ( $n=6$ ) ou por risco cirúrgico proibitivo ( $n=2$ ). Na maioria dos casos, o tumor era moderadamente diferenciado (70%). Também não houve diferença da atividade proliferativa em relação ao grau de diferenciação tumoral. Mais de 80% dos pacientes ressecados apresentaram tumor com invasão da *muscularis própria* ou além desta. Metástases para linfonodos

regionais estiveram presentes em mais de 50% dos pacientes operados. Não houve diferença na atividade do Ki-67 em relação à penetração tumoral (T) ou à presença de metástases linfáticas (N).

## 4. Discussão

Inúmeros fatores relacionados ao ciclo celular, oncogenes e genes de supressão tumoral têm sido estudados no esôfago de Barrett, com o objetivo de identificar marcadores prognósticos, partindo do conceito de que a carcinogênese esofágica é um processo multifatorial e que segue a seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma. A atividade proliferativa aumentada tem sido implicada na fisiopatogenia de vários tumores (43-45). Atualmente, o Ki-67 é um dos marcadores de atividade proliferativa mais estudados. Positividade aumentada do ki-67 foi demonstrada em 165 carcinomas digestivos: gástricos, esofágicos, colônicos e retais (46).

### 4.1. Métodos

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada inicialmente, em alguns estudos, para aferição do ki-67. Os resultados com esse método muitas vezes não mostraram diferenças significativas na contagem do Ki-67, quando da comparação de pacientes com EB sem displasia, displasia de baixo grau, displasia de alto grau, adenocarcinoma e controles (47;48). Esse fato se deve provavelmente à distorção da arquitetura tecidual própria do método, o que lhe confere menor sensibilidade para detectar diferenças na atividade proliferativa. Outras desvantagens consistem na necessidade de amostras de tecido fresco, uso de equipamento sofisticado e execução trabalhosa (49-52).



O índice do Ki-67 (percentual de células marcadas/total de células avaliadas) tem sido utilizado para quantificar a atividade proliferativa de determinado tumor ou tecido, através de técnica imuno-histoquímica, em material conservado em parafina. Este tornou-se o método preferencial de aferição do antígeno Ki-67, considerando sua elevada acurácia e factibilidade. Sua aferição por técnica eletrônica tem sido também empregada, porém não dispomos dessa técnica em nosso meio. A contagem convencional, contudo, é amplamente realizada e utilizada.(33;34;40;45;53) No presente estudo, a aferição foi realizada separadamente por duas patologistas experientes na técnica, as quais foram cegadas das informações clínicas e de laudos histopatológicos prévios, a fim de evitar vieses de aferição.

Hong et al utilizaram o epitélio gástrico como controle, em estudo da análise do Ki-67 no EB (35). No presente estudo, também optamos pela utilização do mesmo tipo de controle, pois a arquitetura histológica e a celularidade do revestimento gástrico assemelham-se mais ao esôfago de Barrett, com a presença de glândulas e criptas mucosas, as quais representam a zona proliferativa preferencial de ambos os epitélios. O tecido escamoso esofágico apresenta arquitetura diferente, desprovido de glândulas, com epitélio estratificado e com atividade proliferativa restrita à sua camada basal, o que lhe confere características desfavoráveis para ser utilizado como controle. Estudo de Iftikhar et al demonstrou que o epitélio gástrico teve maior correlação com o epitélio de Barrett, em relação ao comportamento proliferativo, do que o epitélio escamoso esofágico (47).

A estratificação das criptas, de acordo com sua profundidade, foi realizada em estudos recentes. Houve diferença significativa na distribuição do Ki-67, principalmente entre a displasia de baixo grau e a de alto grau. A atividade proliferativa deslocou-se para o compartimento superficial da cripta, no EB com DAG, em detrimento do predomínio do compartimento proliferativo profundo, no EB com DBG.(35;38) Em nosso estudo, não foi realizada tal estratificação, para aferição do ki-67, pois consideramos que essa classificação tem caráter muito subjetivo, do ponto de vista prático, visto que os cortes histológicos freqüentemente dividem as criptas nas mais diversas direções e profundidades. Essas raramente são seccionadas longitudinalmente, na sua integridade, permitindo a determinação real da zona profunda, intermediária e superficial. Nos pacientes com EB, realizamos a contagem do Ki-67 nas criptas inteiras, em campos de grande aumento (400X), nas áreas de maior marcação (*hot spot*), contando-se no mínimo 500 células. Além disso, tal estratificação mostrou-se importante particularmente na diferenciação entre a DBG e a DAG. Como nossa amostra de pacientes com EB e displasia foi pequena e não analisada estatisticamente como um grupo, essa metodologia tornou-se pouco útil no nosso estudo.

#### 4.2. Resultados

Polkowski et al analisaram a atividade proliferativa, pelo índice do Ki-67, em 25 peças de esofagectomia, em diversas áreas histológicas de EB. Na zona mais proliferativa (*hot spot*), o Ki-67 apresentou índice médio de 45% nas áreas sem

displasia, 45% nas indefinidas para displasia, 46% na DBG e 55% na DAG. Apesar das diferenças terem sido pequenas, houve correlação linear significativa entre a atividade proliferativa e a progressão histológica. Também houve aumento significativo do tamanho da zona proliferativa da cripta, de acordo com a mesma seqüência.(54) Alguns questionamentos desse estudo foram a utilização de peças de esofagectomia apenas e o fato de esse estudo não ter aferido a positividade do Ki-67 no câncer e em grupo controle.

Lauwers et al analisaram a expressão do Ki-67 em 20 peças de esofagectomia, apresentando índices de 10% no EB sem displasia, 20% no EB com DBG e 50% no EB com DAG. Não foi relatada a atividade proliferativa nas áreas de câncer.(38)

Hong et al avaliaram o índice do Ki-67 em 43 pacientes com EB, predominantemente. A expressão do Ki-67 foi de 13% no epitélio gástrico (controle), 33% no EB sem displasia, 40% no EB com DBG e 33% na DAG. Em apenas 5 casos de câncer, foi relatada expressão de 38%.(35) Esse estudo encontrou diferença significativa na atividade do Ki-67 entre os grupos, de acordo com a zona proliferativa da cripta, conforme discutido anteriormente.

Rioux-Leclercq et al conduziram estudo com o Ki-67 em 44 peças de esofagectomias, em diferentes áreas histológicas. Áreas com EB e DBG foram positivas para o Ki-67 em 14% dos casos, EB e DAG em 73% e ACE em 87% dos casos. Foi encontrado aumento significativo na prevalência do Ki-67 na seqüência displasia-adenocarcinoma.(37) Porém, áreas de esôfago de Barrett sem displasia e grupo controle não foram analisados. Além disso, esse estudo considerou os casos como positivos para o Ki-67, quando o índice foi maior ou igual a 10%. Tal critério

tem caráter arbitrário e não foi utilizado em outras publicações.

Em estudo recente, publicado por Feith et al, foram realizados cortes de diferentes áreas histológicas em 24 peças de adenocarcinoma do esôfago distal, para pesquisa do índice do Ki-67. Foi demonstrado aumento significativo da expressão do Ki-67 na seguinte seqüência: epitélio escamoso (20%), EB sem displasia (35%), EB com displasia (45%) e adenocarcinoma (60%).(36)

Outro estudo recente, conduzido por Szachnowicz et al, avaliou o Ki-67 em 13 peças de esofagectomia e demonstrou atividade proliferativa “moderada” ou “forte” em todos os casos de EB (n=9) e de ACE (n=12). Os autores não determinaram o índice do Ki-67, mas qualificaram este marcador em 4 graus (ausente, fraco, moderado, forte). (12) Esse critério, porém, não foi utilizado em outros estudos, prejudicando a realização de comparações. Também não foi realizada comparação estatística entre os grupos, em relação à positividade do Ki-67.

Bhargava et al (55) conduziram estudo prospectivo, com o objetivo de estabelecer o comportamento de diferentes marcadores em um protocolo rigoroso de biópsias esofágicas seriadas, em pacientes com EB. A avaliação do Ki-67 foi limitada aos 6 pacientes iniciais, com total de 200 biópsias, visto sua associação significativa com a displasia já nesse pequeno número de pacientes. O Ki-67 foi positivo em 8 de 10 (80%) biópsias com displasia e ausente em 179 de 181 (99%) biópsias sem displasia.(55) Contudo, o autor não descreve claramente o método de aferição do Ki-67, apresentando-o como variável qualitativa. Além disso, apesar do número elevado de biópsias, a amostra de pacientes é reduzida, com

representatividade limitada, visto que 30% (2/6) dos pacientes apresentavam displasia.

Tendo-se como referência os estudos anteriormente apresentados, que pesquisaram a atividade proliferativa com o Ki-67 na carcinogênese do esôfago de Barrett, pode-se perceber que os resultados são inconclusivos e heterogêneos, apesar de concordarem que há correlação do Ki-67 com a evolução dessa doença. Em nosso estudo, a expressão média do Ki-67 foi de 10% no epitélio gástrico normal, o que está de acordo com a literatura. Nos pacientes com EB e ACE, cuja positividade foi de 21% e 38% respectivamente, encontramos diferenças mais marcantes com os dados da literatura, que apresentam valores de até 45% no primeiro e de 60% no último. Essas diferenças podem ser em parte devidas a amostras pequenas e pouco representativas, de estudos baseados em diferentes áreas histológicas de peças de esofagectomias, nos quais um paciente contribuiu com vários cortes histológicos. Nosso estudo constituiu amostras baseadas em pacientes que representavam, cada um deles, um único diagnóstico. Variações na realização da técnica imuno-histoquímica podem também explicar diferenças nos resultados, como diferenças no tipo de anticorpos, na apresentação antigênica e na aferição do marcador.

Nosso estudo demonstrou uma correlação significativa entre o aumento da atividade proliferativa aferida pelo Ki-67 e a evolução Barrett-adenocarcinoma. Houve diferença no índice do ki-67 entre o grupo de pacientes com esôfago de Barrett e o de pacientes com câncer. Os resultados são concordantes com a literatura e corroboram o caráter progressivo da doença através da prevalência crescente do marcador.

Nos pacientes com ACE, não encontramos associação entre a expressão do ki-67 e o estadiamento clínico, penetração tumoral e comprometimento linfonodal. Esses resultados sugerem papel limitado do ki-67 como indicador prognóstico nessa neoplasia, porém deve-se considerar a possibilidade de tamanho amostral insuficiente, para realizar essas comparações no subgrupo de pacientes com neoplasia. Outros autores também não encontraram diferenças significativas na expressão do Ki-67 de acordo com estadiamento tumoral (36).

Mais de uma dezena de trabalhos publicados nos últimos 10 anos demonstram que o controle adequado do refluxo gastroesofágico pode associar-se com regressão histológica do epitélio de Barrett. A cirurgia anti-refluxo revelou-se fator preditivo importante para a regressão histológica, que ocorreu em 36% dos pacientes operados (18). A identificação do subgrupo de pacientes com mais chance de regressão é campo profícuo para pesquisas futuras, em que os marcadores moleculares poderão trazer grande contribuição, permitindo a orientação terapêutica precisa para cada paciente.

Apesar de ter sido encontrada diferença significativa na expressão do Ki-67 entre todos os 3 grupos principais, a amplitude dessas diferenças foi pequena, sugerindo papel limitado do Ki-67 como um marcador preciso da carcinogênese no EB. Resultados mais conclusivos desse marcador, do ponto de vista prognóstico, na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma, só poderão ser obtidos com o acompanhamento de pacientes sob risco, avaliando prospectivamente esse

marcador de acordo com a evolução da doença. Deve haver maior padronização na metodologia dos estudos futuros, possibilitando melhores comparações dos resultados entre si, com conclusões mais seguras.

## 5. Conclusões

A atividade do ki-67 foi de 10% nos pacientes com mucosa gástrica normal (controles), 21% nos pacientes com EB e 38% nos pacientes com ACE. Houve diferença significativa entre todos os grupos, com distribuição crescente do Ki-67 na seqüência controles-Barrett-adenocarcinoma.

Houve correlação linear entre a expressão do antígeno Ki-67 e a progressão metaplasia-adenocarcinoma no EB, demonstrando uma freqüência crescente da positividade à medida que a doença progride.



## Referências Bibliográficas

- (1) Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR. Barrett's esophagus. *J Gastrointest Surg* 2004; 8(1):1-17.
- (2) Jenkins GJ, Doak SH, Parry JM, D'Souza FR, Griffiths AP, Baxter JN. Genetic pathways involved in the progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma. *Br J Surg* 2002; 89(7):824-837.
- (3) Cameron AJ, Carpenter HA. Barrett's esophagus, high-grade dysplasia, and early adenocarcinoma: a pathological study. *Am J Gastroenterol* 1997; 92(4):586-591.
- (4) Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340(11):825-831.
- (5) Cameron AJ, Ott BJ, Payne WS. The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus. *N Engl J Med* 1985; 313(14):857-859.
- (6) DeMeester SR, DeMeester TR. Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus: fifty years of controversy. *Ann Surg* 2000; 231(3):303-321.
- (7) Spechler SJ. The natural history of dysplasia and cancer in esophagitis and Barrett esophagus. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36(5 Suppl):S2-S5.
- (8) Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998; 83(10):2049-2053.
- (9) Dolan K, Sutton R, Walker SJ, Morris AI, Campbell F, Williams EM. New classification of oesophageal and gastric carcinomas derived from changing patterns in epidemiology. *Br J Cancer* 1999; 80(5-6):834-842.
- (10) Watson A. Barrett's oesophagus--50 years on. *Br J Surg* 2000; 87(5):529-531.
- (11) de Barros SG, Vidal RM, Luz LP, Ghisolfi ES, Barlem GG, Komlos F et al. [Prevalence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction in a 10 year period at a cancer referral center in southern Brazil]. *Arq Gastroenterol* 1999; 36(1):32-36.

- (12) Szachnowicz S, Ceconello I, Iriya K, Marson AG, Takeda FR, Gama-Rodrigues JJ. Origin of adenocarcinoma in Barrett's esophagus: p53 and Ki67 expression and histopathologic background. *Clinics* 2005; 60(2):103-112.
- (13) Holscher AH, Bollschweiler E, Schneider PM, Siewert JR. Early adenocarcinoma in Barrett's oesophagus. *Br J Surg* 1997; 84(10):1470-1473.
- (14) Nobukawa B, Abraham SC, Gill J, Heitmiller RF, Wu TT. Clinicopathologic and molecular analysis of high-grade dysplasia and early adenocarcinoma in short- versus long-segment Barrett esophagus. *Hum Pathol* 2001; 32(4):447-454.
- (15) Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Roth G, Surawicz CM, Van BG et al. Observer variation in the diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus. *Hum Pathol* 1988; 19(2):166-178.
- (16) Levine DS, Haggitt RC, Blount PL, Rabinovitch PS, Rusch VW, Reid BJ. An endoscopic biopsy protocol can differentiate high-grade dysplasia from early adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1993; 105(1):40-50.
- (17) Reid BJ, Weinstein WM, Lewin KJ, Haggitt RC, VanDeventer G, DenBesten L et al. Endoscopic biopsy can detect high-grade dysplasia or early adenocarcinoma in Barrett's esophagus without grossly recognizable neoplastic lesions. *Gastroenterology* 1988; 94(1):81-90.
- (18) Gurski RR, Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR, Bremner CG, Chandrasoma PT et al. Barrett's esophagus can and does regress after antireflux surgery: a study of prevalence and predictive features. *J Am Coll Surg* 2003; 196(5):706-712.
- (19) Flejou JF. Barrett's oesophagus: from metaplasia to dysplasia and cancer. *Gut* 2005; 54 Suppl 1:i6-12.
- (20) Montgomery E, Goldblum JR, Greenson JK, Haber MM, Lamps LW, Lauwers GY et al. Dysplasia as a predictive marker for invasive carcinoma in Barrett esophagus: a follow-up study based on 138 cases from a diagnostic variability study. *Hum Pathol* 2001; 32(4):379-388.
- (21) Edwards MJ, Gable DR, Lentsch AB, Richardson JD. The rationale for esophagectomy as the optimal therapy for Barrett's esophagus with high-grade dysplasia. *Ann Surg* 1996; 223(5):585-589.
- (22) Hameeteman W, Tytgat GN, Houthoff HJ, van den Tweel JG. Barrett's esophagus: development of dysplasia and adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1989; 96(5 Pt 1):1249-1256.
- (23) Reid BJ. Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma.

Gastroenterol Clin North Am 1991; 20(4):817-834.

(24) Reid BJ, Blount PL, Rubin CE, Levine DS, Haggitt RC, Rabinovitch PS. Flow-cytometric and histological progression to malignancy in Barrett's esophagus: prospective endoscopic surveillance of a cohort. *Gastroenterology* 1992; 102(4 Pt 1):1212-1219.

(25) Skinner DB, Walther BC, Riddell RH, Schmidt H, Iacone C, DeMeester TR. Barrett's esophagus. Comparison of benign and malignant cases. *Ann Surg* 1983; 198(4):554-565.

(26) Chandrasoma P. Pathophysiology of Barrett's esophagus. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 9(3):270-278.

(27) DeMeester TR. Clinical biology of the Barrett's metaplasia, dysplasia to carcinoma sequence. *Surg Oncol* 2001; 10(3):91-102.

(28) Oberg S, Peters JH, DeMeester TR, Chandrasoma P, Hagen JA, Ireland AP et al. Inflammation and specialized intestinal metaplasia of cardiac mucosa is a manifestation of gastroesophageal reflux disease. *Ann Surg* 1997; 226(4):522-530.

(29) Morales CP, Souza RF, Spechler SJ. Hallmarks of cancer progression in Barrett's oesophagus. *Lancet* 2002; 360(9345):1587-1589.

(30) Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, Triadafilopoulos G, Geboes K, Casson AG et al. Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Pathol* 1999; 154(4):965-973.

(31) Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001; 233(3):322-337.

(32) Sanders DAS, Taniere P., Harrison R.F., Jankowski JAZ. Clinical and molecular pathology of the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in Barrett's oesophagus. *Curr Diag Pathol* 2003; 9:235-241.

(33) Endl E, Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 2000; 257(2):231-237.

(34) McCormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA. Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology* 1993; 22(4):355-360.

(35) 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(2):423-429.

(36) 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(4):322-327.

(37) Rioux-Leclercq N, Turlin B, Sutherland F, Heresbach N, Launois B, Campion JP et al. Analysis of Ki-67, p53 and Bcl-2 expression in the dysplasia-carcinoma sequence of Barrett's esophagus. *Oncol Rep* 1999; 6(4):877-882.

(38) 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(12):1201-1208.

(39) Stein HJ, Feith M, Siewert JR. Cancer of the esophagogastric junction. *Surg Oncol* 2000; 9(1):35-41.

(40) Montgomery E, Bronner MP, Goldblum JR, Greenson JK, Haber MM, Hart J et al. Reproducibility of the diagnosis of dysplasia in Barrett esophagus: a reaffirmation. *Hum Pathol* 2001; 32(4):368-378.

(41) Faller G, Borchard F, Ell C, Seitz G, Stolte M, Walch A et al. Histopathological diagnosis of Barrett's mucosa and associated neoplasias: results of a consensus conference of the Working Group for Gastroenterological Pathology of the German Society for Pathology on 22 September 2001 in Erlangen. *Virchows Arch* 2003; 443(5):597-601.

(42) Offerhaus GJ, Correa P, van Eeden S, Geboes K, Drilenburg P, Vieth M et al. Report of an Amsterdam working group on Barrett esophagus. *Virchows Arch* 2003; 443(5):602-608.

(43) Gerdes J, Pickartz H, Brotherton J, Hammerstein J, Weitzel H, Stein H. Growth fractions and estrogen receptors in human breast cancers as determined in situ with monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1987; 129(3):486-492.

(44) Mulder AH, Van Hootegem JC, Sylvester R, ten Kate FJ, Kurth KH, Ooms EC et al. Prognostic factors in bladder carcinoma: histologic parameters and expression of a cell cycle-related nuclear antigen (Ki-67). *J Pathol* 1992; 166(1):37-43.

(45) Ramires M, David L, Leitao D, Seixas M, Sansonetty F, Sobrinho-Simoes M. Ki67 labelling index in gastric carcinomas. An immunohistochemical study using double staining for the evaluation of the proliferative activity of diffuse-type carcinomas. *J Pathol* 1997; 182(1):62-67.

(46) Porschen R, Kriegel A, Langen C, Classen S, Hilse M, Lohe B et al. Assessment of proliferative activity in carcinomas of the human alimentary tract by Ki-67 immunostaining. *Int J Cancer* 1991; 47(5):686-691.

- (47) Iftikhar SY, Steele RJ, Watson S, James PD, Dilks K, Hardcastle JD. Assessment of proliferation of squamous, Barrett's and gastric mucosa in patients with columnar lined Barrett's oesophagus. *Gut* 1992; 33(6):733-737.
- (48) Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS. Barrett's esophagus: cell cycle abnormalities in advancing stages of neoplastic progression. *Gastroenterology* 1993; 105(1):119-129.
- (49) Reid BJ, Levine DS, Longton G, Blount PL, Rabinovitch PS. Predictors of progression to cancer in Barrett's esophagus: baseline histology and flow cytometry identify low- and high-risk patient subsets. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(7):1669-1676.
- (50) Reid MM. Flow cytometry and Kleihauer tests. *J Clin Pathol* 1996; 49(4):354.
- (51) 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(1):53-61.
- (52) Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. Barrett's esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1987; 93(1):1-11.
- (53) Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182(3):311-322.
- (54) Polkowski W, van Lanschot JJ, ten Kate FJ, Baak JP, Tytgat GN, Obertop H et al. The value of p53 and Ki67 as markers for tumour progression in the Barrett's dysplasia-carcinoma sequence. *Surg Oncol* 1995; 4(3):163-171.
- (55) Bhargava P, Eisen GM, Holterman DA, Azumi N, Hartmann DP, Hanfelt JJ et al. Endoscopic mapping and surrogate markers for better surveillance in Barrett esophagus. A study of 700 biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 2000; 114(4):552-563.

## Abstract

**KI-67 ANTIGEN OVEREXPRESSION IS ASSOCIATED WITH METAPLASIA-ADENOCARCINOMA SEQUENCE IN BARRETT'S ESOPHAGUS**

**Objectives:** To evaluate the Ki-67 antigen expression in patients with Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma and to analyse its correlation with the metaplasia-esophageal adenocarcinoma progression.

**Methods:** Through imunohistochemical analysis we evaluated Ki-67 index in patients with Barrett's esophagus, esophageal adenocarcinoma and controls, assisted at Hospital de Clínicas de Porto Alegre between 2002 and 2005. We included patients with endoscopically visible columnar mucosa of the distal esophagus, whose biopsy proved specialized intestinal type metaplasia, patients with esophageal and esophagogastric tumors type I and II and patients with histologically normal gastric mucosa (control).

**Results:** We studied 57 patients. There was no statistically significant differences between the groups regarding age or race. Patients with cancer were predominantly men. Ki-67 index averaged  $10\pm 4\%$  in patients with normal gastric mucosa (n=17),  $21\pm 15\%$  in patients with Barrett's esophagus (n=21) and  $38\pm 16\%$  in patients with cancer (n=19). Ki-67 expression was significantly different between all groups ( $P<0,05$ ). There was strong linear correlation between Ki-67 expression and metaplasia-adenocarcinoma sequence ( $P<0,01$ ). In patients with cancer, Ki-67 was not associated with clinical or surgical staging.

**Conclusions:** Ki-67 antigen has increased expression along the metaplasia-adenocarcinoma sequence. There is strong linear correlation between Ki-67 proliferative activity and Barrett's carcinogenesis.

**Keywords:** Barrett's esophagus, Adenocarcinoma, Esophageal neoplasms, Ki-67 Antigen, Biological tumour markers, Metaplasia

**Ki-67 Antigen overexpression is associated with metaplasia-adenocarcinoma sequence in Barrett's esophagus**

***Short Title: Ki-67 and Barrett's Carcinogenesis***

*(pré-artigo em Inglês para ser enviado à Revista Diseases of The Esophagus)*

**Authors:**

**Bernardo Silveira Volkweis**

**Richard Ricachenevsky Gurski**

**Luise Meurer**

**Maria Isabel Edelweiss**

**Marcelo Kruehl Schmidt**

**Gustavo Morellato**

**Institution:**

Department of Surgery, Department of Pathology, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

***Correspondences to:***

*Bernardo Silveira Volkweis*

*Dr. Luiz Afonso Street Nº 307/1201*

*Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. CEP 90050310. Fone: (51) 32097100*

*Email: bvolkweis@terra.com.br*

## 1. Introduction

Described 50 years ago by Norman Barrett, Barrett's esophagus (BE) is currently defined as endoscopically visible colunar mucosa at the distal esophagus, of any extension, proved to harbor intestinal metaplasia on biopsy, highlighted by the presence of goblet cells (1). It constitutes a frequent disease, occurring in 10% of the patients with gastroesophageal reflux disease (GERD) (2). Barrett's esophagus occurs as a complication of long-standing gastroesophageal reflux and is an important risk factor for the development of esophageal adenocarcinoma (EAC) (3-5). The cancer risk in patients with BE is 0,2-2.9% per year, about 30 to 125 times of the general population (6;7).

The esophageal adenocarcinoma incidence is rising at western world, exceeding scamous cell carcinoma and becoming the most common type of esophageal cancer in some populations (8-10). There are few epidemiological publications on EAC in Brazil. A local study demonstrated that adenocarcinomas represented 15% (53/349) of esophageal and esophagogastric tumors, between 1987 and 1996 (11). Szachnowicz et al described a 5,7% EAC prevalence in BE patients (12). Esophageal adenocarcinoma is a highly lethal disease and its cure relies upon an early diagnosis (13).

Therefore, patients with BE deserve a rational follow-up, allowing identification of malignant transformation precociously. The current prognostic evaluation is based on the presence of dysplasia, the patients being enrolled in serial endoscopic evaluations. This classification has limitations, making heterogeneous groups.



Patients with BE and high grade dysplasia (HGD) have occult ACE in up to 40% of the cases (2;14). The natural evolution of patients with low grade dysplasia (LGD) is uncertain, partly due to intra and Inter-observer diagnostic variability, sampling errors variable regression rates for non-dysplastic epithelium.(15-18) The evolution rates for HGD and cancer reaches 28% and 15% respectively (19).

Many patients then undergo excessive evaluations. On the other hand, some will have their cancer diagnosed lately, already with lymphatic spread and, consequently, with poor treatment results.(20;21) Thus, molecular biology has searched many markers, so that they indicate prognostic precisely (19). Barrett's carcinogenesis underlies a series of genetic and epigenetic events, revealed fenotipically through a sequence: metaplasia-displasia-adenocarcinoma.(6;22;22-28). Among others mechanisms, uncontrolled proliferative activity, independent of stimulatory and inhibitory control, occur.(29-32)

The proliferative activity has received great attention in this context and has been studied through several techniques: tritiated thymidine incorporation into DNA, nuclear antigens detection, such as the Ki-67 and the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and expression of ornithine decarboxylase. The Ki-67 protein became the marker of choice for proliferative activity, considering its higher accuracy and factibility than methods previously cited. With an still unknown function, it is expressed inside the cellular nucleus in G1, S, G2, and M phases, but not in G0 cells (33;34).

Numerous studies have suggested elevated Ki-67 proliferative activity in the metaplasia-displasia-adenocarcinoma sequence in BE (35-38). However, there is a variable ki-67 expression in EAC and inconclusive results along the metaplasia-

dysplasia-adenocarcinoma sequence in Barrett's esophagus. The objective of our study is to evaluate the Ki-67 proliferative activity in patients with BE and EAC and to test its correlation along the metaplasia-adenocarcinoma evolution.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Patients**

The study population consisted of patients between the ages of 16 and 90 who were assisted by the Group of Surgery of the Esophagus, Stomach and Small Intestine of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GCEEID/HCPA), between August 2002 and December 2005, with the diagnosis of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma.

We first reviewed anatomopathological records from the HCPA Pathology Service. We included patients with intestinal metaplasia of columnar-lined distal esophagus, esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas and dyspeptic patients with normal gastric mucosa on biopsy. The clinical data was collected from medical records.

The inclusion criteria were: 1) patients with dyspeptic symptoms and normal gastric mucosa on biopsy; 2) patients with esophageal columnar mucosa on endoscopy and intestinal type metaplasia with goblet cells on biopsy; 3) patients with diagnosis of esophageal adenocarcinoma and esophagogastric junction tumor Types I and II (39). Exclusion criteria were: 1) patients with intestinal metaplasia on biopsy without endoscopically visible columnar mucosa - cardiac intestinal metaplasia

(CIM); 2) cases with insufficient material; 3) previous oncological treatment; 4) esophagogastric junction tumor type III and 5) BE patients with previous anti-reflux surgery.

After taking all the clinical and histopathological data, the patients had been divided into 3 groups: group 1 (controls), group 2 ((Barrett's esophagus) and group 3 (cancer).

We had the following calculated sample sizes: group 1 (n=12), group 2 (n=12), group 3 (n=10) and total (n=34). For nonparametric distribution, sample size 10% greater would be necessary, requiring approximately 38 patients.

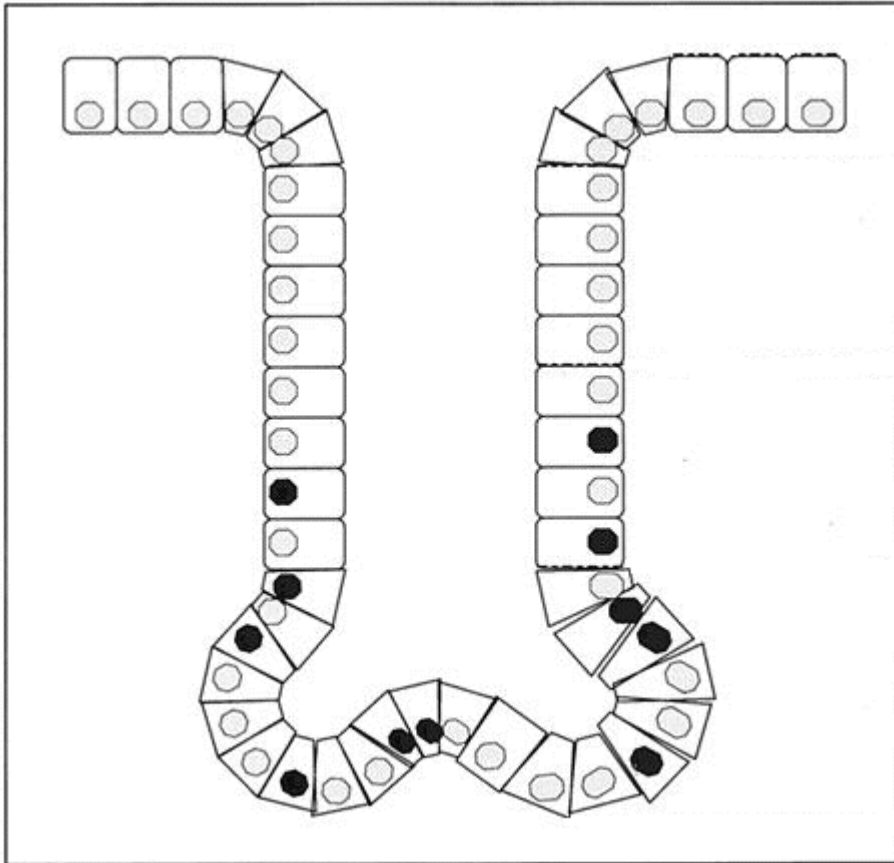
## 2.2. Diagnostic Criteria for Barrett's Esophagus, Dysplasia and Adenocarcinoma

The anatomopathological study was carried out separately by two pathologists experienced in the subject. Intestinal metaplasia was defined by the presence of goblet cells in glandular mucosa. Dysplasia was defined as the presence of nuclear variation in size and shape, nuclear or nucleolar enlargement, increased nuclear to cytoplasmic ratio, hyperchromatism, and abnormal mitoses. Dysplasia was classified into negative, indefinite, low-grade dysplasia (LGD) and high grade dysplasia (HGD), as previously described (15;40-42). Adenocarcinoma was characterized by the presence of atypical glands beyond the basal membrane, invading the lamina propria and the submucosa. The patients with EAC were staged according to TNM (UICC - 2004) classification.

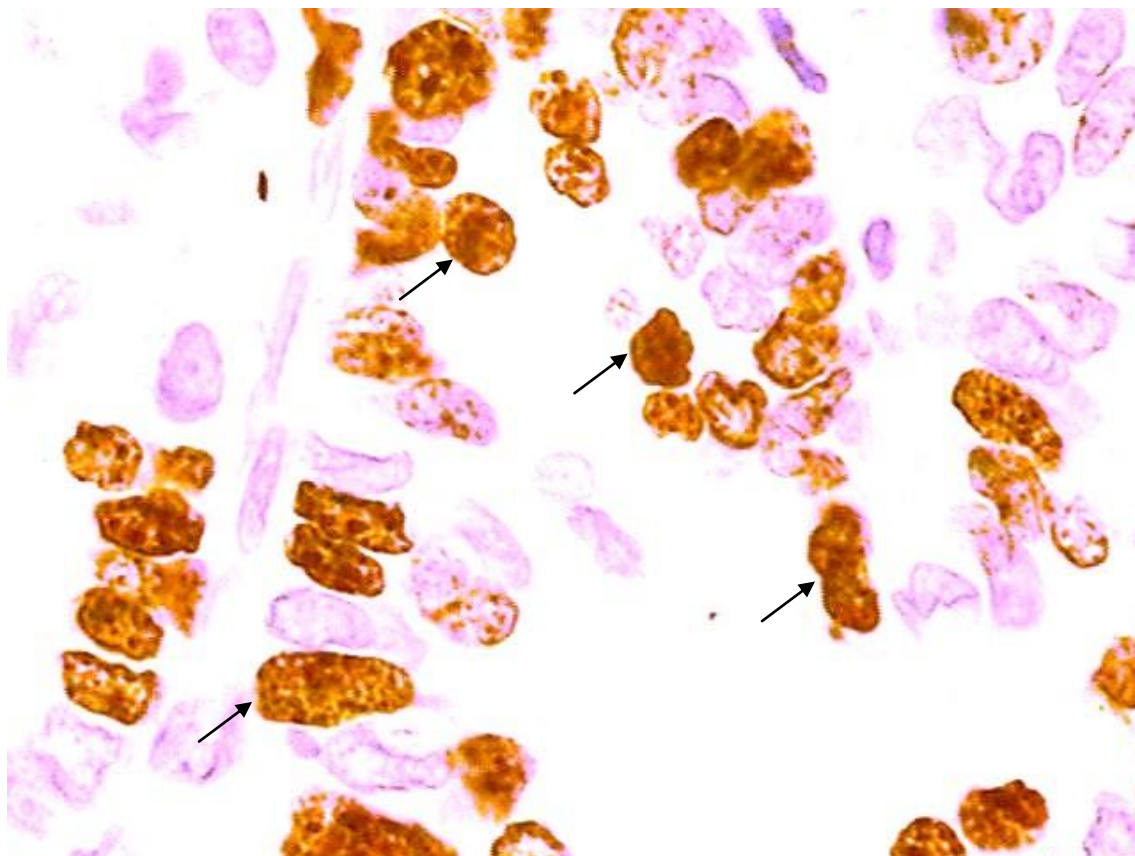
### 2.3. Immunohistochemical Analysis

The immunohistochemical analysis was done at the Research Center of HCPA. Paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin were used. Epitope retrieval was heat-induced in citrate buffer. Monoclonal antibody MIB-5 (DakoCytomation, M7248 Code, Edition 27/01/04, Denmark), that recognizes the Ki-67 antigen, was used in dilution of 1:50. The avidin-biotin immunoperoxidase method was employed for Ki-67 stainings, according to previous descriptions (34-37).

The Ki-67 index was determined for each patient and is the percentage of stained cells as a fraction of all cells in an esophageal or gastric crypt (figure 1), counting at least 500 cells, as carried out previously (36). The positive nuclei stained brown (figure 2). The hot spot area was chosen for each patient. The ki-67 index was calculated separately by two pathologists experienced in immunohistochemistry, who had been blinded of clinical information. Final Ki-67 was the average of two measures for each patient.



**Figure 1.** Ki-67 Index. Esophageal crypt scheme. Ki-67 index=  $(\bullet / (\bullet + \circ)) \times 100\%$ . (Adapted from Chen LQ, Hu CY, Gaboury L, Pera M, Ferraro P, Duranceau AC. Proliferative activity in Barrett's esophagus before and after antireflux surgery. *Ann Surg* 2001; 234(2):172-180.)



**Figure 2.** Example of Ki-67 immunohistochemical staining in a patient with esophageal adenocarcinoma, in 400X field of (marked cells are pointed)

#### **2.4. Statistical Analysis**

The ki-67 index had parametric distribution. Its data are presented in means  $\pm$  standard deviations. Comparisons between continuous variables of the 3 groups were analysed by analysis of variance (ANOVA). Tukey test was used to localize differences, when they were present. The linear correlation between variables was analyzed with the Pearson correlation coefficient. The comparison between categorical variables was made with Qui-square test. Statistical significance was

considered when  $P < 0,05$ . Statistical Package for Social Science (SPSS) version 12.0 was used.

## **2.5. Ethical Aspects**

Our project was previously evaluated and approved by the Group of Research and Pos-Graduation (GPPG) and Bioethics Committee of the HCPA, following all recommended ethical norms. The paraffin-embedded tissue proceeded from HCPA Pathology Service's archival. Patients did not participate directly in the study, as well as did not have their treatment protocols modified by the research. The clinical data, collected from the medical records, had been used confidentially and anonymously.

## **3. Results**

Initially 80 patients had been selected, of which 23 had been excluded: 6 cases of CIM, 5 subcardial adenocarcinomas (Type III), and 12 cases for insufficient material. We then studied 57 patients, of which 19 had esophageal or esophagogastric adenocarcinoma, 21 had Barrett's esophagus and 17 controls. The demographic data are presented in table 1. There was no difference between the groups regarding age and race. Men predominated in group 3 (cancer).

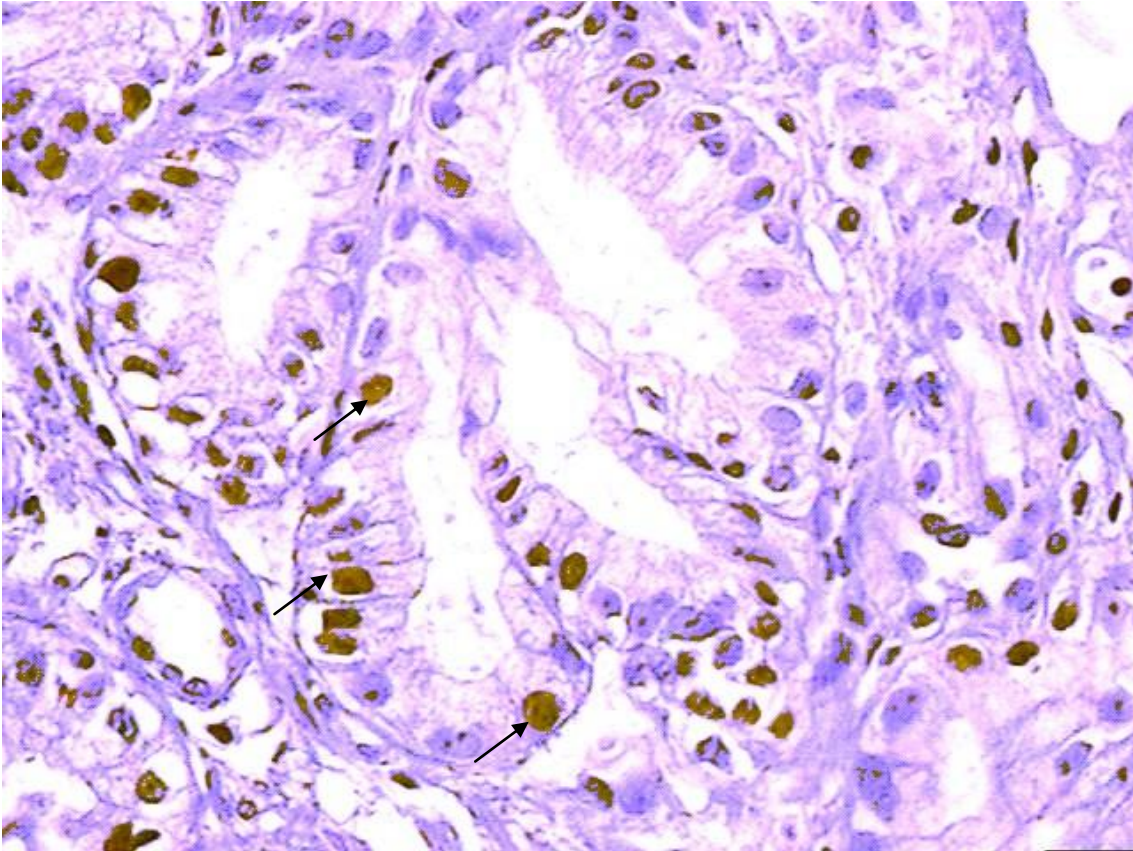
**Table 1.** Demographic data

	<b>Group 1 (Control) n=17</b>	<b>Group 2 (Barrett) n=21</b>	<b>Group 3 (Câncer) n=19</b>	<b>Total n=57</b>	<b><i>P Value</i></b>
<b>Age (mean±SD)</b>	55,7±12,1	52,52±20,28	62,89±13,54	56,26±16,48	<i>P=0,082</i>
<b>Sex (%)</b>					<i>P=0,048*</i>
<b>Men</b>	8 (47)	9 (42,9)	15 (78,9)	32 (56,1)	
<b>Women</b>	9 (52,9)	12 (57,1)	4 (21,1)	25 (43,9)	
<b>Race</b>					<i>P=0,20</i>
<b>Caucasian</b>	16 (94,1)	18 (85,7)	19 (100)	53 (93)	
<b>Black</b>	1 (5,9)	3 (14,3)	0 (0)	5 (7)	

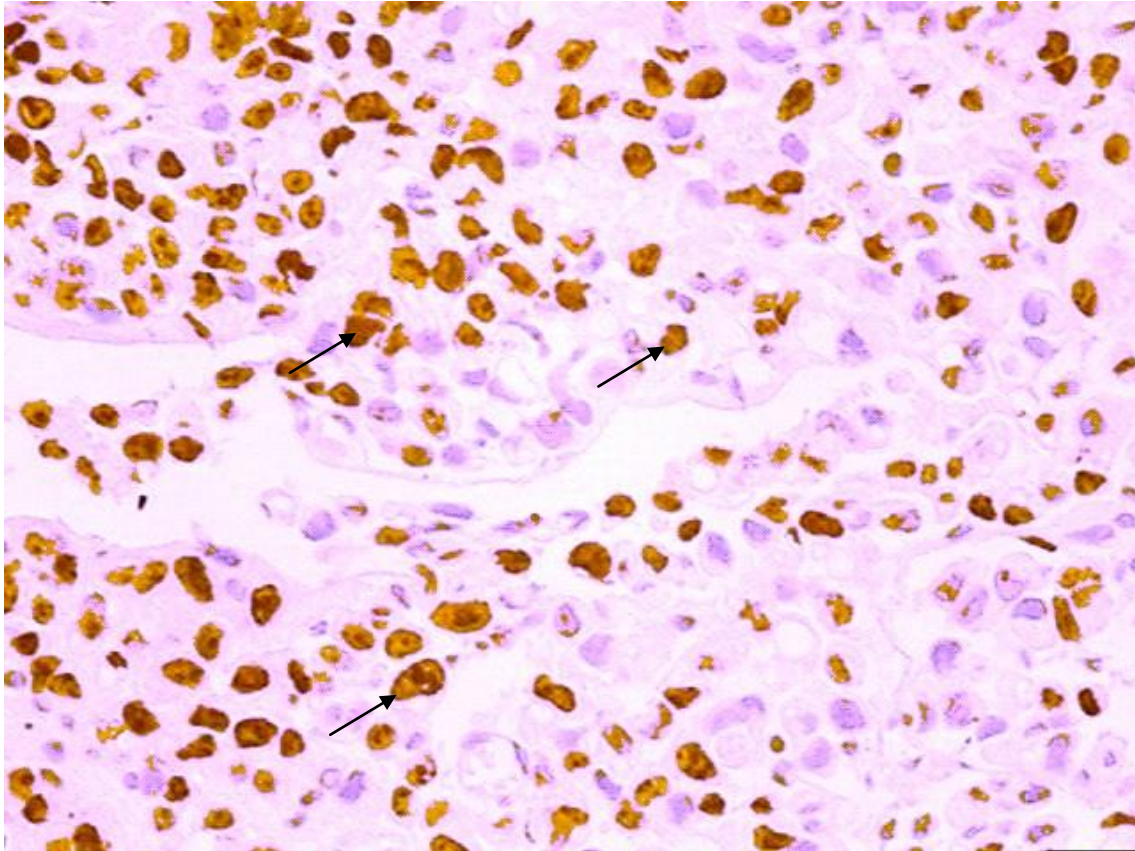
\* Patients with cancer were more likely men

The average ki-67 index was 23,62±17,6% in general. The averages had been 10,29±4,6% in the control, 21,26±15,1% in the patients with BE and 38±16% in the patients with EAC (figures 3 and 4). Ki-67 presented increasing distribution in the groups, from 1 to 3. There was significant difference in ki-67 index between the all 3 studied groups (figure 5). Strong linear correlation was identified ( $r = 0,6$ ) between Ki-67 activity and the sequence control-metaplasia-adenocarcinoma (figure 6) ( $P < 0,01$ ). No significant interobserver variability was found.

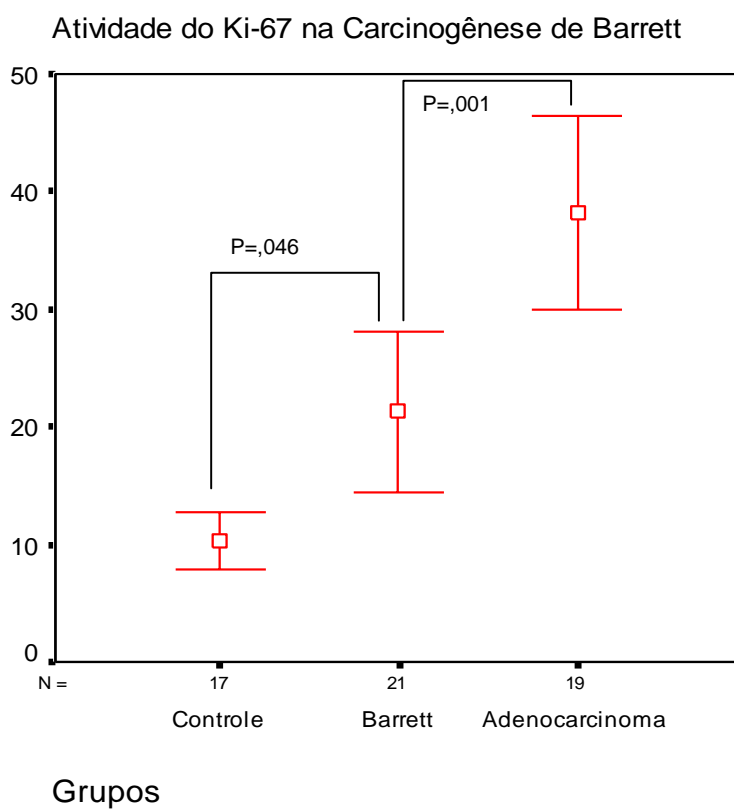




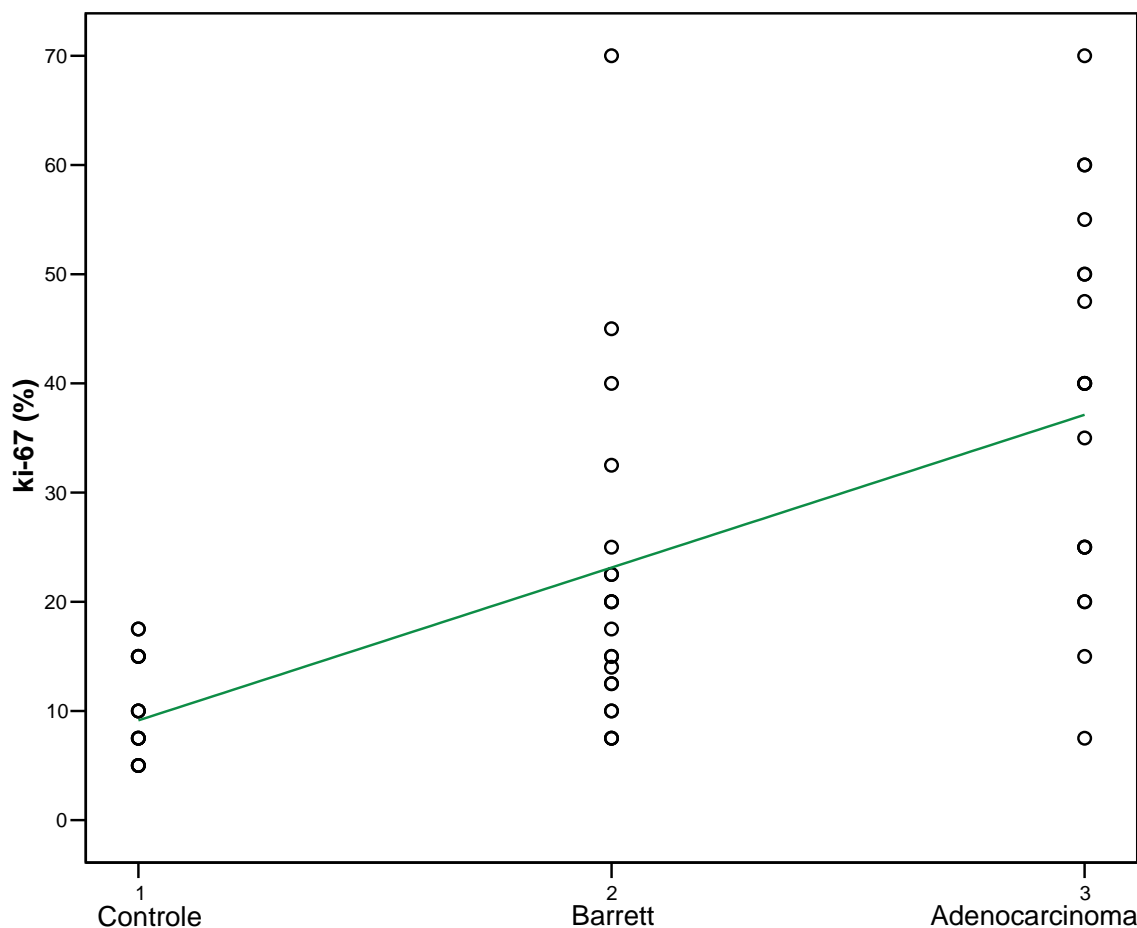
**Figure 3.** Example of Immunohistochemical Staining for Ki-67 in Barrett's Esophagus under 200x microscopic magnification (marked cells are pointed).



**Figure 4.** Example of Immunohistochemical Staining for Ki-67 in Esophageal Adenocarcinoma under 200x microscopic magnification (marked cells are pointed).



**Figura 5.** Ki-67 Index variation in the different groups, with rising expression in Barrett-Adenocarcinoma Sequence.



**Figure 6.** Correlation between Ki-67 antigen and Barrett-Adenocarcinoma Sequence. Pearson coefficient =0,6 (p<0,01).

The columnar epithelium extension in patients with BE was  $5,29 \pm 3,39$  cm. Short segment BE (<3 cm) represented 23.8% of the patients, while long-segment BE corresponded to 76,2%. He did not found correlation between columnar mucosa extension and ki-67 index. Three (15%) patients with BE had LGD, whose average Ki-67 index was  $17,5 \pm 13,2\%$ . Considering the small size sample of patients with dysplasia, we did not analyzed separately this group. Ninety percent of the patients with BE had hiatal hernia, that averaged  $2,95 \pm 1,9$  cm. Size of the hiatal hernia did

not correlate with Ki-67 expression.

The patients with EAC were stratified according to stage. Stage 1 occurred in 5.9% of patients. Stages 2, 3 and 4 corresponded to 31.6% of cases respectively. No statistical difference in the Ki-67 index between the stages was found. Eleven patients were resected, with curative intent in 5 and palliative intent in 6. In eight patients, surgery was contraindicated by advanced disease (n=6) or prohibitive surgical risk (n=2). In the majority of cases, the tumor was moderately differentiated (70%). There was no difference in proliferative activity according to tumor differentiation. In operated patients, more than 80% had muscularis propria invasion or deeper and more than 50% had regional node metastasis. No association was found between Ki-67 index and T and N stages respectively.

#### **4. Discussion**

Many factors related to cell cycle, oncogenes and tumor suppressor genes have been studied in BE, trying to identify prognostic markers for disease progression, considering Barrett carcinogenesis is a multistep process that follows the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. Increased proliferative activity has been reported in different tumors (43-45). Currently, Ki-67 is one of the most studied markers of cell proliferation. Increased ki-67 positivity was demonstrated in 165 digestive carcinomas: gastric, esophageal, colonic and rectal (46).

#### 4.1. Methods

The flow cytometry technique of was used initially with ki-67 in some studies. The results with this method have not shown significant differences in the Ki-67 expression, when comparisons of patients with BE with different degrees of dysplasia and adenocarcinoma were made (47;48). Its disadvantages include frozen sections requirements, tissue architecture compromise, sophisticated equipment needs and laborious performance (49-52).

The Ki-67 index (percentile of stained cells/all cells) has been used to evaluate proliferative activity of tumours, through immunohistochemistry, in paraffin-embedded tissue. Ki-67 index has become the method of choice for proliferation studies, for its great accuracy and factibility. Electronic counting has been also employeed, however we do not have such equipment. The conventional counting instead is widely done.(33;34;40;45;53) In the present study, counting was carried out separately by two experienced pathologists, who were blinded of clinical data, so that biases could be minimized.

Hong et al used the gastric epithelium as control to evaluate Ki-67 in BE (35). In the present study, we also choose that same control, considering that gastric mucosa histologic architecture and cellularity resemble more that of BE, with the mucous glands and crypts, which represents the main proliferative zone. The stratified scamous epithelium has different architecture, devoid of glands, proliferative activity restricted to its basal layer, which we consider unfavorable characteristics to be used as control. Gastric mucosa proliferative behavior also had greater correlation with the BE one in a study (47).

The crypt stratification, according to its depth, was carried out in some studies. There was difference in Ki-67 distribution, mainly between LGD and HGD. The proliferative activity moved from the deep compartment of crypt, in the EB with LGD, to the superficial compartment, in the EB with HGD.(35;38) In our study, we did not stratify epithelium, because we consider it subjective to do in practice, since histological sections irregularly divide crypts in different depths and directions. In patients with BE, we counted Ki-67 in the entire crypts, in hot spot area, counting at least 500 cells per patient. Moreover, such stratification has shown to be important particularly in the differentiation of patients with LGD and HGD. As we had few patients with dysplasia, they were not analyzed them separately as a group, making epithelium stratification unnecessary.

#### 4.2. Results

Polkowski et al analyzed the Ki-67 index proliferative activity in 25 esophagectomy resected specimens, in different histological areas of BE. In the hot spot, the Ki-67 index averaged 45% in areas without dysplasia, 45% in the indefinite areas for dysplasia, 46% in LGD and 55% in the HGD. Despite the small differences, there was significant linear correlation between the proliferative activity and the histologic progression. Size of the proliferative zone also increased significantly, in accordance with that same sequence.(54) Despite using esophagectomy specimens, this study did not report Ki-67 positivity in cancer areas. A control group was not used.

Lauwers et al analyzed the Ki-67 expression in 20 esophagectomy specimens, reporting 10% positivity in EB without dysplasia, 20% in LGD and 50% HGD.(38) The proliferative activity in cancer areas was not reported.

Hong et al evaluated Ki-67 index in 43 patients with BE predominantly. The Ki-67 expression was 13% in the gastric mucosa (control), 33% in BE without dysplasia, 40% in BE with LGD and 33% in the HGD. In only 5 cases of esophageal adenocarcinoma, Ki-67 expression was 38%.(35) This study found significant difference in Ki-67 activity between the groups, when stratifying the glands, reporting superficial proliferating zone in HGD patients, as previously discussed.

Rioux-Leclercq et al conducted study with the Ki-67 in 44 esophagectomy specimens, in different histologic areas. Areas with EB and LGD had been positive for Ki-67 in 14% of the cases, EB and HGD in 73% and EAC in 87% of the cases. Significant increase in the prevalence of the Ki-67 in the sequence dysplasia-adenocarcinoma was found.(37) However, Ki-67 in BE without dysplasia and control group was not reported. Moreover, this study considered Ki-67 positive the cases whom index was 10% or more. Such criterion is somewhat arbitrary since it was not used in any other publications.

In a recent study, conducted by Feith et al, different histological areas were evaluated for Ki-67 index in 24 esophagectomy specimens. Ki-67 expression increased significantly in the following sequence: esamous mucosa (20%), BE without dysplasia (35%), BE with dysplasia (45%) and adenocarcinoma (60%).(36)



Another recent study, published by Szachnowicz et al, evaluated the Ki-67 in 13 esophagectomy specimens and demonstrated "moderate" or "strong" proliferative activity in all cases of BE (n=9) and EAC (n=12). The authors did not determine the Ki-67 index, but they qualified this marker in 4 degrees (absent, weak, moderate, strong). (12) This criterion, however, was not used before, making comparisons not possible, and statistical analysis was not made for Ki-67 expression.

Bhargava et al studied prospectively the behavior of different markers in BE, in a rigorous esophageal biopsy protocol. The Ki-67 evaluation was limited to the 6 initial patients, with total of 200 biopsy specimens, for its significant association with presence of dysplasia, already in this small number of patients. The Ki-67 was positive in 8 of 10 (80%) specimens with dysplasia and absent in 179 of 181 (99%) specimens without dysplasia.(55) However, the author does not describe clearly the method of Ki-67 assessment, reporting it as a qualitative variable. Moreover, despite the high number of biopsy samples, the number of patients is reduced, with limited sample representativity, since 30% (2/6) of the patients presented dysplasia.

Based on previously discussed studies, which searched Ki-67 proliferative activity in Barrett's carcinogenesis, we find inconclusive and heterogeneous results, although they agree that there is correlation between Ki-67 and disease evolution. In our study, the average Ki-67 expression was 10% in the normal gastric mucosa, according to the literature. In patients with BE and EAC, whose positivity was of 21% and 38% respectively, we find greater differences with the literature data, that present up to 45% positivity in BE and 60% in cancer. These differences can be

partly due small and not representative sample sizes, from studies based on different histological areas esophagectomy resected specimens. In these studies, one patient is analyzed for several histological sections. Our study sample is patient-based and not specimen-based, with each patient having only one diagnosis. Variations in the immunohistochemical technique may also partly explain the different results, such as types of antibodies, antigenic presentation and assessment of the marker.

We demonstrated a significant correlation between the Ki-67 proliferative activity and the Barrett-adenocarcinoma progression. We found difference in the ki-67 index between patients with BE and of patients with cancer. The results are concordant with the literature and reassure the progressive character of this disease, for the increasing prevalence of this marker.

In patients with EAC, we did not find association of ki-67 expression with clinical staging, tumor penetration (T) or nodal spread (N). These results suggest limited role of ki-67 as a prognostic marker in patients with this cancer, however the possibility of small sample size to carry out comparisons within the group must be considered. Other authors did not find significant differences in the Ki-67 expression according to cancer staging (36).

More than ten articles were published in the last 10 years documenting that adequate gastroesophageal reflux control associates with histological regression of Barrett's esophagus. The Anti-reflux surgery was demonstrated to be important predictive factor for histologic regression, that may occur in 36% of operated patients (18). The identification of the sub-group of patients prone to regression is an appropriate field for future research, where the molecular markers may contribute in treatment decisions for each patient.

Instead of finding significant differences in the Ki-67 expression between all the 3 main groups, their amplitude was small, suggesting limited role of the Ki-67 as a powerful marker of Barrett's carcinogenesis. To elucidate this issue, the real usefulness of this marker as a prognostic one, in the metaplasia-displasia-adenocarcinoma sequence, could only be established with the followup of patients under risk, evaluating prospectively this marker in accordance with the evolution of the disease. There must be greater standardization in the methods of the future studies, making possible better comparisons between the results

## 5. Conclusions

The ki-67 activity was of 10% in patients with normal gastric mucosa (control), 21% in patients with BE and 38% in the patients with EAC. There was significant difference between all the groups, with increasing expression of the Ki-67 in the progression Barrett-adenocarcinoma.

There was linear correlation between the Ki-67 expression and the metaplasia-adenocarcinoma progression in the EB, demonstrating an increasing positivity according to disease evolution.

## Reference List

- (1) Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR. Barrett's esophagus. *J Gastrointest Surg* 2004; 8(1):1-17.
- (2) Jenkins GJ, Doak SH, Parry JM, D'Souza FR, Griffiths AP, Baxter JN. Genetic pathways involved in the progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma. *Br J Surg* 2002; 89(7):824-837.
- (3) Cameron AJ, Carpenter HA. Barrett's esophagus, high-grade dysplasia, and early adenocarcinoma: a pathological study. *Am J Gastroenterol* 1997; 92(4):586-591.
- (4) Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340(11):825-831.
- (5) Cameron AJ, Ott BJ, Payne WS. The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus. *N Engl J Med* 1985; 313(14):857-859.
- (6) DeMeester SR, DeMeester TR. Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus: fifty years of controversy. *Ann Surg* 2000; 231(3):303-321.
- (7) Spechler SJ. The natural history of dysplasia and cancer in esophagitis and Barrett esophagus. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36(5 Suppl):S2-S5.
- (8) Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998; 83(10):2049-2053.
- (9) Dolan K, Sutton R, Walker SJ, Morris AI, Campbell F, Williams EM. New classification of oesophageal and gastric carcinomas derived from changing patterns in epidemiology. *Br J Cancer* 1999; 80(5-6):834-842.
- (10) Watson A. Barrett's oesophagus--50 years on. *Br J Surg* 2000; 87(5):529-531.
- (11) de Barros SG, Vidal RM, Luz LP, Ghisolfi ES, Barlem GG, Komlos F et al. [Prevalence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction in a 10 year period at a cancer referral center in southern Brazil]. *Arq Gastroenterol* 1999; 36(1):32-36.
- (12) Szachnowicz S, Ceconello I, Iriya K, Marson AG, Takeda FR, Gama-

Rodrigues JJ. Origin of adenocarcinoma in Barrett's esophagus: p53 and Ki67 expression and histopathologic background. *Clinics* 2005; 60(2):103-112.

(13) Holscher AH, Bollschweiler E, Schneider PM, Siewert JR. Early adenocarcinoma in Barrett's oesophagus. *Br J Surg* 1997; 84(10):1470-1473.

(14) Nobukawa B, Abraham SC, Gill J, Heitmiller RF, Wu TT. Clinicopathologic and molecular analysis of high-grade dysplasia and early adenocarcinoma in short- versus long-segment Barrett esophagus. *Hum Pathol* 2001; 32(4):447-454.

(15) Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Roth G, Surawicz CM, Van BG et al. Observer variation in the diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus. *Hum Pathol* 1988; 19(2):166-178.

(16) Levine DS, Haggitt RC, Blount PL, Rabinovitch PS, Rusch VW, Reid BJ. An endoscopic biopsy protocol can differentiate high-grade dysplasia from early adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1993; 105(1):40-50.

(17) Reid BJ, Weinstein WM, Lewin KJ, Haggitt RC, VanDeventer G, DenBesten L et al. Endoscopic biopsy can detect high-grade dysplasia or early adenocarcinoma in Barrett's esophagus without grossly recognizable neoplastic lesions. *Gastroenterology* 1988; 94(1):81-90.

(18) Gurski RR, Peters JH, Hagen JA, DeMeester SR, Bremner CG, Chandrasoma PT et al. Barrett's esophagus can and does regress after antireflux surgery: a study of prevalence and predictive features. *J Am Coll Surg* 2003; 196(5):706-712.

(19) Flejou JF. Barrett's oesophagus: from metaplasia to dysplasia and cancer. *Gut* 2005; 54 Suppl 1:i6-12.

(20) Montgomery E, Goldblum JR, Greenson JK, Haber MM, Lamps LW, Lauwers GY et al. Dysplasia as a predictive marker for invasive carcinoma in Barrett esophagus: a follow-up study based on 138 cases from a diagnostic variability study. *Hum Pathol* 2001; 32(4):379-388.

(21) Edwards MJ, Gable DR, Lentsch AB, Richardson JD. The rationale for esophagectomy as the optimal therapy for Barrett's esophagus with high-grade dysplasia. *Ann Surg* 1996; 223(5):585-589.

(22) Hameeteman W, Tytgat GN, Houthoff HJ, van den Tweel JG. Barrett's esophagus: development of dysplasia and adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1989; 96(5 Pt 1):1249-1256.

(23) Reid BJ. Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 1991; 20(4):817-834.

- (24) Reid BJ, Blount PL, Rubin CE, Levine DS, Haggitt RC, Rabinovitch PS. Flow-cytometric and histological progression to malignancy in Barrett's esophagus: prospective endoscopic surveillance of a cohort. *Gastroenterology* 1992; 102(4 Pt 1):1212-1219.
- (25) Skinner DB, Walther BC, Riddell RH, Schmidt H, Iacone C, DeMeester TR. Barrett's esophagus. Comparison of benign and malignant cases. *Ann Surg* 1983; 198(4):554-565.
- (26) Chandrasoma P. Pathophysiology of Barrett's esophagus. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 9(3):270-278.
- (27) DeMeester TR. Clinical biology of the Barrett's metaplasia, dysplasia to carcinoma sequence. *Surg Oncol* 2001; 10(3):91-102.
- (28) Oberg S, Peters JH, DeMeester TR, Chandrasoma P, Hagen JA, Ireland AP et al. Inflammation and specialized intestinal metaplasia of cardiac mucosa is a manifestation of gastroesophageal reflux disease. *Ann Surg* 1997; 226(4):522-530.
- (29) Morales CP, Souza RF, Spechler SJ. Hallmarks of cancer progression in Barrett's oesophagus. *Lancet* 2002; 360(9345):1587-1589.
- (30) Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, Triadafilopoulos G, Geboes K, Casson AG et al. Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Pathol* 1999; 154(4):965-973.
- (31) Wijnhoven BP, Tilanus HW, Dinjens WN. Molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. *Ann Surg* 2001; 233(3):322-337.
- (32) Sanders DAS, Taniere P., Harrison R.F., Jankowski JAZ. Clinical and molecular pathology of the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in Barrett's oesophagus. *Curr Diag Pathol* 2003; 9:235-241.
- (33) Endl E, Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 2000; 257(2):231-237.
- (34) McCormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA. Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology* 1993; 22(4):355-360.
- (35) 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(2):423-429.
- (36) 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(4):322-327.

(37) Rioux-Leclercq N, Turlin B, Sutherland F, Heresbach N, Launois B, Campion JP et al. Analysis of Ki-67, p53 and Bcl-2 expression in the dysplasia-carcinoma sequence of Barrett's esophagus. *Oncol Rep* 1999; 6(4):877-882.

(38) 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(12):1201-1208.

(39) Stein HJ, Feith M, Siewert JR. Cancer of the esophagogastric junction. *Surg Oncol* 2000; 9(1):35-41.

(40) Montgomery E, Bronner MP, Goldblum JR, Greenson JK, Haber MM, Hart J et al. Reproducibility of the diagnosis of dysplasia in Barrett esophagus: a reaffirmation. *Hum Pathol* 2001; 32(4):368-378.

(41) Faller G, Borchard F, Ell C, Seitz G, Stolte M, Walch A et al. Histopathological diagnosis of Barrett's mucosa and associated neoplasias: results of a consensus conference of the Working Group for Gastroenterological Pathology of the German Society for Pathology on 22 September 2001 in Erlangen. *Virchows Arch* 2003; 443(5):597-601.

(42) Offerhaus GJ, Correa P, van Eeden S, Geboes K, Drilenburg P, Vieth M et al. Report of an Amsterdam working group on Barrett esophagus. *Virchows Arch* 2003; 443(5):602-608.

(43) Gerdes J, Pickartz H, Brotherton J, Hammerstein J, Weitzel H, Stein H. Growth fractions and estrogen receptors in human breast cancers as determined in situ with monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1987; 129(3):486-492.

(44) Mulder AH, Van Hootegem JC, Sylvester R, ten Kate FJ, Kurth KH, Ooms EC et al. Prognostic factors in bladder carcinoma: histologic parameters and expression of a cell cycle-related nuclear antigen (Ki-67). *J Pathol* 1992; 166(1):37-43.

(45) Ramires M, David L, Leitao D, Seixas M, Sansonetty F, Sobrinho-Simoes M. Ki67 labelling index in gastric carcinomas. An immunohistochemical study using double staining for the evaluation of the proliferative activity of diffuse-type carcinomas. *J Pathol* 1997; 182(1):62-67.

(46) Porschen R, Kriegel A, Langen C, Classen S, Hilse M, Lohe B et al. Assessment of proliferative activity in carcinomas of the human alimentary tract by Ki-67 immunostaining. *Int J Cancer* 1991; 47(5):686-691.

(47) Iftikhar SY, Steele RJ, Watson S, James PD, Dilks K, Hardcastle JD. Assessment of proliferation of squamous, Barrett's and gastric mucosa in patients with columnar lined Barrett's oesophagus. *Gut* 1992; 33(6):733-737.



- (48) Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS. Barrett's esophagus: cell cycle abnormalities in advancing stages of neoplastic progression. *Gastroenterology* 1993; 105(1):119-129.
- (49) Reid BJ, Levine DS, Longton G, Blount PL, Rabinovitch PS. Predictors of progression to cancer in Barrett's esophagus: baseline histology and flow cytometry identify low- and high-risk patient subsets. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(7):1669-1676.
- (50) Reid MM. Flow cytometry and Kleihauer tests. *J Clin Pathol* 1996; 49(4):354.
- (51) 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(1):53-61.
- (52) Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. Barrett's esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk for adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1987; 93(1):1-11.
- (53) Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182(3):311-322.
- (54) Polkowski W, van Lanschot JJ, ten Kate FJ, Baak JP, Tytgat GN, Obertop H et al. The value of p53 and Ki67 as markers for tumour progression in the Barrett's dysplasia-carcinoma sequence. *Surg Oncol* 1995; 4(3):163-171.
- (55) Bhargava P, Eisen GM, Holterman DA, Azumi N, Hartmann DP, Hanfelt JJ et al. Endoscopic mapping and surrogate markers for better surveillance in Barrett esophagus. A study of 700 biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 2000; 114(4):552-563.

## ANEXO A

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA  
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
SERVIÇO DE CIRURGIA GERAL (GCEEID)  
SERVIÇO DE PATOLOGIA**

Projeto CPPG Nº 04-099

Ficha Nº: \_\_\_\_\_.

**1. Dados Demográficos:**

Nome: \_\_\_\_\_ Prontuário Nº: \_\_\_\_\_/

Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Sexo ( ) 1. Masculino 2. Feminino Idade: \_\_ anos  
Cor ( ) 1. Branco 2. Negro 3. Misto 4. Outros

**2. Dados Endoscópicos:**

1. Data da Endoscopia: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

2. Motivo de EDA:

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

3. Dados Macroscópicos:

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

4. Dados Anatômicos

- ( ) Junção Escamo-colunar: aos \_\_\_ cm da ADS;  
( ) Pinçamento Diafragmático: aos \_\_\_ cm da ADS;  
( ) Hérnia Hiatal \_\_\_\_\_ cm  
(pequena = 1 a 2 cm; moderada = 3 a 4 cm; grande = ou > 5 cm)  
( ) Lesão Neoplásica início: aos \_\_\_ cm da ADS  
término: aos \_\_\_ cm da ADS  
( ) Característica da Lesão 1. Vegetante; 2. Infiltrativa; 3. Ulcerada

Obs.: \_\_\_\_\_.

5. Laudo da EDA: \_\_\_\_\_.

**3. Dados Histopatológicos:**1. *Local das Biópsias* (e quantidade correspondente) :

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Esôfago Proximal             | <input type="checkbox"/> Fundo Gástrico |
| <input type="checkbox"/> Esôfago Distal               | <input type="checkbox"/> Corpo Gástrico |
| <input type="checkbox"/> Epitélio Metaplásico         | <input type="checkbox"/> Antro Gástrico |
| <input type="checkbox"/> Junção Escamo-columnar - JEC | <input type="checkbox"/> Cárdia         |
| <input type="checkbox"/> Píloro                       |   |

2. *Epitélio Metaplásico:*

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Comprimento: ___ cm;       | <input type="checkbox"/> Displasia de Baixo Grau; |
| <input type="checkbox"/> Metaplasia tipo Intestinal | <input type="checkbox"/> Displasia de Alto Grau;  |
| ;   | <input type="checkbox"/> Carcinoma                |

3. *Lauda da Biópsia:* \_\_\_\_\_4. *Diagnóstico Final:* \_\_\_\_\_*(Prosseguir com banco de dados apenas se em caso de neoplasia)***4. Dados do Estadiamento Clínico (cTMM):**

T: \_\_\_ N: \_\_\_ M: \_\_\_ Estágio: \_\_\_

**5. Avaliação clínica pré-operatória (Vide Protocolo de Câncer de Esôfago do GCEEID)**

- Baixo risco  
 Alto risco

**6. Análise Anatomopatológica da Peça Cirúrgica:**1. *Segmento Esofagogástrico ressecado:*

- |   |  |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Esôfago Proximal | <input type="checkbox"/> Esôfago Médio     |
| <input type="checkbox"/> Esôfago Distal   | <input type="checkbox"/> Estômago Proximal |

2. *Localização Tumoral:*

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Esôfago Proximal | <input type="checkbox"/> Esôfago Médio  |
| <input type="checkbox"/> Esôfago Distal   | <input type="checkbox"/> JEC            |
| <input type="checkbox"/> Fundo Gástrico   | <input type="checkbox"/> Corpo Gástrico |

3. *Outros achados anatomopatológicos:* \_\_\_\_\_4. *Lauda Anatomopatológico:* \_\_\_\_\_5. *Diagnóstico Final:* \_\_\_\_\_**7. Dados do Estadiamento Patológico (pTNM):**

T: \_\_\_ N: \_\_\_ M: \_\_\_ Estágio: \_\_\_

**8. Análise Imuno-histoquímica:**

Índice de Expressão do Ki-67 (Patologista 1): \_\_\_

Índice de Expressão do Ki-67 (Patologista 2): \_\_\_