

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação:
Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia**

Avaliação da erradicação do *Helicobacter pylori* na expressão de CD44v6 na metaplasia intestinal gástrica.

Ronaldo João Spinato Torresini

2014

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação:
Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia**

**Avaliação da erradicação do *Helicobacter pylori* na expressão
de CD44v6 na metaplasia intestinal gástrica.**

Ronaldo João Spinato Torresini

**Orientador: Prof. Dr. João Carlos Prolla
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Edmundo Mazzoleni**

Tese de Doutorado

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

T693a Torresini, Ronaldo João Spinato

Avaliação da erradicação do *Helicobacter pylori* na expressão da CD44v6 na metaplasia intestinal gástrica / Ronaldo João Spinato Torresini. - Porto Alegre: UFRGS, 2014.

73 p.: gráf. il. tab. Inclui um artigo científico submetido à publicação.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Prolla.

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Edmundo Mazzoleni.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia. Área de concentração: Gastroenterologia.

2. HELICOBACTER PYLORI. 2. NEOPLASIAS GÁSTRICAS/epidemiologia. 3. METAPLASIA. 4. LESÕES PRÉ-CANCEROSAS. 5. ESTÔMAGO. 6. MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR. 7. ANTÍGENOS CD44. 8. DISPEPSIA. 9. IMUNOISTOQUÍMICA. 10. HOSPITAIS UNIVERSITÁRIOS. 11. ENSAIOS CLÍNICOS CONTROLADOS ALEATÓRIOS. 12. MÉTODO DUPLO-CEGO. I. Prolla, João Carlos. II. Mazzoleni, Luiz Edmundo. III. Título.

C.D.D. 17.63
N.L.M. QW 154

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia
Bibliotecária CRB 10/196

Dedico este trabalho
à minha esposa Elizabeth e aos meu filhos
Lourenço e Guilherme.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Carlos Prolla, mestre e amigo, sempre presente e cujos comentários e ensinamentos, tanto de ciência quanto de vida, são mensagens preciosas.

Ao Prof. Dr. Luiz Edmundo Mazzoleni, colega e amigo, cujo dinamismo e entusiasmo levaram a cabo este grande projeto de pesquisa que é o HEROES, tendo eu a alegria de poder compartilhá-lo.

Ao Prof. Dr. Carlos Fernando de Magalhães Francisconi e Dr. Guilherme Becker Sander, grande parceiros, e igualmente responsáveis pelo HEROES.

À Prof^a. Dra Luise Meurer pela amizade e pela competência na análise das lâminas e disposição tranquila na realização desta tarefa.

Ao Dr. Diego Uchoa pela competência e disponibilidade na leitura das lâminas.

Aos Biomédicos Laura Renata De Bona e Tobias Cancian Milbrandt pelo empenho, dedicação e organização.

Ao Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva pela cooperação prestada a este trabalho.

Ao Técnico em Patologia Tiago Giuliani pela competência e dedicação na feitura do material.

Aos professores do PPG que aceitaram minha volta como estudante a esta Universidade e que me acolheram bem durante todo este período.

À Sra. Moema Goulart e demais funcionárias do PPG.

Ao serviço de Patologia Experimental onde as lâminas foram lidas e algumas refeitas.

Ao Serviço de Gastroenterologia pela acolhida.

Ao GPPG pelo apoio técnico e financeiro.

Aos meus colegas do PPG que muito contribuíram nos Seminários de Pesquisa e no convívio.

Aos Prof. comentaristas Prof^a. Dra Patricia Ashton-Prolla, ao Prof. Dr. Renato Fagundes e ao Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva pela análise crítica do projeto de pesquisa e sugestões ao que se transformou nesta tese.

Ao Prof. Daniel Simon da Ulbra que proporcionou estágios teóricos naquela Universidade e aos professores dos cursos que assisti.

Aos pacientes que são a razão do nosso esforço.

Aos meus pais, Moacyr (*in memoriam*) e Lori, agradeço por tantas coisas.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
1.1 RESUMO	9
1.2 ABSTRACT	10
2 INTRODUÇÃO	11
2.1 Aspectos Epidemiológicos do Câncer Gástrico	11
2.2 Metaplasia Intestinal Gástrica (MIG)	12
2.3 CD44	18
3 JUSTIFICATIVA	22
4 OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo Principal	23
4.2 Objetivos Específicos	23
5 AMOSTRA E MÉTODO	24
5.1 Critérios de Inclusão	25
5.2 Critérios de Exclusão	25
5.3 Procedimentos	26
4.3.1 Teste para detecção CD44v6 por imunistoquímica	26
4.3.2 Coloração das lâminas para estudo histopatológico	27
4.3.3 Análises estatísticas e tamanho da amostra	28
5.4 Considerações Éticas	29
6 RESULTADOS	30
7 DISCUSSÃO	38
8 CONCLUSÕES	48
9 REFERÊNCIAS	49
10 ANEXOS	59
ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	59
ANEXO 2- Trabalho apresentado na Semana Brasileira do Aparelho Digestivo, Florianópolis 2010, como apresentação oral	61
ANEXO 3 - Artigo a ser enviado para publicação em revista especializada	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AB	Alcian blue
CD44s	Proteína CD44 (cluster of differentiation) padrão (standard)
CD44v	Variantes da proteína CD44
CDX2/CDX1	Regula a diferenciação da linhagem intestinal
CEP	Comissão de ética em pesquisa
Ciclina D2	Regula o ciclo celular
DAB	Diaminobenzina
DAP-quinase	Death-associated protein kinase, proteína associada à morte celular, pró-apoptótica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
E-caderina	Molécula de adesão celular
EGFR	Epidermal growth factor receptor, receptor do fator de crescimento epidérmico
ERBB2	erythroblastic leukemia-associated viral oncogene B (ERBB) homologue 2, oncogene viral B associado a leukemia eritroblástica homólogo 2
GAM	Gastrite Atrófica Multifocal
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	Hematoxilina-eosina
HEROES	Helicobacter Eradication Relief of Dyspeptic Symptoms
HID	High iron deamine, “diamina de ferro alto”
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HQ	Histoquímica
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kd	Quilodalton
Ki67	Marcador do índice da proliferação celular
MI	Metaplasia intestinal
MIG	Metaplasia intestinal gástrica
mRNA	Ácido ribonucléico, mensageiro
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>p16</i>	Proteína que inibe o ciclo celular, dependente da ciclino-quinase
<i>p27</i>	Proteína que inibe o ciclo celular, inibindo a quinase-1
<i>p53</i>	Regula expressão gênica
PAS	Periodic acid-Schiff, ácido Periódico de Schiff
PBS	Phosphate buffered saline, tampão fosfato-salino
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction, transcriptase reação reversa em cadeia da polimerase

TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- α	Transforming growth factor- α , fator transformador do crescimento- α
THBS1	Thrombospondin-1, trombospondina-1
TIMP-3	Tissue inhibitor of metalloproteinases-3, inibidor
tecidual de	metalloproteinases-3
TP53	Proteína tumoral p53 e está relacionada a vários
tipos de tumores	

1.1 Resumo

A metaplasia intestinal gástrica (MIG) é considerada como lesão precursora para o câncer gástrico, mas isto não tem levado a um controle maior dos portadores. Estudamos uma população dispéptica adulta e detectamos a prevalência de MIG. Vários marcadores têm sido testados para indicar qual paciente portador de metaplasia intestinal deva ser acompanhado com exames periódicos. Um destes marcadores é a pesquisa da proteína de membrana CD44v6 em lesões pré-malignas.

Objetivo: estudar a expressão da CD44v6 em pacientes dispépticos com *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) e metaplasia intestinal gástrica.

Local: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Pacientes: 642 pacientes dispépticos dos quais foram estudados 56 pacientes com MIG e comparados com outros dois grupos, um de pacientes com *H. pylori* e outro, sem *H. pylori* e sem MIG.

Métodos: estudo da MIG com colorações HE (hematoxilina-eosina), PAS/AB (periodic acid-Schiff/ Alcian blue), HID (high iron diamine) e, para estudar a expressão da CD44v6, empregou-se a imuno-histoquímica.

Resultados: De 642 pessoas avaliadas, 424 eram portadoras de *Helicobacter pylori* e 218 não. Das portadoras, 77 tinham MIG (18,2%) e das não portadoras, 15 (6,9%). Das pessoas com MIG, estudamos 56 casos, sendo MIG do tipo I em 55% (31/56) dos casos, 22% (12/56) do tipo II e 23% (13/56) do tipo III. A MIG teve igual proporção entre os sexos, foi mais frequente no antro, o tipo de MIG não teve relação com a extensão da metaplasia e não houve aumento proporcional com a idade. Na nossa população de estudo, a MIG foi de baixa frequência relativa (14,4%).

Quanto à CD44v6, todos os nossos casos foram negativos para esta proteína.

Conclusões:

1) Os nossos casos foram todos negativos para CD44v6 e não vemos utilidade de utilizar este marcador no nosso meio no rastreamento de pacientes com metaplasia intestinal gástrica que mereceriam um acompanhamento subsequente. 2) Biópsias do antro e da incisura detectaram quase a totalidade (93%) dos casos de metaplasia intestinal gástrica nos nossos casos e isto pode ser uma indicação para a prática clínica. 3) A distribuição da metaplasia intestinal gástrica entre os sexos seguiu a proporção no grupo estudado, concluindo-se que não há diferença entre os sexos. 4) Não encontramos alteração da frequência da metaplasia intestinal gástrica conforme a idade. 5) O achado de borda em escova ou células de Paneth não exclui que naquela lâmina haja glândulas metaplásicas do tipo incompleto. 6) Não houve relação entre o local da metaplasia intestinal gástrica e seu tipo. 7) Não houve relação entre extensão e tipo de metaplasia intestinal gástrica. 8) A população estudada tem baixa prevalência de metaplasia intestinal gástrica.

1.2 Abstract

The gastric intestinal metaplasia (GIM) is considered a premalignant lesion for gastric cancer, but this has not led to greater control of the carriers. We studied a dyspeptic adult population and detected the prevalence of GIM. Several markers have been tested to indicate which patients with intestinal metaplasia should be followed with periodic examinations. One of these markers is the membrane protein CD44v6.

Objective: To study the expression of CD44v6 in dyspeptic patients with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and gastric intestinal metaplasia.

Location: Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Patients: 642 dyspeptic patients of which 56 patients with GIM and compared with two other groups, one of patients with *H. pylori* and another without *H. pylori*.

Methods: A study of GIM with HE staining (hematoxylin-eosin), PAS / AB (periodic acid-Schiff / Alcian blue), HID (high iron diamine). We used immunohistochemistry (IHC) to study the expression of CD44v6.

Results: Of 642 patients evaluated, 424 were carriers of *Helicobacter pylori* and 218 did not. The carriers had 77 MIG (18.2%) and noncarriers, 15 (6.9%). Of those GIM 56 study cases, GIM type I by 55% (31/56) cases, 22% (12/56) Type II and 23% (13/56) of Type III. GIM had equal sex ratio, was more frequent in the antrum, the type of GIM was not related to the extent of metaplasia and there was no proportional increase with age. In our study population, the GIM has low relative frequency (14.4%). As to CD44v6, all our cases were negative for this protein.

Conclusions:

- 1) Our cases were all negative for CD44v6 and we do not see the usefulness of using this marker in screening patients with gastric intestinal metaplasia that merit a subsequent follow-up.
- 2) Biopsies of the antrum and incisura detected almost all (93 %) cases of gastric intestinal metaplasia in our cases and this can be an indication for clinical practice.
- 3) The distribution of gastric intestinal metaplasia between the sexes followed the proportion in the group studied, and so there is no difference between the sexes.
- 4) No change was found in the frequency of gastric intestinal metaplasia according to age.
- 5) The finding of brush border and Paneth cells does not preclude that metaplastic glands is not of the incomplete type.
- 6) There was no relationship between the location of gastric intestinal metaplasia and its type.
- 7) There was no relationship between the extent and type of gastric intestinal metaplasia.
- 8) The population has a low prevalence of gastric intestinal metaplasia.

2 INTRODUÇÃO

2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO CÂNCER GÁSTRICO

Estima-se que em 2008 ocorreram quase um milhão de novos casos de câncer gástrico no mundo, configurando-se como a quarta causa mais comum de neoplasia maligna e a segunda causa em mortalidade por câncer (1,2). Em geral, sua magnitude é de duas a três vezes maior nos países em desenvolvimento (3). No Brasil, o câncer gástrico é causa importante de morte, sendo nosso país considerado uma área de incidência moderada. As áreas de risco elevado são as que possuem incidência maior de 20 casos por 100.000 e as de risco baixo com incidência menor de 10 casos por 100.000.

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de casos novos de câncer de estômago estimados para o Brasil, em 2012, foi de 12.670 entre homens e de 7.420 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 13:100.000 em homens e 7:100.000 em mulheres, com variações amplas conforme o estado. A incidência em homens varia de 4,58:100.000 (Alagoas) a 18,96 (Mato Grosso do Sul). Em mulheres de 3,06 (Maranhão) a 9,66 (Rio de Janeiro). No Rio Grande do Sul, as taxas são: 14,09 para homens e 8,19 para mulheres. A taxa de mortalidade no período de 2009 a 2011 no Rio Grande do Sul foi de 9,35:100 000 para homens e variou de 4,54 em Alagoas a 14,76 no Amazonas. Em mulheres a mortalidade foi de 3,72 no Rio Grande do Sul e varia de 2,23 em Alagoas até 6,48 no Amazonas (3).

A razão mortalidade/incidência no câncer gástrico é consideravelmente alta em todas as partes do mundo, e a sobrevida em 5 anos é baixa, sendo em torno de 20%. Isso decorre da detecção acontecer em estágios avançados da doença.

A infecção pelo *Helicobacter pylori* é a principal causa do câncer gástrico no mundo, sendo que, desde 1994, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considera o *H. pylori* como um carcinógeno do grupo I (definido) (4,5).

O estudo patológico da neoplasia gástrica e de suas lesões pré-malignas tem nos estudos dos patologistas finlandeses Järvi e Laurén um marco fundamental, pois foram os pioneiros a aventar a possibilidade do carcinoma gástrico se originar de ilhotas de

metaplasia intestinal, encontradas na mucosa gástrica com gastrite crônica (6). Laurén em 1965 dividiu o carcinoma gástrico em dois grupos: tipo intestinal e tipo difuso, com diferenças na idade dos pacientes, no sexo e no prognóstico da doença (7). O tipo intestinal de câncer tem mais metaplasia intestinal nas proximidades do tumor que o tipo difuso, relação esta também descrita por Morson (8).

Um modelo para as alterações que ocorrem na mucosa gástrica da gastrite até o aparecimento do carcinoma do tipo intestinal foi proposto por Pelayo Correa, em 1975, conhecido pelo nome de “cascata da carcinogênese gástrica”. As suas observações derivam de estudos em populações de alto risco. Os componentes básicos são: gastrite crônica ativa não-atrôfica → gastrite atrófica multifocal → metaplasia intestinal completa → metaplasia intestinal incompleta → displasia de baixo grau → displasia de alto grau → carcinoma invasivo (9,10,11).

2.2 Metaplasia Intestinal Gástrica (MIG)

O estômago, macroscopicamente, pode ser dividido em cárdia, fundo (fundo e corpo, conforme nomenclatura inglesa) e antro. Histologicamente há três áreas distintas que correspondem aproximadamente a estas zonas anatômicas. A cárdia e a mucosa pilórica são compostas por glândulas mucossecretoras. Nas demais áreas do estômago, a mucosa é denominada do corpo ou fúndica e secreta, entre outros produtos, ácido e pepsina (12).

As glândulas fúndicas podem ser divididas em quatro regiões: base, pescoço, istmo e fovéola, nesta ordem e em direção ao lúmen. As glândulas pilóricas em apenas base, pescoço e fovéola. A porção do pescoço da glândula contém uma mistura de células principais e parietais, além de um terceiro tipo que são as células mucosas do pescoço (estas são facilmente reconhecidas com PAS). Estas células mucosas também podem ocorrer no istmo e estão presentes em toda a mucosa gástrica, admitindo-se que suas principais funções sejam a proliferação e a regeneração da mucosa. Estas células mucosas atuariam como células-tronco e poderiam migrar para a superfície, diferenciando-se em

células produtoras de muco, ou para a base, diferenciando-se em células parietais, principais ou neuroendócrinas. As células da superfície se renovam a cada 4 a 8 dias e as células das glândulas antrais e fúndicas num tempo maior, talvez até 2 a 3 meses (13-22).

O valor real de se classificar gastrite crônica está no fato da sua relação entre inflamação e atrofia e suas doenças associadas, sendo que em algumas vezes este padrão é tão consistente que pode ser preditivo do risco de úlcera péptica ou de câncer gástrico. A infecção pelo *H. pylori* pode causar gastrite antral difusa não atrófica, relacionada à úlcera péptica duodenal, ou pode causar gastrite atrófica multifocal (GAM) com metaplasia intestinal gástrica (MIG). A alteração relacionada à úlcera duodenal, não leva à perda glandular e está associado a risco reduzido de neoplasia. A alteração com GAM aumenta o risco de carcinoma gástrico e estes pacientes podem ter úlcera gástrica em algum momento na sua vida. O que leva a infecção pelo *H. pylori* a caminhos diferentes é um assunto pouco compreendido e os mecanismos propostos são multifatoriais. A informação do estudo anatomopatológico é, portanto, muito importante e deve ser padronizada. Esta é a recomendação do estudo atualizado do sistema Sydney-Houston, que, inclusive, elaborou uma escala analógica para diagnosticar e graduar a presença de *H. pylori*, de infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, de atrofia e de metaplasia intestinal (23). A atividade neutrofílica está provavelmente ligada à lesão tecidual e sua presença é quase um fenômeno universal da gastrite do *H. pylori* (24).

Define-se a atrofia da mucosa gástrica pela perda de glândulas que leva a um adelgaçamento da mucosa. A perda glandular por morte celular pode se seguir a erosões ou úlceras que destroem a camada glandular, ou resultante de um processo inflamatório crônico. A adição de metaplasia intestinal, especialmente na região antral, é um indicador da presença de atrofia. Atrofia com metaplasia intestinal estão associadas a um risco maior de câncer. Nem sempre a atrofia leva à metaplasia intestinal, pois no caso de atrofia da gastrite autoimune a metaplasia existente no corpo é a metaplasia pseudopilórica. (23,24,25).

A metaplasia intestinal é comum na gastrite crônica provocada pelo *H. pylori* e sua prevalência aumenta com a duração da doença. As classificações comumente usadas em metaplasia intestinal são: quanto à morfologia (23,24), ao conteúdo de mucinas (26,27,28, 29), ou ao conteúdo de enzimas (30).

Morfologicamente, no início do processo metaplásico, as células lembram as células do intestino delgado com células colunares maduras, os enterócitos eosinofílicos, absorptivos com a borda em escova bem desenvolvida. Alternando com estas células e a intervalos regulares, há células caliciformes repletas de mucina. As criptas são retas e a arquitetura glandular está preservada, podendo ter a presença de células de Paneth, descritas na base das criptas de Lieberkühn no intestino delgado. Esse é o tipo completo. Com a evolução do processo, aparece a metaplasia dita incompleta. As glândulas metaplásicas perdem o fenótipo de delgado e adquirem o quadro morfológico de estrutura êntero-colônica e após de estrutura colônica, sendo revestidas por células caliciformes de variados tamanhos e formas.

A classificação da metaplasia intestinal pelo **conteúdo em mucina** divide-a em três tipos: **tipo I**, em que as células caliciformes secretam sialomucinas e que corresponde ao tipo completo; **tipo II**, em que algumas células caliciformes secretam sulfomucinas; e o **tipo III**, em que as células colunares secretam sulfomucinas. Os tipos II e III são tipos incompletos, em que o tipo III assemelha-se à mucosa colônica e o tipo II é um híbrido entre a mucosa do delgado e do cólon.

A classificação da metaplasia intestinal pelo **conteúdo enzimático** considera o tipo completo (**tipo I**), em que as células colunares secretam enzimas digestivas como sacarase, trealase e fosfatase alcalina, isto é, todo ou quase todo o conjunto de enzimas dos enterócitos. Com a evolução do processo, as células metaplásicas vão perdendo o fenótipo de delgado com alteração da produção enzimática, caracterizando os tipos incompletos, com redução (**tipo IIa**) ou ausência (**tipo IIc**) da secreção enzimática.

Como é de esperar, há uma interrelação entre essas classificações. A título de exemplo, o tipo que lembra a glândula de delgado é morfológicamente do tipo completo, enzimaticamente do tipo I e quanto ao conteúdo de mucinas também do tipo I. A importância dessas classificações se deve ao fato que os tipos incompletos, especialmente o tipo III, têm sido relacionados com câncer gástrico (23, 25).

Além desta distinção, a extensão da MIG parece ser importante, sendo mais propensa de estar relacionada ao carcinoma se for extensa [MI em duas localizações do estômago ou se moderada ou severa em duas biópsias ou mais (31,32)]. Conforme P. Correa *et al.*, os melhores marcadores para câncer gástrico disponíveis atualmente são a

extensão da atrofia/MI incompleta, presença do *H. pylori* e níveis do pepsinogênio sérico (32).

O papel da MIG, nosso objeto de pesquisa, na transição da gastrite superficial ao câncer gástrico não é clara (33). Há dados que sugerem que a MIG e o câncer se originam de diferentes linhagens celulares de tal modo que a metaplasia seria, quando muito, um marcador de risco aumentado para câncer (34,35).

A metaplasia intestinal, no entanto, conforme vários outros estudos, teria um papel preponderante no processo da carcinogênese gástrica (36-43). Até esse ponto da cascata, o epitélio da gastrite atrófica e da metaplasia intestinal permanece bem diferenciado, mantendo-se a relação núcleo-citoplasma e arquitetura tecidual. A dinâmica do processo mostra uma transformação fenotípica gradual (44). Este processo que geralmente dura algumas décadas, é progressivo. Nos estágios iniciais, os fatores ambientais parecem ser importantes, mas com o passar do tempo, as alterações nas células tronco tornariam o processo independente destes fatores (45). Em alguns pacientes com metaplasia intestinal incompleta um leve grau de atipia nuclear e distorção arquitetural são observados, levando alguns investigadores a considerar a metaplasia incompleta do tipo colônico (tipo III) como uma forma de displasia (46), o que é indicativo da importância que alguns autores dão a esse estágio do processo evolutivo.

As alterações fenotípicas enumeradas são reflexos das alterações genotípicas e epigenéticas. As múltiplas alterações no processo da carcinogênese gástrica ocorrem nos oncogenes, nos genes supressores de tumor, nos reguladores do ciclo celular, nas moléculas de adesão intercelular, nos genes de reparo do DNA e na instabilidade genética e também na ativação da telomerase. As combinações possíveis de alterações diferem no câncer gástrico intestinal e no difuso, sabendo-se que as rotas carcinogénicas são distintas (47).

No processo do carcinoma intestinal a infecção pelo *H. pylori* pode ser um forte estímulo para as várias alterações que vão levar à metaplasia intestinal. Uma das alterações é a transcrição anormal do gene *CD44*. Na evolução para o carcinoma gástrico difuso o *H. pylori* também teria um papel importante inicial.

A extensão da MIG também parece estar relacionada com o risco de câncer. Cassaro *et al.* (48) estudaram uma população de alto risco para câncer com a intenção de

analisar esta relação. Avaliaram 68 pacientes da Colômbia com câncer gástrico e compararam com 67 controles. O estômago foi mapeado com 12 biópsias: na pequena curvatura (2 biópsias no antro e 2 no corpo); na grande curvatura (3 no antro e 4 no corpo); e uma na cárdia. Verificaram quatro padrões topográficos da MIG: 1) Focal: são focos de metaplasia intestinal em pequeno número, mais frequentemente na pequena curvatura nas proximidades da incisura angular. Este tipo foi encontrado em 14 casos de câncer e em 16 controles. 2) Antro-predominante: mais no antro da incisura ao piloro e verificado em 7 pacientes com câncer e 6 controles. 3) Magenstrasse, palavra alemã que designa a região do piloro à cárdia pela pequena curvatura e que estaria comprometida pela MIG. Este aspecto foi encontrado em 25 pacientes com câncer e 4 controles. 4) Padrão difuso que envolve a maior parte da mucosa gástrica com exceção do fundo. Este tipo foi encontrado exclusivamente em 13 pacientes com câncer. Os tipos Magenstrasse e difuso tiveram OR para câncer de 5,7 e 12, respectivamente. Estes tipos tiveram o comprometimento mais extenso e, relacionado a isto, tiveram mais MIG do tipo III. Em populações de alto risco para câncer gástrico, a extensão da MIG se correlaciona com a presença do tipo incompleto e está significativamente associada ao câncer gástrico.

Um ponto importante pendente é se a metaplasia intestinal pode ser revertida após a eliminação do *H. pylori* (42). Várias alterações genéticas e epigenéticas são verificadas na metaplasia intestinal. Mutações em TP53 têm sido detectadas em 50% das MIG adjacentes ao câncer e diminuição da expressão de CDX2/CDX1, conforme a progressão na carcinogênese gástrica (49,50,51). Além disso, a expressão da ciclooxigenase-2 é discreta no estômago normal, mas eleva-se na gastrite pelo *H. pylori* e tem uma forte expressão na MIG. Este fato pode estar relacionado com a alteração da cinética celular quando a proliferação se mantém e a apoptose diminui, favorecendo o acúmulo de células e, possivelmente, a formação de neoplasia (42,49). A telomerase está mais expressa no câncer gástrico e na MI, indicando um papel facilitador na carcinogênese (52,53).

Outras alterações em marcadores genéticos também são detectadas na metaplasia intestinal gástrica como, por exemplo, em *p16*, *p53*, perda de E-caderina, DAP-quinase, THBS1 e TIMP-, CDX1/2, instabilidade de microssatélites em MIG (54,55,56,57,58,59). A ativação de EGFR e ERBB2 pela infecção com *H. pylori* causando sobrevida de

células epiteliais gástricas com DNA lesado na MIG também foi constatado e é sinal para iniciação da carcinogênese gástrica (60).

As células do câncer gástrico expressam aumento de amplo espectro de fatores de crescimento e citocinas e destes, TGF α e receptor-1 do fator de crescimento epidérmico (EGFr-1), estão relatados com MIG. Expressão aumentada da ciclina D2 e diminuição da p27 são detectadas na MIG- *H. pylori* (61).

Apesar da forte ligação *H. pylori*-câncer gástrico, falta a evidência clara de que a erradicação da bactéria previna o câncer. Estudos para demonstrar tal benefício são difíceis, devido ao grande número de pessoas que deveriam ser acompanhadas e ao longo tempo deste acompanhamento. Uma outra maneira de responder à questão da relação *H. pylori*-câncer gástrico é estudar objetivos secundários, como o efeito do tratamento nas alterações pré-malignas, atrofia e MIG (42,62). Aqui também há dados conflitantes, em razão da inconsistência da interpretação dos dados histológicos, dos erros de amostragem e das diferenças das populações estudadas. Muitos estudos feitos no Japão revelam um curso favorável destas alterações após a erradicação. Uemura *et al.* (4) relatam uma melhora significativa na metaplasia do corpo e do antro após 6 meses da erradicação do *H. pylori*. Em outro estudo, a severidade da MI melhorou em 28/46 (61%) dos pacientes após um ano.

Correa *et al.* realizaram na Colômbia um grande estudo randomizado controlado com placebo em 976 pacientes. Verificaram a relação do *H. pylori* com alterações pré-malignas e seu aumento seqüencial (atrofia e MIG) e câncer (62,63).

Em estudo na China, foram acompanhados pacientes com *H. pylori* que receberam tratamento anti-*H. pylori* ou placebo, sendo acompanhados por um ano. Ao fim de 5 anos, os autores verificaram que nos pacientes erradicados a progressão da MI foi significativamente reduzida e com redução da atrofia, sugerindo que a erradicação do *H. pylori* reduz a progressão da MIG. E no subgrupo dos pacientes que não apresentavam MIG, houve significativamente menos casos de câncer gástrico (64).

A metaplasia intestinal gástrica é uma alteração fenotípica resultante de mutação somática em células tronco ou alterações epigenéticas e, eventualmente, estas são irreversíveis a despeito da eliminação do *H. pylori*. As alterações gástricas, no entanto, do meio ambiente gástrico – associadas à eliminação do *H. pylori* e que possibilitam a

resolução da inflamação, a eliminação das lesões do DNA e a redução da proliferação – podem ser mais importantes na prevenção do câncer gástrico do que a reversão da MI (42). Neste aspecto, vale a pena lembrar alguns trabalhos que relatam a alteração de marcadores envolvidos na carcinogênese após a erradicação do *H. pylori*. Redução da expressão da ciclina D2, o aumento da p27, redução na proliferação (Ki67) (61).

Na presente pesquisa, avaliamos o comportamento da CD44v6 nos casos com MIG antes e após a erradicação do *H. pylori* e também naqueles pacientes em que a bactéria não foi eliminada.

2.3 CD44

A CD44 designa uma família de glicoproteínas amplamente distribuídas na superfície celular com várias funções, mas basicamente é uma molécula de adesão celular e sinalização (65,66), ligada ao citoesqueleto celular. Expressada por vários tipos de células, a CD44 está implicada na interação célula-célula ou célula-matrix extracelular. O gene está localizado no cromossomo 11p13, tem 20 exons (Figura 1), sendo 10 expressos constitutivamente para formar a proteína CD44 padrão (CD44s, s de standard) que emprega os exons 1 a 5 e 16 a 20. Outras proteínas podem ser expressas como várias isoformas geradas pelo processamento alternativo dos exons 6 a 15. A isoforma mais comum é a isoforma padrão (standard) de 90-kd (CD44s) e está presente em uma variedade de tecidos, incluindo o epitelial e o linfematopoiético. As outras isoformas podem resultar em um número muito grande de diferentes combinações (Figuras 1 e 2) (67,68).

A relação da CD44 com câncer fez do pré-mRNA CD44 um modelo atrativo. Os exons v8, v9 e v10 são preferentemente expressos pelas células epiteliais. As outras isoformas são variantes complexas (CD44v) que incorporam combinações de exons que são expressadas variavelmente e incorporados na base que é o CD44s (68). Embora as

isoformas CD44v estejam presentes em muitas células epiteliais através do corpo humano, a expressão inapropriada e abundante destas moléculas observada numa variedade de tumores tem sido confirmada tanto pela análise da proteína como do mRNA como, por exemplo, em câncer gástrico, de colon, de mama, de útero, de bexiga e de pulmão (69,70). Estas observações sugerem que a avaliação da expressão do gene CD44 poderia ser útil no diagnóstico de tumores e avaliação prognóstica (71,72,73,74,75,76,77,78).

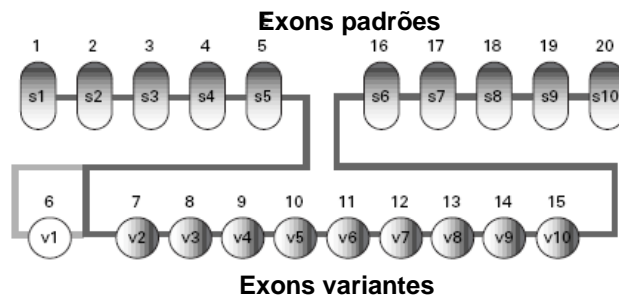


Figura 1. Diagrama esquemático da estrutura do gene CD44. Os exons padrões (s1-s10) codificam a isoforma protéica padrão, CD44s, expressa por praticamente todas as células. Combinações de exons variantes (v1-v10) podem ser processadas alternativamente entre s5 e s6 para codificar isoformas variantes, CD44v. Diferentemente do gene murino, o éxon 6 (v1) do gene humano contém um stop códon e não é normalmente incluído na CD44 mRNA (Ponta H et al. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Mol Cell Biol* 2003;4:33-45)(67).

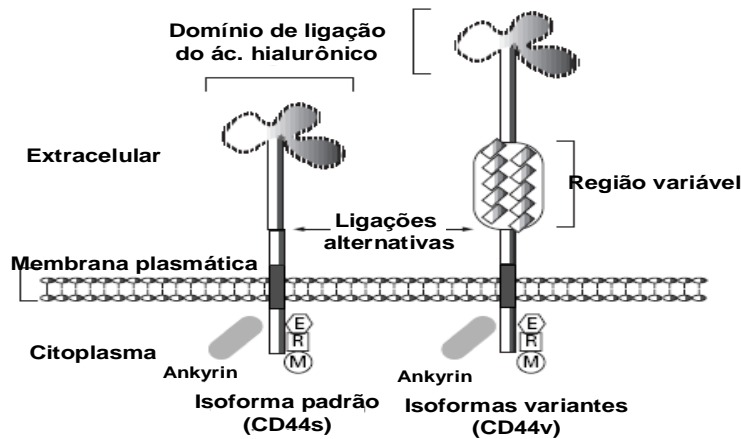


Figura 2. Estrutura da proteína CD44.

A isoforma padrão, CD44s, liga seu principal ligante, o ácido hialurônico, pelo N-terminal, no domínio extracelular distal. A inclusão de combinações de exons variantes (v1-v10) no domínio extracelular pode alterar a afinidade da ligação pelo ácido hialurônico e proporcionar interações com ligantes alternativos. A molécula interage com o citoesqueleto através da ligação com a ankirina e EMR (ezrin, radixin, moesin) na porção citoplasmática (67).

A CD44v6 tem sido relacionada com a progressão e metástases do câncer gástrico (80,81) e também foi detectada em metaplasia intestinal. Gulmann e col (80) verificaram um significativo aumento sequencial na expressão da CD44v6 desde a mucosa normal e da com MI até a mucosa não envolvida adjacente ao tumor com ou sem MI. Também verificaram a presença do CD44v6 em 5% da amostra de pacientes sem metaplasia e de 15% a 20% nos pacientes com metaplasia (80,82). O aumento mais importante foi de mucosa normal para MI adjacente ao tumor. Os achados sugerem que a expressão alta da CD44v6 é um fenômeno tardio na transformação da MI em displasia/câncer, tratando-se de um bom marcador do risco de câncer em pacientes com MI.

O produto do gene CD44 – isoforma CD44v6 – pode ser pesquisado por técnica padrão de imunistoquímica, o que a torna um método exequível em nosso meio (70).

As proteínas CD44 interagem com vários ligantes diferentes: hialuronato, fibronectina, colágenos tipos I e IV, serglicina e osteopontina. Há, no entanto, poucos exemplos do significado fisiológico destas interações, até porque este é um campo novo nas investigações de um modo geral. Um campo que mostra ações importantes da CD44 é o que confere propriedades migratórias às células. Por exemplo, células de fibroblastos em cultura adquirem capacidade migratória quando incubadas com CD44 e que a proliferação de queratinócitos e a cicatrização de feridas cutâneas depende da CD44 e sua interação com o hialuronato. Há trabalhos sugerindo a participação importante da CD44 na transdução do sinal extracelular, na sua função reguladora nos tecidos embriológicos, no desenvolvimento dos membros, e na função de certas proteínas CD44v durante a embriogênese na apresentação de fatores de crescimento nos locais de comunicação epitélio-mesênquima (65). Além disso, cultura de células adquirem capacidade de metastatizar após incubação com CD44v.

A CD44v6 tem sido relacionada com câncer gástrico. Dämmrich *et al.* (71) estudaram a expressão desta proteína em tumores gástricos do tipo intestinal e do tipo difuso e sua importância para a disseminação metastática linfogênica. Verificaram que a CD44v6 era mais expressada nos adenocarcinomas gástricos do tipo intestinal que no tipo difuso (92% x 17%) e na infiltração linfonodal relacionada com expressão de CD44v6, sendo que no tipo difuso-negativo, os linfonodos comprometidos expressavam v6. Notaram também que a expressão do mRNA confirmou os dados da imunoistoquímica. Além disso, as similaridades fenotípicas da expressão da v6 entre MIG e câncer do tipo intestinal, mas não com o tipo difuso, podem apoiar a hipótese de Pelayo Correa. A CD44s tem papel importante na adesividade da células ao seu meio-ambiente. Especulase que a perda desta adesividade possa ter um papel importante na cascata metastática (83).

Vários anticorpos humanos específicos para as variantes do CD44 recentemente tornaram-se disponíveis. Porém, ainda falta uma análise detalhada da sua presença nos diversos tecidos e estágios de malignização (67).

3 JUSTIFICATIVA

A metaplasia intestinal gástrica é reconhecida como lesão precursora (pré-maligna) para o câncer gástrico. A sua detecção, no entanto, não tem conduzido a um cuidado maior destes pacientes, não havendo também condutas estabelecidas para um acompanhamento. Essa discrepância se deve ao fato de a metaplasia intestinal gástrica ser um achado frequente, da ordem de 20% em adultos dispépticos crônicos (84,85), e o câncer gástrico ser um evento raro, sendo difícil recomendar o exame endoscópico de controle em todos estes pacientes com o objetivo de detectar uma neoplasia precoce.

Na presente tese, discute-se a utilidade do estudo imunoistoquímico da CD44v6 nos casos de MIG como possível fator de indicação para um acompanhamento mais atento destes pacientes.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Principal

Verificar a expressão de CD44v6 na metaplasia intestinal gástrica e se a erradicação do *H. pylori* altera a sua expressão.

4.2 Objetivos Específicos

Pesquisar a expressão por imunistoquímica da CD44v6 nos pacientes com *H. pylori* com e sem metaplasia intestinal gástrica e nos pacientes sem *H. pylori*.

Avaliar em qual destes grupos a CD44v6 tem maior expressão.

Avaliar e correlacionar a prevalência da MIG na população portadora de *H. pylori* e na população sem a bactéria.

Avaliar a média de idade dos pacientes com MIG e correlacionar com aqueles do HEROES sem MIG e aqueles sem *H. pylori*.

Avaliar a extensão e o tipo de MIG e correlacioná-los entre si.

5 AMOSTRA E MÉTODO

A população analisada neste estudo foi captada da população dispéptica selecionada por meio de testes elaborados e conduzidos pelo programa HEROES (**H**elicobacter **E**radication **R**elief of **D**yspEptic **S**ymptoms), desenvolvido no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rio Grande do Sul, Brasil.

A seleção dessa população iniciou-se com um convite, anunciado na mídia, e com centenas de palestras realizadas no HCPA. Após, a palestra a pessoa que se incluía nas condições de quadro dispéptico e indicava seu desejo de participar do estudo era agendada a uma consulta médica para uma análise melhor do seu quadro. Se persistia o diagnóstico de dispepsia funcional, conforme os critérios de Roma III, a pessoa era encaminhada para exame endoscópico, avaliações nutricionais e psicológicas. Se o exame endoscópico não revelava lesão que descaracterizasse o diagnóstico base, o paciente era incluído no estudo. O HEROES é um estudo clínico, randomizado, duplo-cego para analisar o efeito da erradicação do *H. pylori* nos sintomas dispépticos de pacientes selecionados.

A presente pesquisa é um estudo aninhado no HEROES (GPPG 05-422). Os pacientes foram randomizados em 2 grupos, um recebendo tratamento anti-*H. pylori* e o outro, placebo. Acompanhados por um ano, cada paciente submeteu-se a uma endoscopia digestiva alta no início do estudo e outra no final, após 12 meses.

Na nossa pesquisa, estudamos os pacientes que nas biópsias do primeiro e/ou do segundo exame endoscópico tiveram metaplasia intestinal gástrica. Eles foram comparados com pacientes sem metaplasia com *H. pylori*, do HEROES, e sem metaplasia e sem *H. pylori*.

No exame endoscópico, realizaram-se biópsias gástricas: duas na grande curvatura do antro; uma na incisura angular; e duas na grande curvatura do corpo gástrico. Os pacientes identificados com metaplasia intestinal gástrica tornaram-se objeto deste estudo que analisou o comportamento da proteína CD44v6.

5.1 Critérios de Inclusão

- Pacientes do HEROES com MIG no antro, incisura angular ou corpo.
- Pacientes do HEROES sem MIG.
- Pacientes cujo único motivo para exclusão do HEROES foi serem negativos para *H. pylori*.

5.2 Critérios de Exclusão

- Analfabetismo funcional que inviabilize adequada compreensão dos objetivos do estudo e preenchimento dos questionários.
- Não aceitação em participar do estudo e/ou em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

5.3 PROCEDIMENTOS

5.3.1 Teste para detecção CD44v6 por imunistoquímica

O tecido após cortes histológicos foi colocado em lâmina silanizada e desparafinado. Para tal, foi colocado em estufa a 68-70°C por 1 hora para derreter a parafina e promover a fixação da amostra na lâmina. O material foi retirado da estufa e colocado em cuba com xilol por 5 minutos para dissolver a parafina. Após, foi colocado em cubas com álcool absoluto para retirar o xilol – 2 minutos cada banho em 4 cubas diferentes de álcool – e a seguir em cubas com água para retirar o álcool. Seguiu-se uma imersão em solução de recuperação.

As lâminas assim preparadas foram colocadas em tampão de recuperação com citrato pH 6,0 e levadas ao forno de micro-ondas em panela de pressão, fervendo por 5 minutos. Depois de retiradas do forno, foram lavadas em *phosphate buffered saline* (PBS) por três vezes. O bloqueio da peroxidase foi realizado com H₂O₂ 3% em álcool metílico e, após, incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. A lâmina é retirada e lavada novamente com PBS por três vezes.

Neste momento, foi feita a incubação da lâmina com o anticorpo primário monoclonal de camundongo, anti-humano, CD44v6 (NCL-CD44v6, clone VFF-7), Novocastra, 1:200, deixado durante a noite em refrigerador a 4 graus C. Na manhã seguinte, o material foi lavado com PBS (três vezes) e adicionado anticorpo primário Kit Advance Dako-HRP-link com incubação por 30 minutos. Novamente lavado com PBS (três vezes) e incubado com HRP-enzimático por 30 minutos. Lavado com PBS (três vezes) e incubado com DAB (enzima precipita e cora) por até 5 minutos. O material foi lavado com água destilada. A coloração de fundo foi feita com Hematoxilina de Harris (cora núcleo- arroxeadado) por 2 minutos. Após, lavou-se com água amoniacal (arroxeadado > azulado) e em água corrente. Processou-se, então, a desidratação com álcool etílico 5 minutos por quatro vezes, após imersão no xilol por duas vezes por 5 minutos, para clareamento. Finalmente, procedeu-se a montagem da lâmina com lamínula em solução de bálsamo sintético.

A interpretação dos resultados foi feita quanto à extensão da coloração e não nos ativemos à intensidade. No trabalho de Gulmann *et al.* (80) a intensidade não foi discriminativa. A extensão se refere à porcentagem de células epiteliais coradas que aumentou do epitélio normal até o epitélio com câncer. Aproximadamente, as porcentagens foram: epitélio normal 0 a 5%; epitélio com metaplasia intestinal 0 a 10 %; epitélio normal em peça com tumor 0 a 20%; metaplasia intestinal adjacente ao tumor 10 a 35 %; e no tumor 0 a 65%.

Durante o exame endoscópico foram obtidos dois fragmentos do antro, dois a três centímetros antes do piloro na grande curvatura, um da incisura e dois do corpo.

5.3.2 Coloração das lâminas para estudo histopatológico

As lâminas foram coradas pelo H&E (hematoxilina-eosina), com Alcian-Blue 2,5 e com HID (high iron deamine) para caracterizar as MIG em tipos I, II e III. Cada paciente teve de 3 a 6 lâminas por exame, dependendo se a metaplasia foi detectada em um ou dois locais, mais a lâmina para o estudo IHQ.

A análise do tipo de MIG foi feita conforme Jass e Filipe: PAS nas células gástricas e AB nas células caliciformes é diagnóstico de MIG tipo I. Se a célula caliciforme se cora com HID, é MIG tipo II. Se a célula colunar da MIG se cora com HID é MIG do tipo III.

A extensão da MIG foi feita de acordo com Sistema atualizado de Sydney: até 25% da amostra comprometida com MIG a extensão é discreta; até 50%, moderada; e mais de 50%, acentuada.

Os casos controle foram corados para HE e para estudo imunoistoquímico.

5.3.3 Análises estatísticas e tamanho da amostra

Variáveis contínuas serão expressas como médias e desvios padrão e a comparação entre grupos será analisada usando-se o teste T para amostras independentes. Variáveis qualitativas serão expressas como percentagens e comparações analisadas usando o teste exato de Fisher. Todos os testes serão bi-caudais e chance de erro alfa inferior a 5% será considerado estatisticamente significativo. Análises multivariadas serão obtidas com regressão logística.

Para o cálculo do tamanho da amostra, foi considerado, com base na literatura (80), a presença do CD44v6 em 5% da amostra de pacientes sem metaplasia e de 15% a 20% nos pacientes com metaplasia. Para se obter um poder de 80% e um erro alfa inferior a 5%, a amostra calculada foi de 59 pacientes com metaplasia intestinal e de 294 sem metaplasia, num total de 353 pacientes. Com a positividade esperada do CD44v6, calcula-se que 15% a 20% dos 59 pacientes com MIG serão positivos (9 pacientes) e 5% dos controles serão positivos (15 pacientes). Após um ano, os pacientes submeteram-se novamente ao exame endoscópico, obtendo-se novas biópsias.

5.4 Considerações Éticas

Essa pesquisa foi aprovada pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, obtendo o número 09-034.

Conforme já mencionado, este estudo encontra-se aninhado no HEROES –GPPG 05-422, já possuindo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (GPPG/HCPA).

6 RESULTADOS

O grupo selecionado para o HEROES, continha 642 pacientes, sendo 424 com *H. pylori* e 218 pacientes sem a bactéria, sendo, por isso, excluídos da pesquisa. No grupo total de 642 pacientes (424 com a bactéria), 92 tinham MIG (14,4%). Na análise dos grupos em separado, 77 pacientes com MIG tinham a bactéria e 15 pacientes, não (18,2% X 6,9%). Esta diferença encontrada quanto a presença da MIG, que foi estatisticamente significativa, relacionou fortemente a infecção à presença da MIG ($p < 0,001$) (Figura 1).

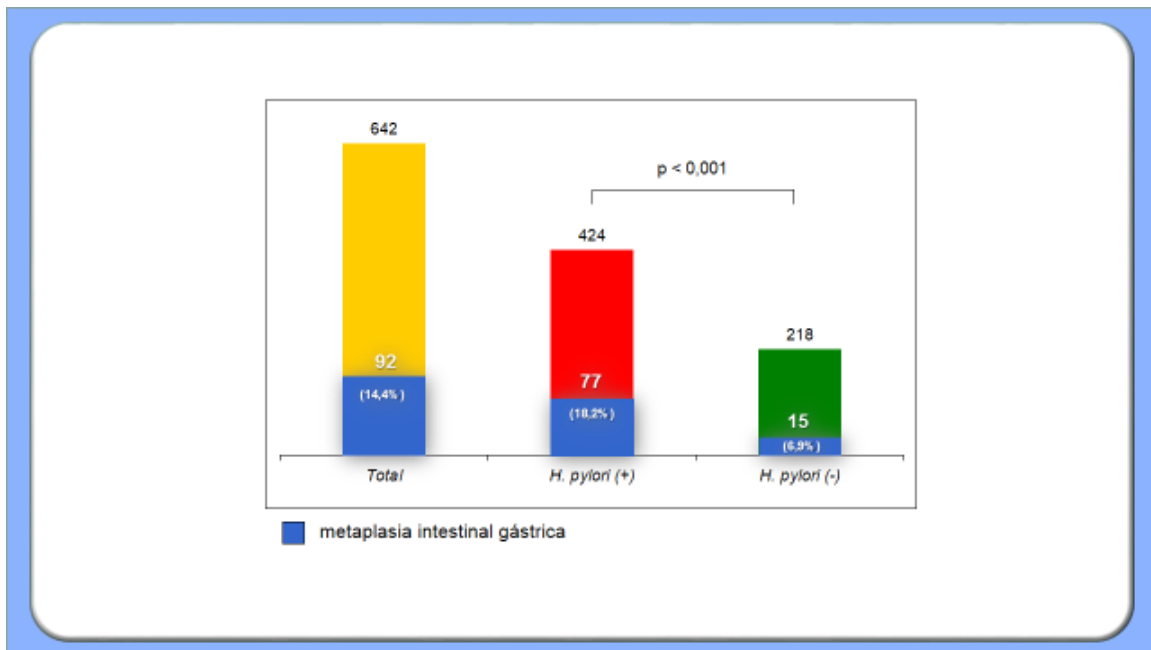


Figura 1- Prevalência de MIG em adultos dispépticos.

Dos 424 pacientes, 404 pacientes foram selecionados para o HEROES (17 pacientes se negaram a participar e três pacientes excluídos por erro de randomização).

Estes grupos foram analisados quanto ao sexo e idade. Os pacientes que efetivamente entraram no HEROES foram de 404, com média de idade de 45,3. A presença de pessoas do sexo feminino foi de 320 e 84 do sexo masculino; a média de idade conforme o sexo foi de 44,8 e 47,1, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1- Pacientes do HEROES

	Número	Média de Idade
Feminino	320	44,8
Masculino	84	47,1
Total	404	45,3

Tabela 2-Pacientes do HEROES sem MIG

	Número	Média de Idade
Feminino	264	44,3
Masculino	65	45,3
Total	329	44,5

Esta distribuição por idade e sexo entre os pacientes do HEROES e dos grupos por nós avaliados é muito semelhante.

Dos 77 pacientes iniciais com MIG, dois pacientes estavam no grupo dos pacientes que foram excluídos (Tabela 3), dois blocos de parafina não foram encontrados e em 17 pacientes, não apareceu MIG nos recortes, possivelmente por se tratar de lesão focal (Tabela 7). A população por nós estudada somou 56 pacientes adultos dispépticos com MIG e *H. pylori*, totalizando 584 lâminas (39 casos em um local e 17 casos com metaplasia em dois locais) (Tabelas 11 e 12), incluindo o estudo imunoistoquímico.

Tabela 3- Pacientes do HEROES com MIG.

	Número	Média de Idade
Feminino	56	47,3 (18-75)
Masculino	19	53,1 (40-70)
Total	75	48,8

A distribuição por sexo e a média de idade dos pacientes estudados com MIG está mostrado na Tabela 4.

Tabela 4- Pacientes do HEROES *H. pylori* + com MIG.

		Média de ID	Variação	DP
Feminino	41	49,1	19-75 anos	
Masculino	15	55,5	44-70 anos	
Total	56	50,8		11,6

p=0,779

Selecionamos 2 grupos para controle. Um pareado do estudo HEROES e sem MIG (Tabela 5) e outro pareado do grupo que não participou do HEROES apenas pelo fato de não ter a bactéria (Tabela 6) cujos números são mostrados nestas tabelas.

Tabela 5- Pacientes do HEROES *H. pylori* + sem MIG.

		Média de ID	Variação	DP
Feminino	57	47,1	18-73 anos	
Masculino	18	51,7	38-68 anos	
Total	75	48,2		11,8

p=0,779

Tabela 6- Pacientes sem *H. pylori* e sem MIG.

		Média de ID	Variação	DP
Feminino	55	46,3	18-71 anos	
Masculino	13	50,5	27-69 anos	
Total	68	47,1		12,5

p=0,779

Tabela 7- Pacientes excluídos da análise por ausência de MIG no exame anatomopatológico (blocos não enviados-2; sem MIG no recorte-17).

	Número	Média de Idade
Feminino	15	42,3 (18-60)
Masculino	4	44,0 (40-48)
Total	19	42,6

p=0,779

A análise estatística entre os grupos representados nas tabelas 4 a 7 não mostra diferença estatística, quando comparados por sexo entre os grupos ou idade (ANOVA p=0,189; qui-quadrado p= 0,779).

Os pacientes com MIG foram agrupados conforme o tipo da metaplasia encontrada e o sexo (Tabela 8). No teste do qui-quadrado não houve diferença estatisticamente significativa (p=0,192).

Tabela 8- Tipo de MIG conforme o sexo.

TIPO SEXO	I	II	II	Total
FEM	25	9	7	41
MASC	7	2	6	15
Total	32	11	13	56

p=0,192

Os pacientes foram agrupados pelo tipo de MIG encontrado e a extensão da metaplasia (Tabela 9) e não houve relação estatisticamente significativa entre estas variáveis (qui-quadrado p=0,162).

Tabela 9- Extensão conforme o tipo de MIG.

EXTENSÃO \ TIPO	Mínima	Moderada	Acentuada	Total
I	19	9	4	32
II	7	2	2	11
III	3	6	4	13
Total	29	17	10	56

p=0,162

Avaliamos também o tipo de MIG conforme o local do achado da metaplasia (Tabela 10) para vermos se havia um local mais propenso a mostrar um tipo especial de metaplasia. Não encontramos variação significativa (qui-quadrado p=0,379).

Tabela 10- Tipo de MIG conforme o local.

Local \ Tipo	A	I	C	AI	AC	IC	Total
I	13	7	4	6	0	2	32
II	8	1	0	2	0	0	11
III	5	1	0	5	1	1	13
Total	26	9	4	13	1	3	56

A=antro; I=incisura angular; C=corpo; AI=antro e incisura; AC=antro e corpo; IC=incisura angular e corpo.

p=0,379

Pelos dados da Tabela 10 constatamos que dos 56 casos o diagnóstico da presença de metaplasia intestinal no estômago pode ser feito na grande maioria dos casos (52/56; 93%) com biópsias do antro e da incisura angular. Além disso, como mostrado nas Tabelas 11 e 12, os nossos casos de MIG foram mais comuns no antro do que na incisura. Detectamos MIG no antro em 40 ocasiões, na incisura angular em 23 e no corpo em 7 ocasiões. A maioria dos nossos casos de metaplasia, portanto, foram diagnosticados com as biópsias do antro (40/56; 71%).

Tabela 11 – Casos de MIG detectados em um local.

Tipo Local	I	II	III	Total
A	13	8	5	26
I	7	1	1	9
C	4	0	0	4
Total	24	9	6	39

A=antro; I=incisura angular; C=corpo.

Tabela 12 – Casos de MIG detectados em dois locais.

Tipo Local		I	II	III	Sem MIG	Com MIG
A-I	A	8	2	3	0	13
	I	7	2	2	2	11
A-C	A	0	0	1	0	1
	C	0	0	0	1	0
I-C	I	2	0	1	0	3
	C	3	0	0	0	3
		20	4	7	3	

A-I=antro e incisura; A-C= antro e corpo; I-C= incisura angular e corpo.

Os nossos achados na lâmina com o diagnóstico final dos tipos de MIG foram variados. Uma lâmina que teve uma ou mais glândulas de metaplasia intestinal do tipo II ou III, muitas vezes apresentava borda em escova (Br) ou células de Paneth (Pa) em outras glândulas metaplásicas na mesma lâmina (Tabela 13). Estudamos a relação entre a presença de Br e de Pa com o diagnóstico final e não encontramos relação significativa, isto é, o achado de um destes fatores não excluía o diagnóstico de metaplasia do tipo incompleto (qui-quadrado $p=1,000$ e $p=0,774$, respectivamente).

Tabela 13- Achados de marcadores de MIG encontrados na mesma lâmina anatomopatológica.

	Pa	Br	PaBr	AB	HID	Total
I	0	7	21	4	0	32
II	0	1	9	1	0	11
III	0	4	7	1	1	13
Total	0	12	37	6	1	56

Pa= célula de Paneth; Br= borda em escovada; AB= Alcian blue; HID=high iron diamine. Qui-quadrado para Br p=1,000 e para Pa p=0,774).

Revelaram-se bastante interessantes os achados em que na mesma glândula do tipo incompleto, havia marcadores do tipo completo, isto é, borda em escova (Br) e/ou célula de Paneth (Pa) e isto é relacionado na Tabela 14.

Tabela 14 – Elementos de metaplasia completa na mesma glândula de metaplasia incompleta.

Nº da lâmina	Tipo de MIG	Br	Pa
5.1	III	+	-
52.3	II	+	-
69.1	II	+	+
69.2	II	+	-
96.1	II	-	+
105.1	III	+	-
180.1	II	+	-
184.1	II	+	-
184.2	II	+	-
239.2	III	+	+

Br= borda em escova; Pa= célula de Paneth.

A avaliação do grau de concordância entre os dois patologistas quanto ao diagnóstico dos tipos de metaplasia intestinal gástrica teve os seguintes resultados: a porcentagem de concordância foi de 83% e o índice de concordância kappa foi igual a 0,732 (p<0,001), considerado elevado (Tabela 15).

Tabela 15 - Grau de concordância entre os patologistas no diagnóstico de MIG.

Diagnóstico	Patologista A	Patologista B
Sem MIG	65	67
MIG tipo I	90	70
MIG tipo II	9	16
MIG tipo III	8	19
Total	172	172

Concordância observada de 83%/ kappa = 0,732 (p<0,001).

No estudo das lâminas de IHQ para CD44v6, como os resultados das lâminas foram negativos, os patologistas concordaram entre si em todos os casos.

7 DISCUSSÃO

A população analisada neste estudo foi captada da população dispéptica adulta do programa HEROES (**H**elicobacter **E**radication **R**elief of **D**ysp**E**ptic **S**ymptoms) que é um estudo clínico, randomizado, duplo-cego para estudar o efeito da erradicação do *H. pylori* nos sintomas dispépticos nos 404 pacientes selecionados. Assim, esta Tese se aninha neste trabalho maior (86,87,88). A decisão de estudar a metaplasia intestinal gástrica deve-se ao seu referido potencial pré-maligno. No grupo total de 404 pacientes detectamos 75 pacientes com MIG (Tabelas 1 e 2). No estágio anterior da entrada dos pacientes no HEROES, foram selecionados após a primeira endoscopia 642 pacientes, destes, 218 pacientes não estavam infectados pelo *H. pylori* (HE, Giemsa e teste da urease), sendo excluídos por esta única razão. Verificamos nesta amostra uma clara relação entre a presença do *H. pylori* e de MIG. A análise revela que 18,2% (77/424) dos portadores de *H. pylori* tinham metaplasia, comparado com apenas 6,9% (15/218) dos casos sem a presença da bactéria ($p < 0,001$). A prevalência da MIG no grupo total foi de 14,4% (Figura 1). Estes dados permitem comparar este achado com a literatura mundial.

Na Finlândia, pesquisadores analisaram 505 pacientes consecutivos (84). A frequência relativa de MIG foi de 19%, sendo 11% do tipo I, 4,4% tipo II e 2,8% do tipo III.

Em outro estudo, realizado na Suécia (85), Peterson *et al.* analisaram 475 pacientes dispépticos. Destes, 23% (109/475) dos pacientes apresentaram MIG. Nos pacientes com gastrite crônica, o *H. pylori* foi positivo em 40% e nos pacientes com MIG em 80%. Outros estudos relatam uma frequência relativa da MIG entre 15,3% a 35,2 % (62,90,91,92,93,94), revelando a incidência maior entre os pacientes com a bactéria.

Na comparação com a literatura, pudemos avaliar que a nossa prevalência de MIG é comparável, mas está na faixa mais baixa, indicando uma prevalência menor para MIG. Isto torna-se interessante, pelo menos quanto ao sexo masculino. A estimativa do INCA, para 2012, coloca a população brasileira como risco médio para câncer gástrico, porém a

prevalência da MIG do nosso estudo aponta para índices de países com baixo índice de câncer gástrico (95). Acresce-se ao fato que está bem abaixo de uma população de alto risco como Nariño, Colômbia, que é de 59,6%, enquanto que a população costeira da Colômbia tem prevalência de MIG de 12,9% e é zona de baixo risco para câncer (62).

Os pacientes com metaplasia intestinal gástrica (Tabela 4) foram pareados por sexo e idade com pacientes do HEROES sem metaplasia (Tabela 5) e com aqueles pacientes que foram excluídos por não terem *H. pylori* (Tabela 6). Além disso, os pacientes com MIG e que não foram analisados (Tabela 7) também foram incluídos nesta análise para avaliarmos se a exclusão teria alterado alguma proporção avaliada. A análise estatística entre estas tabelas não revela diferença estatística elas quanto ao sexo (ANOVA $p=0,173$) e sexo e idade (ANOVA $p=0,607$).

Os pacientes foram avaliados se o sexo tinha influência na ocorrência (tabela 4) e no tipo de MIG (Tabela 8). A comparação com o HEROES sobre a proporção entre os sexos foi semelhante à variação que encontramos neste grupo com MIG, portanto sendo igual. Quanto ao tipo da metaplasia, no teste do qui-quadrado não foi evidenciada qualquer tendência ($p=0,192$). Os dados da literatura mostram que não há diferença da presença da metaplasia conforme o sexo. de Vries *et al.* (95) na Holanda, analisam quase 100.000 pessoas do registro nacional, verificaram que a proporção entre os sexos da MIG era a mesma. Outro estudo menor que avaliou 84 pessoas de origem hispânica, nos Estados Unidos, também não detectou diferença entre os sexos quanto à presença da MIG (96). Isto também foi registrado nos estudos de Nariño, Colômbia (62) e no norte da Itália (90).

Outra ponta da análise foi o estudo da relação possível entre a extensão e os tipos da MIG (Tabela 9). Analisamos estes dados pelo teste do qui-quadrado e não encontramos relação ($p=0,162$).

Estudou-se também a possibilidade de relacionar o local do achado com a indicação do tipo de MIG (Tabela 10). Mais uma vez a comparação dos dados não mostrou relação entre as variáveis pelo teste do qui-quadrado ($p=0,379$). Sobre este ponto não encontramos dados na literatura.

Alguns autores (32,91,92) consideram que o local onde a MIG é mais prevalente é na incisura angular. No presente estudo o local preferencial da metaplasia foi o antro

gástrico (Tabelas 11 e 12). Dos 56 pacientes, a MIG era exclusiva no antro, em 26 casos, (26/56; 46%), e no antro e em outro local (incisura ou corpo), em 40 dos 56 casos (71%). Por outro lado, a detecção exclusiva na incisura ocorreu em 9 casos (9/56; 16%) e na incisura e mais outro local (antro ou corpo) em 25 dos 56 casos (45%). Nestas comparações a localização antral foi a mais frequente. Se considerarmos a coleta de material no antro e na incisura angular, as duas localizações mais frequentes, conseguimos diagnosticar 93% (52/56) dos casos de MIG, pois metaplasia exclusivamente no corpo foi detectada apenas em 4 ocasiões (7%) e em todas foi MIG tipo I.

Para verificar se o achado de borda em escova ou células de Paneth excluía ou tornava mais difícil o diagnóstico de outro tipo de MIG que não o tipo I, procedemos ao cruzamento destes dados e analisamos também pelo qui-quadrado. Este cruzamento não mostrou alteração estatística, tanto para borda em escova (Br) ($p=1,00$), quanto para células de Paneth (Pa) ($p=0,774$). Isto quer dizer que o achado destas alterações não exclui a possibilidade de tratar-se de MIG do tipo incompleto (Tabela 11). Este dado é importante, pois mostra a necessidade de colorações especiais para tipificar a MIG, já que, em alguns dos nossos casos, na mesma glândula que apresentava elementos de MIG incompleta, também havia elementos do tipo completo, aparecendo borda em escova e/ou células de Paneth (Tabela 14). Constatamos, além disso, que a alteração incompleta era em parte da amostra examinada na lâmina e que, ao lado de MIG dos tipos II e III, havia glândulas do tipo completo (Tabela 13). O diagnóstico diferencial entre MIG completa e incompleta pode ser de auxílio na prática clínica, lembramos, no entanto, que esta separação, apenas pelo HE, pode ser falha. Para explicarmos esta mescla entre os tipos de MIG e o achado de Br e Pa, relatamos os trabalhos de Tatematsu *et al.* (97,98,99) que consideram que a mucosa gástrica tenha seu fenótipo alterado para o intestinal, sendo que o estado de MIG incompleta seria intermediário e não ponto final na transformação. Estes autores ponderam que possa haver várias combinações entre os fenótipos gástrico e intestinal na mesma glândula. Inada *et al.* (97) e Tatematsu *et al.* (98) estudaram a MIG com vários marcadores por HQ e IHQ em peças de gastrectomias por tumores, para identificar as propriedades intestinais e gástricas da metaplasia intestinal e a dividiram em

tipo intestinal e tipo misto (intestinal + gástrico). Como resultado, revelaram um quadro mais complexo da MIG.

Estudos experimentais em ratos sobre a carcinogênese gástrica mostraram que, inicialmente, os marcadores são do tipo gástrico. A incidência de células tumorais do tipo intestinal aumenta com a progressão da lesão neoplásica. Células neoplásicas do tipo gástrico e intestinal podem ser vistas na mesma glândula, sugerindo transformação a partir da mesma célula tronco. As células tumorais neoplásicas do tipo intestinal nem sempre estão acompanhadas de MIG, sugerindo que a MIG não seja uma alteração preneoplásica para o carcinoma gástrico. Fenômeno similar foi descrito em cânceres gástricos em humanos, como se a expressão fenotípica da célula gástrica cancerosa fosse independente das alterações fenotípicas da mucosa gástrica adjacente (34,35,84,97,98).

Vários outros autores (5,6,7, 8,9,25,36,38,39,41,42,43,44,46,47,55,56,57,58,79, 100,101,102,103,104) acreditam que a MIG seja lesão pré-neoplásica e a cascata da carcinogênese gástrica de Pelayo Correa seria o modelo. Neste modelo a MIG do tipo III, incompleta, seria o estágio mais avançado da transformação e da desorganização arquitetural e genética (26,46,101,102).

Miwa *et al.*(104) analisaram a cinética celular da MIG na carcinogênese gástrica caracterizando sua zona proliferativa. Examinaram a incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) em 228 biópsias endoscópicas. Verificaram que a MIG apresentava a zona de proliferação semelhante à da mucosa duodenal, acrescentando que nos casos de MIG do tipo incompleto do tipo III a captação era verificada em toda a glândula, sendo um indício de ser o tipo mais imaturo e ter uma possível relação com a carcinogênese.

Cassaro *et al.* (105) estudaram 54 casos de MIG, 28 casos de lesões indefinidas para lesão neoplásica não-invasiva e 30 casos de lesões neoplásicas não-invasivas de baixo grau com marcadores moleculares nestas lesões pré-malignas envolvidas no espectro de várias etapas da carcinogênese gástrica. Avaliaram a renovação celular (Mib 1), a imortalização celular (hTERT mede a telomerase) e o bloqueio da apoptose (pro-caspase 3). Verificaram que estes marcadores aumentavam gradativamente a sua expressão. Para estes autores é prova que a MIG está comprometida com neoplasia não-invasiva, estando de acordo com o conceito de cancerização do campo (106,107,108) da mucosa gástrica.

Quanto ao diagnóstico da presença da MIG e a classificação entre os seus tipos a concordância entre os patologistas (Tabela 15) foi excelente ($\kappa = 0,732$). Alguns dados da literatura são comparáveis quando os patologistas são experts ($\kappa=0,91$) (109), mas menos quando os patologistas tem menor experiência ($\kappa=0,58$) como em outro relato ($\kappa=0,47$)(110).

A MIG é uma lesão com baixa especificidade para evolução para câncer, sendo o acompanhamento de todos os casos de MIG desnecessário. Seria, portanto, importante encontrar um marcador para separar os casos de metaplasia com baixo e alto risco de progressão maligna.

Dois artigos foram fundamentais para a escolha da proteína CD44 como marcadora para o nosso estudo. O primeiro deles é do grupo do Prof. Eiichi Tahara (47) sobre vias genéticas de câncer gástrico que mostra vários marcadores genéticos presentes nos tipos bem diferenciado e pouco diferenciado. Chamou nossa atenção o fato de transcritos aberrantes de CD44 estarem 100% presentes em ambos os tipos de cânceres. O segundo artigo de Gulmann *et al.* (80) que mostra a presença da CD44v6 em casos de metaplasia intestinal gástrica, sugerindo seu uso como marcador de transformação maligna. Analisa, retrospectivamente, a CD44v6 por IHQ em 154 casos de mucosa gástrica normal, 127 casos em mucosa com metaplasia intestinal e em 117 casos de gastrectomia por câncer, nestes sendo avaliadas a lesão e a mucosa longe desta. O aumento mais evidente da expressão foi da mucosa com MIG adjacente ao câncer. Concluíram que a expressão de CD44v6 é um fenômeno tardio na sequência MIG/displasia/câncer e que poderia ser um marcador útil nos pacientes com MIG e estaria de acordo com a teoria de cancerização de campo (107,108,109).

A avaliação imunohistoquímica da CD44v6 nos nossos casos de MIG (Figura 1), nos grupos controles do HEROES sem MIG e nos dos sem *H. pylori* resultou negativa em todas as amostras. Os controles das lâminas para a coloração de IHQ foram positivos e utilizamos amostras de carcinomas gástricos (Figura 2).

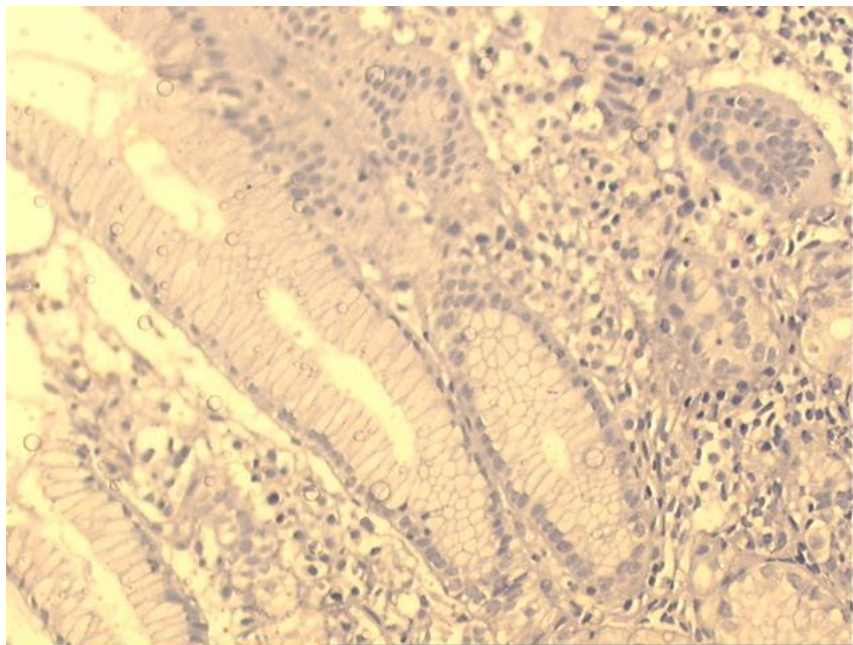


Figura 1 Caso IHQ anti-CD44v6 200x

Após uma primeira dificuldade com a técnica em si, característica do desenvolvimento de exames imunoistoquímicos novos, conseguimos uma coloração adequada e, nos cortes de controle com células tumorais de carcinomas gástricos, a membrana das células corou-se nitidamente.

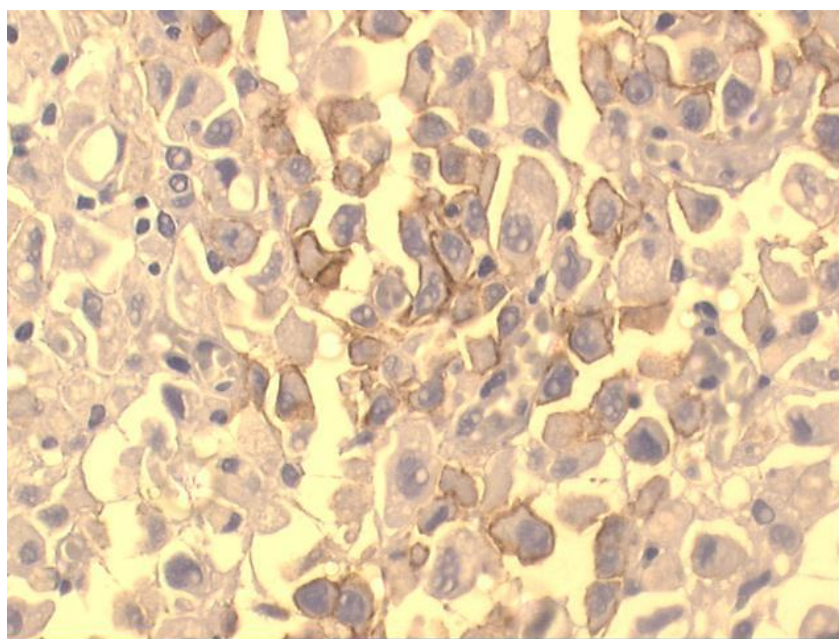


Figura 2 Controle IHQ anti-CD44v6 400x

A proteína CD44 é uma glicoproteína transmembrana amplamente distribuída e sua variante v6 está relacionada à invasão e metástase tumorais. Liang *et al.* (111) estudaram 59 pacientes com adenocarcinoma gástrico e incluíram como controles mucosa normal adjacente ao tumor. Verificaram positividade em 38 casos de tumor e 5 casos de mucosa adjacente ao tumor. A variante CD44v6 estava muito expressa nos tumores e bem menos nos controles. Pelos dados levantados, concluem que CD44v6 tem papel importante na transformação maligna do epitélio gástrico e quanto maior a progressão do tumor maior a sua produção.

A questão da origem do câncer gástrico é fundamental para a compreensão desta proteína de membrana. Um modelo de carcinogênese coloca a origem do câncer em células tronco tumorais. Estas são definidas como uma subpopulação especial (< 5% das células) e distinta de células tumorais que possuem a habilidade de iniciar o crescimento e manter a renovação celular do tumor. A sua molécula padrão (standard), a CD44s, é hoje utilizada como marcador de célula tronco. Alguns trabalhos mostram este seu papel no câncer gástrico. Takaishi *et al.* (112), analisando culturas de tecidos de câncer gástrico, identificaram por meio da CD44s células capazes de iniciar o câncer gástrico, pois formavam colônias esferóides na cultura e tinham habilidade de formar um novo tumor quando injetadas no estômago ou na pele de camundongos imunodeficientes, reproduzindo o tumor original. Quando a CD44s era bloqueada ou não expressa em uma cultura, estas células tinham sua evolução muito reduzida (112,113).

A CD44s, no entanto, não é marcador específico de célula tronco de tumor gástrico. Snyder *et al.* (114) estudaram a CD44v6 em células de carcinoma de mama. Os tumores humanos exibem heterogeneidade intratumoral em nível genético e epigenético, reconhecendo-se uma subpopulação denominada células tronco tumorais. Testaram a análise de CD44+/CD24 low para detecção destas células tronco tumorais em mama. As amostras em parafina de 48 tumores de mama foram estudados e verificou-se que o CD44v6 era mais acurado como marcador de células tumorais que o CD44s. A população

de células CD44v6 aumentou após a quimioterapia. Os autores concluem que as células que expressam a CD44v6 tem propriedades distintas e podem ser células tronco tumorais.

A CD44v6 está, portanto, relacionada com carcinomas, com marcação de células tronco tumorais e com presença em tecidos não neoplásicos, podendo ser um indicador do risco de malignização de um tecido (80,112,114,115,116,117,118).

Estes trabalhos nos mostram o potencial do emprego da CD44v6 como marcador de células tronco malignas e também em raras células normais e algumas pré-malignas.

A negatividade em todos os nossos casos não nos autoriza a confirmar uma relação direta, mas também não podemos dizer o contrário, pois são poucos casos estudados para uma generalização.

Vários autores classificam a MIG como lesão precursora do carcinoma gástrico, especialmente, do tipo intestinal (102,103,118,119,120,121,122,123,124) e, inclusive, com expressão da CD44 (125,126).

Os dados da literatura embasam, portanto, a nossa escolha da CD44v6 no presente estudo como marcadora de um provável risco maior de cancerização em MIG. O nosso resultado negativo pode ter algumas explicações.

O tamanho da amostra teria sido pequeno. Seria um erro B não identificado no nosso cálculo amostral, pois este foi de 59 pacientes e o nosso estudo foi de 56 pacientes. O trabalho de Gulman *et al.* pode ter exagerado no cálculo das positivities dos casos de MIG sem tumor associado, pois os resultados fornecidos foram apenas em gráfico de barras onde se deduziu que a positividade na mucosa normal seria de 5% e 15% na MIG em amostras sem tumor (80). Dämmrich *et al.* (71), por outro lado, encontraram 92% de positividade em casos de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal e igual porcentagem a MIG nas sua vizinhança e apenas 17% nos casos de câncer gástrico do tipo difuso. Higashikawa *et al.* (126) verificaram expressão fraca na mucosa gástrica normal, positividade maior na MIG e maior ainda nos carcinomas gástricos. Não notaram diferença entre a metaplasia intestinal completa ou incompleta quanto à expressão da CD44v6. Por outro lado, da Cunha CB *et al* (127), encontraram dados diferentes. Não encontraram CD44v6 na mucosa normal, mas aumento gradativo da MIG completa com 25% dos casos, na incompleta em 75% e em igual porcentagem na displasia. Já nos cânceres, detectaram positividade maior no tipo difuso (76%) do que no tipo intestinal

(50%). Estes dados mostram elementos conflitantes nos estudos, indicando que mais estudos sejam necessários para um melhor entendimento da expressão desta molécula.

A baixa prevalência da MIG na nossa população talvez reflita um baixo risco de câncer gástrico, fator que pode estar de acordo com a diminuição desta neoplasia no mundo, talvez acontecendo também no nosso meio.

Outras duas possibilidades, e estas são aventadas como perspectiva para novos trabalhos, é que a via carcinogénica na nossa população só altera a expressão da CD44 em estágios mais tardios do que o da MIG, isto é, quando o câncer já está instalado ou, ao contrário, os nossos casos estudados ainda estariam longe da transformação maligna e que, se eventualmente forem analisados novamente daqui algum tempo, alguns que já estivessem na via para câncer, poderiam passar a expressar a CD44v6 ainda na fase de MIG.

Liang *et al.* (111) não encontraram diferença entre o tipo de tumor se diferenciado ou indiferenciado, mas relacionaram com a profundidade da invasão, o grau de diferenciação e a presença de metástases linfonodais. Estes autores investigaram a mucosa gástrica normal proveniente de espécimes de ressecções cirúrgicas de tumores gástricos, concluindo que a expressão do CD44v6 é significativamente maior ($P < 0,05$) nas células malignas gástricas que na mucosa normal (5% x 64%).

Gotley *et al.* (116) estudaram por IHQ a CD44s e suas variáveis e RT-PCR e Northern blot os seus mRNA em 109 tumores de colon e na mucosa normal das peças ressecadas. Detectaram a CD44v6, entre outras, em alta porcentagem na mucosa normal, especialmente na região das criptas e em proporção muito semelhante em pólipos adenomatosos e nos tumores. (Em 6 casos houve positividade na mucosa normal, mas não na tumoral adjacente o que não está de acordo com a hipótese de progressão). Concluem que há uma expressão quantitativamente maior das CD44s e suas variáveis nos tumores, mas não relacionam com a invasão, nem com um comportamento mais agressivo.

Higashikawa *et al.* (126) estudaram a transcrição de variantes da CD44 em tumores digestivos e em mucosa sem tumor pela técnica RT-PCR/Southern blot, encontrando positividade fraca para CD44v6 na MIG e intensa no câncer gástrico.

Yasui *et al.* (79) estudaram o comportamento da CD44v9 por IHQ em 170 adenomas e 478 adenocarcinomas gástricos e constataram positividade em 20 e 28% dos casos, respectivamente, sendo a intensidade da coloração bem mais forte nos carcinomas. Constataram positividade em alguns casos de MIG no terço inferior da glândula metaplásica.

Pelos trabalhos relatados, a maioria detectou positividade fraca da CD44v na MIG.

Pode ser que o clone do anticorpo escolhido não tenha maior expressão no nosso meio. Sugerem Gotley *et al.* (116), quanto às variáveis v8/9, que mostrou baixa positividade que pode refletir uma menor afinidade pelo anticorpo monoclonal 1E8 da Serotec, UK, utilizado, comparado com o usado por outros autores (os outros anticorpos também foram do mesmo laboratório). No nosso estudo utilizamos o anticorpo monoclonal da Novocastra e foram feitas diluições de 1:50, 1:100 e 1:200, sendo que esta última diluição foi a que teve melhor resultado, sendo a que corou a membrana celular mais nitidamente e a com menos marcação de fundo (background), isto é, do espaço intersticial e do citoplasma.

8 CONCLUSÕES

1) Os nossos casos foram todos negativos para CD44v6 e não vemos utilidade de usar este marcador no nosso meio no rastreamento dos casos de metaplasia intestinal gástrica que mereceriam um acompanhamento subsequente.

2) Biópsias do antro e da incisura angular detectaram quase a totalidade (93%) dos casos de metaplasia intestinal gástrica e isto pode ser uma indicação para a prática clínica. A MIG foi mais frequente no antro (71%) que na incisura angular (44%).

3) A distribuição da metaplasia intestinal gástrica entre os sexos seguiu a proporção no grupo estudado, concluindo-se que não há diferença entre os sexos.

4) Não encontramos alteração da frequência da metaplasia intestinal gástrica conforme a idade.

5) O achado de borda em escova ou células de Paneth não exclui que naquela lâmina haja glândulas metaplásicas do tipo incompleto.

6) Não houve relação entre o local da metaplasia intestinal gástrica e seu tipo.

7) Não houve relação entre extensão e tipo de metaplasia intestinal gástrica, isto é, mesmo com MIG mínima pode haver metaplasia incompleta.

8) A população estudada tem baixa frequência relativa de metaplasia intestinal gástrica (14,4%).

9 REFERÊNCIAS

- 1) Globocan 2008: Cancer incidence and mortality worldwide (<http://globocan.iarc.fr> último acesso em 17/8/2013).
- 2) Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathis C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Globocan 2008. *Int J Cancer*. 2010;127:2893-2917.
- (3) INCA - Estimativa 2012 (www.inca.gov.br).
- (4) Lambert R, Guilloux A, Oshima A, Pompe-Kirn V, Bray F, Parkin M, Ajiki W, Tsukuma H. Incidence and mortality from stomach cancer in Japan, Slovenia and the USA. *Intern J Cancer* 2001;97:811-818.
- (5) Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M *et al.* *Helicobacter H. pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345(11):784-789.
- (6) Järvi O, Laurén P. On the role of heterotopias of the intestinal epithelium in the pathogenesis of gastric cancer. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1951;29:26-44.
- (7) Laurén P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64:31-49. PMID: 14320675.
- (8) Morson BC. Carcinoma arising from areas of intestinal metaplasia in the gastric mucosa. *Br J Cancer*. 1955;9:377-385.
- (9) Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007;133:659-672.
- (10) Houghton J, Wang TC. *Helicobacter H. pylori* and gastric cancer: a new paradigm for inflammation-associated epithelial cancers. *Gastroenterology* 2005;128:1567-1578
- (11) Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade. *J Dig Dis* 2012;13:2-9. doi:10.1111/j.1751-2980.2011.00550.x.
- (12) Owen DA. Stomach. In: Sternberg SS. *Histology for Pathologists*. Raven Press 1992;533-545.
- (13) Lee ER Dynamic histology of the antral epithelium in the mouse stomach: I. Architecture of antral units. *Am J Anat* 1985;172:187-204.

- (14) Lee ER and Leblond CP. Dynamic histology of the antral epithelium in the mouse stomach: II. Ultrastructure and renewal of isthmal cells. *Am J Anat* 1985;172:205-224.
- (15) Lee ER. Dynamic histology of the antral epithelium in the mouse stomach: III. Ultrastructure and renewal of pit cells. *Am J Anat* 1985;172:225-240.
- (16) Lee ER and Leblond CP. Dynamic histology of the antral epithelium in the mouse stomach: IV. Ultrastructure and renewal of gland cells. *Am J Anat* 1985;172:241-259.
- (17) Nadler NJ. Analysis of gland cells behavior: Appendix to the dynamic histology of the antral epithelium in the mouse stomach. *Am J Anat* 1985;172:261-264.
- (18) Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. I. Identification of proliferative cell type and pinpointing of the stem cell. *Anat Rec* 1993;236:259-279.
- (19) Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. II. Outward migration of pit cells. *Anat Rec* 1993;236:280-296.
- (20) Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. III. Inward migration of neck cells followed by progressive transformation into zymogenic cells. *Anat Rec* 1993;236:297-313.
- (21) Karam SM. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. IV. Bidirectional migration of parietal cells ending in their gradual degeneration and loss. *Anat Rec* 1993;236:314-332.
- (22) Karam SM, Leblond CP. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach. V. Behavior of entero-endocrine and caveolated cells: general conclusions on cell kinetics in the oxyntic epithelium. *Anat Rec* 1993;236:333-340.
- (23) Graham YD, Genta RM, Dixon MF. *Gastritis*. Lippincott Williams & Wilkins 1999.
- (24) Dixon M. The components of gastritis. In: *Gastritis*. Ed Graham DY, Genta RM, Dixon MF. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 1999:51-66.
- (25) González CA, Sanz-Anquela JM, Gisbert JP, Correa P. Utility of subtyping intestinal metaplasia as marker of gastric cancer risk. A review of the evidence. *Int J Cancer* 2013;133:1023-1032. doi:10.1002/ijc.28003.
- (26) Jass JR, Filipe MI. The mucin profiles of normal gastric mucosa, intestinal metaplasia and its variants and gastric carcinoma. *Histochemical J* 1981;13:931-939.
- (27) Correa P, Filipe MI, Torrado J. In: *Gastritis*. Ed Graham DY, Genta RM, Dixon MF. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 1999:205-216.
- (28) Rokkas T, Filipe MI, Sladen GE. Detection of an increased incidence of early gastric cancer in patients with intestinal metaplasia type III who are closely followed up. *Gut* 1991;32:1110-1113.
- (29) El-Zimaity HMT, Ramchatesingh J, Ali Saeed M, Graham DY. Gastric intestinal metaplasia: subtypes and natural history. *J Clin Pathol* 2001;54:679-683.

- 30) Matsukura N, Suzuki K, Kawachi T, Aoyagi M, Sugimura T, Kitaoka H, Numajiri H, Shirota A, Itabashi M, Hirota T. Distribution of marker enzymes and mucin in intestinal metaplasia in human stomach and relation to complete and incomplete types of intestinal metaplasia to minute gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1980;65:231-240.
- (31) De Vries AC, Haringsma J, de Vries RA, ter Borg F, Nagtzaam NM, Steyerberg EW, van Dekken H, Kuipers EJ. The use of clinical, histologic, and serologic parameters to predict the intragastric extent of intestinal metaplasia: a recommendation for routine practice. *Gastrointest Endosc* 2009;70:18-25.
- (32) Correa P, Piazuelo B, Wilson KT. Pathology of gastric intestinal metaplasia: clinical implications. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:493-498.
- (33) Shiotani A, Haruma K, Uedo N, Iishi H, Ishihara R, Tatsuta M, Kumamoto M, Nakae Y, Ishiguro S, Graham DY. Histological risks markers for non-cardia early gastric cancer. *Virchows Arch* 2006;449:652-659.
- (34) Meining A., Morgner S., Miehlke S., Bayerdörffer E., Stolte M. Atrophy-metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in the stomach: a reality or merely an hypothesis? *Best Pract Res Clin Gastroent* 2001;15:983-998.
- (35) Tsukamoto T, Toyoda T, Mizoshita T, Tatematsu M. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinogenesis in rodent models. *Semin Immunopathol* 2013; 35:177-90. doi: 10.1007/s00281-012-0357-1.
- (36) Sugai T., Habano W., Jiao Y-F., Toyota M., Suzuki H., Tsukahara M., Koizuka H., Akasaka R., Koeda K., Wakabayashi G., Suzuki K. Molecular analysis of single isolated glands in gastric cancers and their surrounding gastric intestinal metaplastic mucosa. *Onco Rep* 2010;23:25-33.
- (37) Wu M.S., Shun C-T., Lee W-C., Chen C-J., Wang H-P., Lee W-J., Sheu J-C., Lin J-T. Gastric cancer risk in relation to *Helicobacter H. pylori* infection and subtypes of intestinal metaplasia. *Br J Ca* 1998;78:125-128.
- (38) Busuttill RA, Boussioutas A. Intestinal metaplasia: a premalignant lesion involved in gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:193-201.
- (39) Tahara E, Kuniyasu H, Yasui W, Yokozaki H. Gene alterations in intestinal metaplasia and gastric cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994;6(suppl 1)S97-S101.
- (40) Vauhkonen M, Vauhkonen H, Sipponen P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006;20:651-674.
- (41) Watanabe H. The pathological sequence in the development of gastric cancer: II. *Scand J Gastroenterol* 1996;31 (suppl 214):36-39.
- (42) Gutiérrez-González L., Wright NA. Biology of intestinal metaplasia in 2008: more than a simple phenotypic alteration. *Dig Liver Dis* 2008;40:510-522.
- (43) Marcos-Pinto R, Carneiro F, Dinis-Ribeiro M, Wen X, Lopes C, Figueiredo C, Machado JC, Ferreira RM, Reis CA, Ferreira J, Pedroto I, Areias J. First-degree relatives of patients with early-onset gastric carcinoma show even at young ages

a high prevalence of advanced Olga/Olgim stages and dysplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; May 2, doi:10.1111.

- (44) Leung WK, Sung JY. Review article: intestinal metaplasia and gastric carcinogenesis *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1209-1216
- (45) Houghton JM, Morozov A, Smirnova I, Wang TC. Stem cells and cancer. *Seminars in Cancer Biology* 2007;17:191-203.
- (46) Tosi P, Filipe MI, Luzi P, Miracco C, Santopietro R, Lio R, Sforza V, Barbini P. Gastric intestinal metaplasia type III cases are classified as low-grade dysplasia on the basis of morphometry. *J Pathol* 1993;169:73-78
- (47) Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC* 2004;157:327-349.
- (48) Cassaro M, Rugge M, Gutierrez O, Leandro G, Graham D, Genta RM. Topographic patterns of intestinal metaplasia and gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1431-1438.
- (49) Liu Q, Teh M, Ito K, Shah N, Ito Y, Yeoh KG. CDX2 expression is progressively decreased in human gastric intestinal metaplasia, dysplasia and cancer. *Modern Pathology* 2007;20:1286-1297.
- (50) Fujii Y, Yoshihashi K, Suzuki H, Tsutsumi S, Mutoh H, Maeda S, Yamagata Y, Seto Y, Aburatani H, Hatakeyama M. CDX1 confers intestinal phenotype on gastric epithelial cells via induction of stemness-associated reprogramming factors SALL4 and KLF5. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012. PMID 23112162.
- (51) Barros R, Freund JN, David L, Almeida R. Gastric intestinal metaplasia revisited: function and regulation of CDX2. *Trends Mol Med* 2012:1-9.
dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2012.07.006
- (52) Leung WK, Yu J, To KF, Go MYY, Ma PK, Chan FKL, Sung JY. Apoptosis and proliferation in *Helicobacter H. pylori*-associated gastric intestinal metaplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1467-1472.
- (53) Jong HS, Park YI., Kim S., Sohn JH, Kang SH., Song SH., Bang YJ, Kim NK.. Up-regulation of human telomerase catalytic subunit during gastric carcinogenesis. *Cancer* 1999;86:559-565.
- (54) Holmes K, Egan B, Swan N, O'Morain C. Genetic mechanisms and aberrant gene expression during the development of gastric intestinal metaplasia and adenocarcinoma. *Curr Genomics* 2007;8:379-397.
- (55) Ma M, Devereux T, Stockton P, Sun K, Sills R, Clayton N, Portier M, Flake G. Loss of E-cadherin expression in gastric intestinal metaplasia and later stage p53 altered expression in gastric carcinogenesis. *Exp Toxic Pathol* 2001;53:237-246.
- (56) Grötzinger C, Kneifel J, Patschan D, Schnoy N, Anagnostopoulos I, Faiss S, Tauber R, Wiedenmann B, Gessner R. LI-cadherin: a marker of gastric metaplasia and neoplasia. *Gut* 2001;49:73-81.
- (57) Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:2847-2851.

- (58) Mutoh H, Hakamata Y, Sato K, Eda A, Yanaka I, Honda S, Osawa H, Kaneko Y, Sugano K. Conversion of gastric mucosa to intestinal metaplasia in Cdx2-expressing transgenic mice. *Bioc Biop Res Comm* 2002;294:470-479.
- (59) Semba S, Yokozaki H, Yamamoto S, Yasui W, Tahara E. Microsatellite instability in precancerous lesions and adenocarcinomas of the stomach. *Cancer* 1996;77:1620-1627.
- (60) Chaturvedi R, Asim M, , Piazuolo MB, Yan F, Barry DP, Sierra JC, Delgado AG, Hill S, Casero RA Jr, Bravo LE, Dominguez RL, Correa P, Polk DB, Washington MK, Rose KL, Schey KL, Morgan DR, Peek RM Jr, Wilson KT. Activation of EGFR and ERBB2 by *Helicobacter pylori* results in survival of gastric epithelial cells with DNA damage. *Gastroenterology* 2014 Jun; 146(7):1739-51. e14. doi: .1053/j.gastro.2014.02.005. Epub 2014 Feb 13.
- (61) Yu J, Leung WK, Ng EKW, To KF, Ebert MPA, Go MYY, Chan WY., Chan FKL, Chung SCS, Malfertheiner P, Sung JY. Effect of *Helicobacter H. pylori* eradication on expression of cyclin D2 and p27 in gastric intestinal metaplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1505-1511.
- (62) Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G, Tannenbaum S, Collazos T, Ruiz B. Gastric precancerous process in a high risk population: cohort follow-up. *Cancer Res* 1990;50:4737-4740.
- (63) Mera R, Fontham ET, Bravo LE, Bravo JC, Piazuolo MB, Camargo MC, Correa P. Long term follow-up of patients treated for *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 2005;54:1536-1540.
- (64) Wong BC, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE, Lai KC, Hu WH, Yuen ST, Leung SY, Fong DY, Ho J, Ching CK, Chen JS; China Gastric Cancer Study Group. *Helicobacter H. pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004;29:187-194.
- (65) Galiana-Arnoux D, Lejeune F, Gesnel M-C, Stevenin J, Breathnach R, Gatto-Konczak F. The CD44 alternative v9 exon contains a splicing enhancer responsive to the SR proteins 9G8, ASF/SF2, and SRp20. *J Biol Chemistry* 2003;278(35):32943-32953.
- (66) Ponta H, Wainwright D, Herrlich P. The CD44 protein family. *Intern J Bioch Cell Biol* 1998;30:299-305.
- (67) Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Mol Cell Biol* 2003;4:33-45.
- (68) Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* 1999 ; 52 : 189-196.
- (69) Yoshida K, Bolodeoku J, Sugino T, Goodison S, Matsumura Y, Warren BF, Toge T, Tahara E, Tarin D. Abnormal retention of intron 9 in CD44 gene transcripts in human gastrointestinal tumors. *Cancer Res* 1995;55: 4273-4277.

- (70) Chiele Neto, C. Expressão das variantes v5 e v6 da proteína CD44 na margem tumoral invasiva dos adenocarcinomas colorretais. 1999, 72 pgs. Dissertação (Mestrado em Gastroenterologia). Universidade do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia. 1999.
- (71) Dämmrich J, Vollmers HP, Heider KH, Müller-Hermelink HK. Importance of different CD44v6 expression in human gastric intestinal and diffuse type cancers for metastatic lymphogenic spreading. *J Mol Med* 1995;73:395-401.
- (72) Sugino T, Gorham H, Yoshida K, Bolodeoku J, Nargund V, Cranston D, Goodison S, Tarin D. Progressive loss of CD44 gene expression in invasive bladder cancer. *Am J Pathol* 1996;149:873-882
- (73) Ko YH, Won HS, Jeon EK, Hong SH, Roh SY, Hong YS, Byun JH, Jung CK, Kang JH. Prognostic significance of CD44s expression in resected non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2011 Aug 7;11:340. doi: 10.1186/1471-2407-11-340.
- (74) Lin Z, Cho S, Jeong H, Kim H, Kim I. Immunohistochemical analysis of CD44s and CD44v6 in endometriosis and adenomyosis: comparison with normal, hyperplastic and malignant endometrium. *J Korean Med Sci* 2001;16:317-322.
- (75) Khoursheed M, Mathew TC, Makar RR, Sonia L, Abul H, Asfar S, Al-Sayer H, Dashti HM, Al-Bader A. Expression of CD44s in human colorectal cancer. *Pathol Oncol Res* 2002;8:170-174.
- (76) Goodison S, Yoshida K, Churchman M, Tarin D. Multiple intron retention occurs in tumor cell CD44 mRNA processing. *Am J Pathol* 1998;153:1221-1228.
- (77) Srebrow A, Alberto R Kornblihtt. The connection between splicing and cancer. *J Cell Science* 2006; 119: 2635-2641.
- (78) Akasaka Y, Saikawa Y, Fujita K, Kubota T, Yshikawa Y, Fujimoto A, Ishii T, Okano H, Kitajima M. Expression of a candidate marker for progenitor cells, Musashi-1, in the proliferative regions of human antrum and its decreased expression in intestinal metaplasia. *Histopathology* 2005; 47:348-356.
- (79) Yasui W, Kudo Y, Naka K, Fujimoto J, Ue T, Yokozaki H, Tahara E. Expression of CD44 containing variant exon 9 (CD44v9) in gastric adenomas and adenocarcinomas: relation to the proliferation and progression. *Intern J Oncol* 1998;12:1253-1258.
- (80) Gulmann C, Grace A, Leader M, Butler D, Patchett S, Kay E. CD44v6: a potential marker of malignant transformation in intestinal metaplasia of the stomach? An immunohistochemical study using tissue microarrays. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:981-986.
- (81) Yamamichi K, Uehara Y, Kitamura N, Nakane Y, Hioki K. Increased expression of CD44v6 mRNA significantly correlates with distant metastasis and poor prognosis in gastric cancer. *Int J Cancer* 1998;79:256-262.

- (82) Castellà J, Ariza I, Pellicer A, Fernández-Vasalo I, Ojanguren. Differential expression of CD44v6 in metastases of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 1998;51:134-137.
- (83) Hart IR, Goode NT, Wilson RE. Molecular aspects of the metastatic cascade. *Bioch Bioph Acta* 1989;989:65-84.
- (84) Eriksson NK, Kärkkäinen PA, Färkkilä MA, Arkkila PE. Prevalence and distribution of gastric intestinal metaplasia and its subtypes. *Dig Liv Dis* 2008; 40:355-360.
- (85) Petersson F, Borch K, Franzén LE. Prevalence of subtypes of intestinal metaplasia in the general population and in patients with autoimmune chronic atrophic gastritis. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:262-266
- (86) Mazzoleni LE, Sander GB, Francesconi F *et al.* *Helicobacter H. pylori* eradication in functional dyspepsia: Heroes trial. *Arch Intern Med* 2011;21:1929-1936. doi:10.1001/archinternmed.2011.533.;
- (87) Sander GB, Mazzoleni LE, Francesconi CFM, Balbinotto G *et al.* Influence of organic and functional dyspepsia on work productivity: the HEROES-DIP study. *Value Health* 2011;14(5 Suppl 1):S 126-9. doi:10.1016/j.jval.2011.05.021
- (88) Mazzoleni LE, Sander GB, Ott EA, Barros SGS *et al.* Clinical outcomes of eradication of *Helicobacter H. pylori* in nonulcer dyspepsia in a population with high prevalence of infection: results of a 12-month randomized, double blind, placebo-controlled study. *Dig Dis Sci* 2006;51:89-98. doi:10.1007/s10620-006-3090-6).
- (89) Li Y, Chang X, Zhou W, Xiao Y, Nakatsuka LN, Chen J, Lauwers GY. Gastric intestinal metaplasia and biologic evaluation in a large Chinese cohort. *Hum Pathol* 2013;44:578-90. doi: 10.1016/humpath.2012.07.002.
- (90) Russo A, Maconi G, Spinelli P, Di Felice G, Eboli M, Andreola S, Ravagnani F, Settsoldi D, Ferrari D, Lombardo C, Bertario L. Effect of lifestyle, smoking, and diet on development of intestinal metaplasia in *H. pylori*- positive subjects. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1402-1408.
- (91) Zhang C, Yamada M, Wu YL, Wen M, Matsuhisa T, Matsukura N. *Helicobacter pylori* infection, glandular atrophy and intestinal metaplasia in superficial gastritis, gastric erosion, erosive gastritis, gastric ulcer and early gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11:791-796.
- (92) Fennerty MB, Emerson JC, Sampliner RE, McGee DL, Hixson LJ, Garewal HS. Gastric intestinal metaplasia in ethnic groups in the southwestern United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1992;1:293-296.
- (93) Kim N, Park YS, Cho S *et al.* Prevalence and risk factors of atrophic gastritis and intestinal metaplasia in a Korean population without significant gastroduodenal disease. *Helicobacter* 2008; 13:245-255.
- (94) Peleteiro B, Bastos J, Barros H, Lunet N. Systematic review of the prevalence of gastric intestinal metaplasia and its area-level association with smoking. *Gac Sanit* 2008 ;22 :236-247.

- (95) De Vries AC, Meijer GA, Looman CWN e col. Epidemiological trends of pre-malignant gastric lesion: a long-term nationwide study in the Netherlands. *Gut* 2007; 56:1665-70.
- (96) Morales TG, Sampliner RE, Camargo E, Marquis S, Garewal HS, Fennerty MB. Inability to noninvasively diagnose gastric intestinal metaplasia in hispanics or reverse the lesion with *Helicobacter pylori* eradication. *J Clin Gastroenterol* 2001;32:400-404.
- (97) Inada KI, Nakanishi H, Fujumitsu Y, Shimizu N, Ichinose M, Miki K, Nakamura S, Tatematsu M. Gastric and intestinal mixed and solely intestinal types of intestinal metaplasia in the human stomach. *Pathol Intern* 1997;47:831-841.
- (98) Tatematsu M., Tsukamoto T., Inada K. Stem cells and gastric cancer: role of gastric and intestinal mixed intestinal metaplasia. *Cancer Sci* 2003;94:135-141.
- (99) Niwa T, Ikehara Y, Nakanishi H, Tanaka H, Inada K, Tsukamoto T, Ichinose M, Tatematsu M. Mixed gastric- and intestinal-type metaplasia is formed by cells with dual intestinal and gastric differentiation. *J Histochem Cytochem* 2005;53:75-85. population: cross-sectional studies. *Cancer Res* 1990;50:4731-4736.
- (100) Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G, Tannenbaum S, Collazos T, Ruiz B. Gastric precancerous process in a high risk
- (101) Tosi P, Filipe MI, Baak JPA, Luzi P, Santopietro R, Miracco C, Sforza V, Megha T. Morphometric definition and grading of gastric intestinal metaplasia. *J Pathol* 1990;161:201-208.
- (102) Den Hoed CM, Holster IL, Capelle LG, de Vries AC, den Hartog B, Ter Borg F, Biermann K, Kuipers EJ. Follow-up of premalignant lesions in patients at risk for progression to gastric cancer. *Endoscopy* 2013;45:249-256. doi:10.1055/s-0032-1326379.
- (103) Cho SJ, Choi IJ, Kook MC, Nam BH, Kim CG, Lee JY, Ryu KW, Kim YW. Staging of intestinal- and diffuse-type gastric cancers with the OLGa and OLGIM staging systems. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;38:1292-1302. doi: 10.1111/apt.12515.
- (104) Miwa H, Wada R, Nagahara A, Endo K, Watanabe S, Sato N. A dislocated and enlarged proliferative zone in human gastric intestinal metaplasia. *Cancer Lett* 1996;103:33-39.
- (105) Cassaro M, Rugge M, Tieppo C, Giacomelli L, Velo D, Nitti D, Farinati F. Indefinite for non-invasive neoplasia lesions ingastric intestinal metaplasia: the immunophenotype. *J Clin Pathol* 2007;60:615-621. doi: 10.1136/jcp.2006.040386.
- (106) McDonald AS, Greaves LC, Gutierrez-Gonzalez L, Rodriguez-Justo M, Deherogoda M, Leedham SJ, Taylor RW, Lee CY, Preston SL, Lovell M, Hunt T, Elia G, Oukrif D, Harrison R, Novelli MR, Mitchell I, Stoker DL, Turnbull DM, Jankowski JÁ, Wright NA. Mechanisms of field

cancerization in the human stomach: the expansion and spread of mutated stem cells. *Gastroenterology* 2008;134:500-510. doi: 10.1053/j.gastro.2007.11.035.

- (107) Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Dvorak K, Garewal H. Field defects in progression to gastrointestinal tract cancers. *Cancer Lett.* 2008;260:1-10. doi: 10.1016/j.canlet.2007.11.027.
- (108) Garewal H, Fennerty B, Sampliner R, Ramsey L. Demonstration of a Field defect in gastric intestinal metaplasia by biological marker analysis. *Cancer Epidemiol Biom Prev* 1994;3:683-686.
- (109) Kasamatsu E, Bravo LE, Bravo JC, Aguirre-Garcia J, Flores-Luna L, Nunes-Velloso MC, Hernández-Suárez G. Reproducibility of histopathologic diagnosis of precursor lesions of gastric carcinoma in three latin american countries. *Salud Publica Mex* 2010;52:386-390.
- (110) Zenndehdel N, Massarrat S, Sheykholeslami A *et al.* Topography of gastritis and its severity in 864 first degree relatives of gastric cancer patients. *Arch Iran Med* 2010;13:469-475.
- (111) Liang YZ, Fang TY, Xu HG, Zhuo ZQ. Expression of CD44v6 and Livin in gastric cancer tissue. *Chin Med J* 2012;125:3161-3165.
- (112) Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang S, Shibata W, Vigneshwaran R, Gordon S, Shimada Y, Wang T. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem cells* 2009;27:1006-1020. doi:10.1002/stem.30.
- (113) Dhingra S, Feng W, Brown R, Zhou Z, Khoury T, Zhang R, Tan D. Clinicopathologic significance of putative stem cell markers, CD44 and nestin, in gastric adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2011;4:733-741.
- (114) Snyder E, Bailey D, Shpitsin M, Polyak K, Loda M. Identification of CD44v6+/CD24- breast carcinoma cells in primary human tumors by quantum dot-conjugated antibodies. *Laboratory Investigation* 2009;89:857-866. doi:10.1038/labinvest.2009.54.
- (115) Kuhn S, Koch M, Nübel T, Ladwein M, Antolovic D, Klingbeil P, Hildebrand D, Moldenhauer G, Langbein L, Franke W, Weitz J, Zöller M. A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res* 2007;5:553-567.
- (116) Gotley DC, Fawcett J, Walsh MD, Reeder JA, Simmons DL, Antalis TM. Alternatively spliced variants of the cell adhesion molecule CD44 and tumor progression in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1996;74:342-351.
- (117) Jijiwa M, Demir H, Gupta S, Leung C, Joshi K, Orozco N, Huang T, Yildiz VO, Shibahara I, de Jesus JA, Yong WH, Mischel PS, Fernandez S, Kornblum HI, Nakano I. CD44v6 regulates growth of brain tumor stem cells partially through the AKT-mediated pathway. *PLoS ONE* 2011;6(9):e24217. doi:10.1371/journal.pone.0024217

- (118) Gutierrez-Gonzalez L, Graham TA, Rodriguez-Justo M, Leedham SJ, Novelli MR, Gay LJ, Ventayol-Garcia T, Green A, Mitchell I, Stoker DL, Preston SL, Bamba S, Yamada E, Kishi Y, Harrison R, Jankowski JA, Wright NA, McDonald AC. The clonal origins of dysplasia from intestinal metaplasia in the human stomach. *Gastroenterology* 2011;140:1251-1260. doi:10.1053.j.gastro.2010.12.051.
- (119) Goldenring JR, Nam KT, Wang TC, Mills JC, Wright NA. Spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia and intestinal metaplasia: time for reevaluation of metaplasias and the origins of gastric cancer. *Gastroenterology* 2010;138:2207-2210. doi: 10.1053/j.gastro.2010.04.023.
- (120) Luigiano C, Ferrara F, Fagoonee S, Fabbri C, Cennamo V, Virgilio C, Bassi M, Favara C, Morace C, Consolo P, Pellicano R. Is *Helicobacter H. pylori* the infectious target to prevent gastric cancer? Na interdisciplinary point of view. *Infect Disord Drug Targets* 2012;12:340-345.
- (121) Lim JH, Kim N, Lee HS, Choe G, Jo SY, Chon I, Choi C, Yoon H, Shin CM, Park YS, Lee DH, Jung HC. Correlation between endoscopic and histological diagnosis of gastric intestinal metaplasia. *Gut Liver* 2013;7:41-50. doi: 10.5009/gnl.2013.7.1.41.
- (122) Fukuta N, Ida K, Kato T, Uedo N, Ando T, Watanabe H, Shimbo T; Study Group for Investigating Endoscopic Diagnosis of Gastric Intestinal Metaplasia. Endoscopic diagnosis of gastric intestinal metaplasia: a prospective multicenter study. *Dig Endosc* 2013;25:526-534.
- (123) Chuang CH, Yang HB, Sheu SM, Hung KH, Wu JJ, Cheng HC, Chang WL, Sheu BS. *Helicobacter H. pylori* with stronger intensity of CagA phosphorylation lead to an increased risk of gastric intestinal metaplasia and cancer. *BMC Microbiol* 2011;11:121.
- (124) Wang T, ONG CW, Shi J, Srivastava S, Yan B, Cheng CL, Yong WP, Chan SL, Yeoh KG, Iacopetta B, Salto-Tellez M, and the Singapore Gastric Cancer Consortium. Sequential expression of putative stem cell markers in gastric carcinogenesis. *Br J Cancer* 2011;105:658-665. doi: 10.1038/bjc.2011.287.
- (125) Jang B, Li Y, Graham D, Cen Putao. The role of CD44 in the pathogenesis, diagnosis and therapy of gastric cancer. *Gut Liver* 2011;5:397-405.
- (126) Higashikawa K, Yokozaki H, Ue, T, Taniyama K, Ishikawa Y, Tarin D. Evaluation of CD44 transcription variants in human digestive tract carcinomas and normal tissue. *Int J Cancer* 1996;66:11-17.
- (127) da Cunha CB, Oliveira C, Wen X, Gomes B, Sousa S, Suriano G *et al.* *de novo* Expression of CD44 variants in sporadic and hereditary gastric cancer. *Lab Invest*.2010;90:1604-1614.

10 Anexos

ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PESQUISA: ERRADICAÇÃO DO *HELICOBACTER PYLORI* NA DISPEPSIA FUNCIONAL

G.P.P.G: FICHA # _____

PACIENTE

JUSTIFICATIVA:

A dispepsia funcional é uma doença muito freqüente, assim como a infecção pelo *Helicobacter pylori*. Ainda não foi definido se a erradicação da bactéria beneficia os sintomas dispépticos. Essa pesquisa irá avaliar se a erradicação do *Helicobacter pylori* melhora os sintomas de pacientes com dispepsia funcional.

Os participantes deste estudo serão pacientes dispépticos funcionais portadores do *Helicobacter pylori* atendidos no HCPA. Os pacientes irão receber os seguintes esquemas terapêuticos: omeprazol, amoxicilina e claritromicina ou omeprazol e placebos dos antibióticos. Serão monitorizados com consultas para avaliação clínica, mensuração dos sintomas, avaliação da qualidade de vida além de avaliação econômica. Irão realizar testes funcionais do estômago, com teste de ingestão de líquidos. Também irão realizar avaliação endoscópica e histológica do estômago. Os pacientes serão acompanhados por 12 meses após o tratamento.

A assinatura desse consentimento informado dará autorização aos pesquisadores do estudo de utilizarem os dados obtidos somente para fins científicos, incluindo a divulgação dos mesmos, sempre preservando a identidade dos pacientes.

Eu, _____, fui informado (a) dos objetivos e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada, conforme especificados em Convite para participar do estudo (em anexo). Recebi informações específicas sobre os procedimentos diagnósticos e tratamento aos quais serei submetido(a).

Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, terei liberdade de

retirar meu consentimento de participação na pesquisa durante o andamento da mesma.

O profissional _____ certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Fui informado/(a) que todos os custos relacionados a exames diagnósticos e tratamento médico serão cobertos por verbas próprias do Projeto de Pesquisa.

Declaro ser de livre vontade minha participação nesta pesquisa.

Porto Alegre, _____ de _____ de 2005.

Assinatura dos participantes:

PACIENTE

TESTEMUNHA (nos casos especiais)

INVESTIGADOR

ORIENTADOR / COORDENADOR DO PROJETO

ANEXO 2 - TRABALHO APRESENTADO NA SEMANA BRASILEIRA DO APARELHO DIGESTIVO, FLORIANÓPOLIS 2010, COMO APRESENTAÇÃO ORAL

PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA METAPLASIA INTESTINAL GÁSTRICA: ANÁLISE DE 641 PACIENTES DISPÉPTICOS FUNCIONAIS.

Autores: Ronaldo S. Torresini, Luiz E. Mazzoleni, Guilherme B. Sander, Carlos F. Francesconi, Diego Uchoa, Kauê M. Duro, Matheus T. Michalczuk, João C Prolla; Serviços de Gastroenterologia, Endoscopia e Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Introdução: O Brasil é um país com risco moderado para câncer gástrico e metaplasia intestinal gástrica (MIG) é considerada alteração pré-neoplásica na carcinogênese gástrica.

Objetivo: avaliar prevalência e fatores de risco para MIG em dispépticos funcionais.

População e métodos: pacientes adultos com diagnóstico de dispepsia funcional segundo critérios Roma III, foram recrutados pela mídia e por encaminhamento de centros primários. Foi realizada endoscopia digestiva alta com coleta de 8 biópsias gástricas que foram analisadas por teste de urease e histologia (2 patologistas cegados para informações clínicas/endoscópicas). Foi utilizada a classificação histológica de Sydney modificada (Houston) para gastrites, para a análise dos dados histológicos.

Resultados: Analisados 641 pacientes dispépticos funcionais (idade média 46 anos, 80% sexo feminino). 423 (66%) definidos como *Helicobacter H. pylori* positivos. Metaplasia intestinal gástrica foi observada em 92 (14,4%). A infecção pelo *H. pylori* foi o mais importante fator de risco. Dos pacientes *H. pylori* positivos 18,2% apresentavam MIG vs 6,9% dos *H. pylori* negativos ($p < 0,001$). Na análise univariada outros fatores de risco para MIG foram identificados: sexo masculino ($p = 0,035$), idade > 50 anos ($p = 0,008$), consumo de café ($p = 0,024$) e fumo ($p = 0,08$). Na análise multivariada apenas sexo masculino, idade > 50 anos e consumo de café permaneceram como fatores de risco. Anti-inflamatórios, chimarrão e álcool não foram fatores de risco para metaplasia intestinal.

Conclusões: Infecção pelo *H. pylori*, sexo masculino, idade maior de 50 anos e consumo de café foram fatores de risco para metaplasia intestinal gástrica nessa população.

ANEXO 3 - ARTIGO EM INGLÊS PARA POSTERIOR PUBLICAÇÃO

Prevalence of gastric intestinal metaplasia and analysis of the expression of CD44v6 membrane protein in dyspeptic patients.

Authors: Ronaldo J. S. Torresini, Luiz E. Mazzoleni, Guilherme B. Sander, Carlos F. Francesconi, Luise Meurer, Diego Uchoa, Vinicius D. da Silva, João C. Prolla.

The gastric intestinal metaplasia (GIM) is considered a premalignant lesion for gastric cancer, but this has not led to greater control of the carriers. We studied a dyspeptic adult population and detected the prevalence of GIM. Several markers have been tested to indicate which patients with intestinal metaplasia should be followed with periodic examinations. One of these markers is the membrane protein CD44v6.

Objective: To study the expression of CD44v6 in dyspeptic patients with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and gastric intestinal metaplasia.

Location: Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Patients: 641 dyspeptic patients of which 56 patients with GIM and compared with two other groups, one of patients with *H. pylori* and another without *H. pylori*.

Methods: A study of GIM with HE staining (hematoxylin-eosin), PAS / AB (periodic acid-Schiff / Alcian blue), HID (high iron diamine). We used immunohistochemistry (IHC) to study the expression of CD44v6,

Results: Of 641 patients evaluated, 423 were carriers of *Helicobacter pylori* and 218 did not. The carriers had 77 MIG (18.2%) and noncarriers, 15 (6.9%). Of those GIM 56 study cases, GIM type I by 55% (31/56) cases, 22% (12/56) Type II and 23% (13/56) of Type III. GIM had equal sex ratio, was more frequent in the antrum, the type of GIM was not related to the extent of metaplasia and there was no proportional increase with age. In our study population, the GIM has low relative frequency (14.4%). As to CD44v6, all our cases were negative for this protein.

Conclusions:

1) Our cases were all negative for CD44v6 and we do not see the usefulness of using this marker in screening patients with gastric intestinal metaplasia that merit a subsequent follow-up. 2) Biopsies of the antrum and incisura detected almost all (93 %) cases of gastric intestinal metaplasia in our cases and this can be an indication for clinical practice. 3) The distribution of gastric intestinal metaplasia between the sexes followed the proportion in the group studied, and so there is no difference between the sexes. 4) No change was found in the frequency of gastric intestinal metaplasia according to age. 5) The finding of brush border and Paneth cells does not preclude that metaplastic glands is not of the incomplete type. 6) There was no relationship between the location of gastric intestinal metaplasia and its type. 7) There was no relationship

between the extent and type of gastric intestinal metaplasia. 8) The population has a low prevalence of gastric intestinal metaplasia.

Gastric cancer is the fourth most frequent and is the second leading cause of cancer death worldwide (1). The high mortality is due to its detection occurring most often in the advanced stage of the tumor. It is known that gastric intestinal metaplasia (GIM) is considered by many authors as a premalignant lesion and would be part of the cascade of gastric carcinogenesis. This would begin in chronic gastritis, go through the stages of multifocal chronic gastritis, atrophy, intestinal metaplasia, dysplasia and gastric cancer (2). The monitoring of GIM thus could generate benefits to the patient.

The CD44 designates a family of glycoproteins widely distributed on the cell surface with various functions, but basically is a cell adhesion molecule and signaling. The CD44 gene is located on chromosome 11p13, has 20 exons which 10 exons form the constitutively expressed standard CD44 protein (CD44s) that uses exons 1 to 5 and 16 to 20. Other proteins may be expressed as several isoforms generated by alternative splicing of exons 6 and 15 (3). The inappropriate expression of abundant isoform variants is observed in a variety of tumors such as colon, breast, uterus, bladder, lung (4,5,6,7) in gastric cancer (8) and non-neoplastic epithelia as in GIM (9). These observations suggest that the evaluation of the expression of CD44 isoforms variables could be useful in diagnosis of tumors and precancerous changes (10,11).

This work aims to study the prevalence of MIG in dyspeptic patients and the expression of CD44v6 (exon 11) in these patients with *H. pylori*.

Material and Methods

This study is nested in another larger study, called HEROES (Helicobacter Eradication Relief Of Symptoms Dyspeptic) that was a randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial to study the effect *Helicobacter pylori* eradication on dyspeptic symptoms and conducted in a single academic hospital, the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (12). Community and primary care patients were recruited through media and invitation in primary care clinics if they were 18 years or older. Our study is about patients who have GIM. Written informed consent was obtained and the trial was approved by the hospital institutional board review.

Each patient was submitted an upper endoscopy at baseline and one at the end, after 12 months, except for the group without *H. pylori* who was submitted only to the initial endoscopy.

In our study, we analyzed patients in biopsies of the first or second endoscopy, who had gastric intestinal metaplasia. Were compared with patients without metaplasia with *H. pylori* HEROES and without metaplasia and without *H. pylori* recruited for the study, but were excluded because was negative to the bacteria; in these, staining was with HE. All these groups were evaluated by IHC for CD44v6 and its expression is modified with bacterial eradication.

Endoscopic gastric biopsies were performed: two in the greater curvature of the antrum, one in the incisura angularis and two in the gastric body, greater curvature. Fragments with gastric intestinal metaplasia were evaluated according to the Houston-updated Sydney system (13). GIM was classified as the staining mucins as Jass and Filipe (14). The HE, PAS / AB and HID were carried out in the usual way. The classification, briefly, is as follows: neutral mucins staining (PAS) in columnar gastric cells, AB staining in goblet cells and no staining for iron the diagnosis is GIM type I; if goblet cells were positive with the HID staining, diagnosis of GIM type II; and if were positive for iron columnar cells of the metaplastic gland, GIM diagnosis of type III.

The technique of immunohistochemistry with CD44v6 was performed with primary antibody mouse anti-CD44v6 Novocastra 1:200 with avidin-biotin-peroxidase according to the manufacturer instructions.

Results.

We studied 641 patients (423 patients with bacteria), in which GIM was present in 92 patients (14.4%) and the analysis of separate groups, 77 patients had GIM within bacteria group and 15 patients did not (18.2% X 6.9%). This difference was statistically significantly, relating strongly to the presence of GIM with infection ($p < 0.001$) (Figure 1).

Figure 1. Prevalence of gastric intestinal metaplasia among patients *Helicobacter pylori* and without bacteria.

We studied 56 adult patients with dyspepsia, *H. pylori* and GIM. This group was selected from HEROES as already explained, and contained 404 (19 patients were excluded before randomization, two with GIM) with *H. pylori* and 218 patients were excluded only because they had not the bacteria.

The patients studied were GIM 56 (paraffin blocks not found = 2; without GIM in the histopathological recuts = 19).

In gender comparison, had more female patients because the initial group was recruited this proportion was similar (78.7%). The age between males and females was not statistically different (Table 1).

Table 1 GIM patients according to age and sex.

		Age average		DP
Female	41	49,1	19-75 years	
Male	15	55,5	44-70 years	
Total	56	50,8		11,6

$p=0,779$.

We selected two groups for control. A paired study HEROES and no GIM patients (Table 2) and a matched group who did not attend the HEROES just because they do not had the bacteria (Table 3) whose numbers are shown in these tables.

Table 2 - Patient HEROES + *H pylori* without GIM.

		Age average		DP
Female	57	47,1	18-73 years	
Male	18	51,7	38-68 years	
Total	75	48,2		11,8

p=0,779.

Table 3 - Patients without *H pylori*.

		Age average		DP
Female	55	46,3	18-71 y.o.	
Male	13	50,5	27-69 years	
Total	68	47,1		12,5

p=0,779.

The statistical analysis between groups shown in Tables 1 to 3, shows no statistical differences when compared to sex or age between groups (ANOVA p = 0.189, chi-square p = 0.779).

Evaluating the types of GIM (Table 4), we find that 57% (32/56) of cases were GIM type I, 20% (11/56) of type II and 23% (13/56) of type III. Patients were grouped by GIM found and extent of metaplasia (Table 4) and there was no statistically significant relationship between these variables (chi-square p = 0.162).

Table 4 - Extension according to the type of GIM.

EXTENTION TYPE	Mild	Moderate	Marked	
I	19	9	4	32
II	7	2	2	11
III	3	6	4	13
	29	17	10	56

p=0,162

The location of GIM was antral in 26 cases, incisura in 9 cases and 4 cases in the corpus (Table 5). The predominance of our patients was, therefore, located in the antrum, totaling 40 patients (40/56; 71%) of diagnosing the presence and intestinal metaplasia of the stomach can be accomplished in the majority of cases (52/56; 93%), with biopsies of the antrum and the incisura.

We also evaluated the type of GIM as the local of the discovery of metaplasia (Table 5) to see if there was a region more likely to show a special type of metaplasia. We did not find significant variation (chi-square $p = 0.379$).

Table 5 - Type of MIG by location.

Local Type	A	I	C	AI	AC	IC	Total
I	13	7	4	6	0	2	32
II	8	1	0	2	0	0	11
III	5	1	0	5	1	1	13
Total	26	9	4	13	1	3	56

A = antrum; incisura = I, C = corpus; AI = antrum and incisura; AC = antrum and corpus; IC = incisura and corpus.

$p = 0.379$

Our findings on the microscopic slide with a final diagnosis of types of GIM were varied. A microscopic slide that has one or more gland metaplasia type II or III, often presented brush border (Br) and Paneth cells (Pa) in other glands in the same metaplastic slide (Table 6). We studied the relationship between the presence of Br and Pa with the final diagnosis and did not find a significant relationship, that means, the finding of one of these factors did not exclude the diagnosis of metaplasia of the incomplete type in that slide (chi-square $p = 1.000$ and $p = 0.774$, respectively).

Table 6 - Findings GIM markers found on the same slide pathologic.

	Pa	Br	PaBr	AB	HID	Total
I	0	7	21	4	0	32
II	0	1	9	1	0	11
III	0	4	7	1	1	13
Total	0	12	37	6	1	56

Pa = Paneth cell, Br = brush border; AB = Alcian blue; HID = high iron diamine.
 Chi-square $p = 1.000$ for Br and Pa $p = 0.774$).

The assessment of the degree of agreement between the two pathologists regarding the diagnosis of gastric intestinal metaplasia types had the following results: the percentage of agreement was 83% and kappa index was equal to 0.732 ($p < 0.001$), considered high.

IHC for CD44v6 was negative in all our cases (Figure 2). The fragments used as controls showed clear brown staining of the cell membrane (Figure 3).

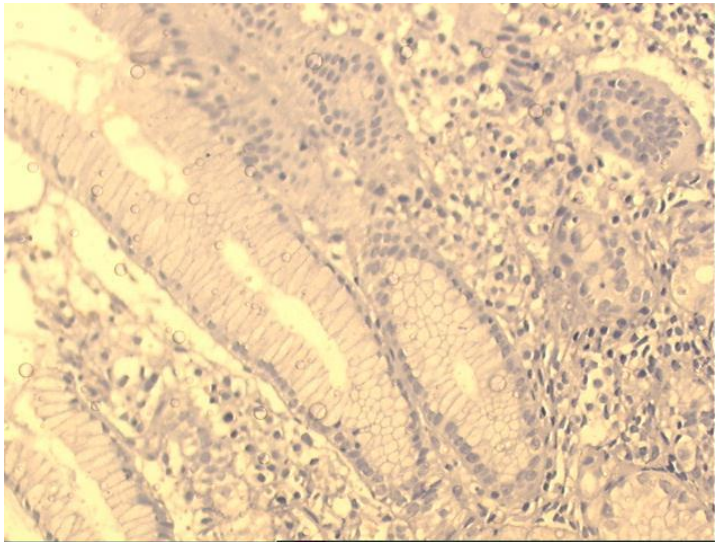


Figure 2 Case IHC 200x anti-CD44v6

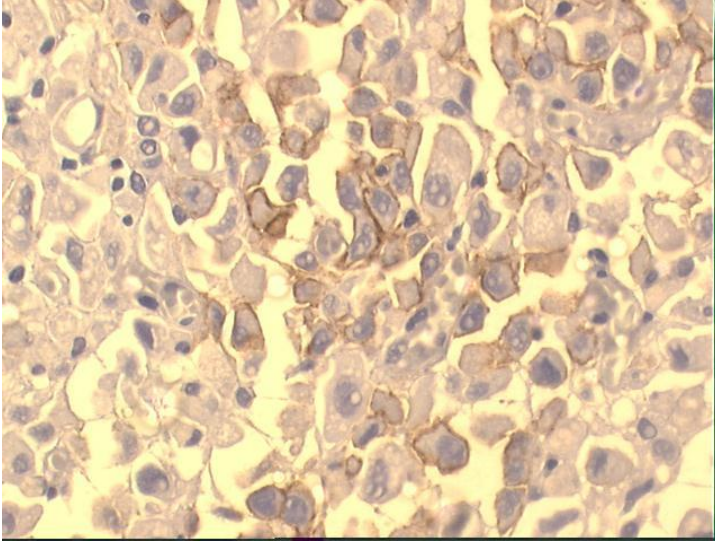


Figure 3 Control IHC 400x anti-CD44v6

Discussion:

The relative frequency of GIM in dyspeptic patients was 14.4% (Figure 1) which may be considered low in comparison with other regions: Finland 19% (15), 23% Sweden (16), Colombia, 12,9% in coastal region (area of low incidence of gastric cancer), Nariño, the Andean region of Colombia 59.6% (region of high incidence of gastric cancer) (17).

The Heroes of the total group had a higher proportion of females (78.7%), which was maintained in our groups (12). de Vries et al. (19) in the Netherlands, analyzing almost 100,000 people in the national registry, found that the sex ratio of GIM was the same. Another smaller study evaluating 84 persons of Hispanic origin in the United States, also found no difference between the sexes of the presence of GIM (20) or the study of Nariño, Colombia (17) or in northern Italy (21). Several studies indicate increased GIM with age (22, 23) which was not observed in our study (Table 1).

It was also studied a possible link between the extent of GIM and its type (Table 4). We analyzed these data using the chi-square and no relation was found ($p = 0.162$). This factor is also contradicted by other studies that relate greater extent with more advanced types of GIM. P Correa *et al.* reported that the severity of gastric atrophy correlates with the prevalence and severity of this GIM with the prevalence of dysplasia, suggesting a sequential relationship (17). These authors also advocate the model of gastric carcinogenesis the evolutionary aspect of GIM type I to type III, and this also according to age. Crossing the data regarding the type of GIM and presence on the slide, we detected that the types are mixed, indicating there are more than one type of GIM in

the same slide (Table 6). We think, for a better characterization of GIM types, the samples must be stained with special staining methods as used in this work.

In our cases (Table 5) the most frequent site of GIM was in the antrum (71%), which is not the most commonly reported in other studies (24,25). The diagnosis of the presence of intestinal metaplasia in the stomach can be accomplished in most cases (52/56; 93%) with biopsies from the antrum and the incisura.

Several tumor markers have been studied in GIM (26,27,28,29) . Our choice for CD44v6 comes from work relating to gastric cancer and some with GIM. Gulmann *et al.* (9) reported positivity in isolated cases of GIM, and a higher positivity of MIG in areas near gastric cancer. Our IHC controls, advanced gastric tumors, were stained appropriately and clearly (Figure 3). One explanation for the non- staining of the GIM cases (Figure 2) could be that CD44v6 is associated with more advanced and metastatic tumors (8,30,31) . Other studies, however, relate to CD44v6 with early stages of cancer and even premalignant lesions (9,29,32). We also studied other groups , patients without GIM and patients without *H. pylori* (Tables 2 and 3) and in these there was also no statistically significant difference between sex and age , and staining for CD44v6 was negative by IHC .

Despite these arguments in favor of GIM as a premalignant lesion, our study using CD44v6, had no positive sample. We examine some hypotheses for this.

There are authors that consider GIM as para-neoplastic lesion or as unrelated to carcinogenesis because the MIG was not related to a specific type of tumor, or GIM type III was very common in areas with low incidence of gastric cancer (15), or by various cell markers the authors concluded that the routes of metaplasia and cancer may be parallel and not sequential (33) or because the GIM is common in the antrum in duodenal peptic diseases where the risk of malignancy is very low (34), among other factors.

However, studies indicating that the GIM is preneoplastic are more numerous (35,36,37,38). Eiichi Tahara indicates that carcinogenesis intestinal type cancer may have the sequence via GIM adenoma and cancer (35) and Pelayo Correa describes gastric carcinogenesis cascade where GIM plays an important role (2). Wada *et al.* analyzed 12 lesions of gastric super-minute intestinal type well-differentiated adenocarcinomas in the distal stomach and those lesions which had both phenotypes of mucins, intestinal and gastric, were considered that were developed from the proliferative zone of the tubular incomplete GIM, whereas those lesions which had only gastric mucin could be derived from native gastric tubules (36).

The data show, however, some elements conflicting studies, such as absent or weak staining in benign conditions, indicating the need for a better appreciation for the understanding of the expression of this molecule.

The low prevalence of GIM in our population may reflect a low risk of gastric

cancer, a factor that may be in accordance with the decrease of this cancer worldwide, especially intestinal type, perhaps also happening in our environment.

Another possibility, and this suggests as the outlook for new studies, is that in our population the carcinogenetic route only alters the expression of CD44v6 in later stages than the GIM.

Conclusions:

1) Our cases were all negative for CD44v6 and we do not see the utility of using this marker in our population in screening gastric intestinal metaplasia that merit a subsequent follow-up. 2) Biopsies of the antrum and incisura detected almost all (93 %) cases of gastric intestinal metaplasia in our cases and this can be an indication for clinical practice. 3) There are no difference between sexes and the distribution of gastric intestinal metaplasia. 4) No change was found in the frequency of gastric intestinal metaplasia according to age. 5) The finding of brush border and Paneth cells does not preclude that there is in the same sample a metaplastic gland of the incomplete type. 6) There is no relationship between the location of gastric intestinal metaplasia and its type. 7) There is no relationship between the extent and type of gastric intestinal metaplasia. 8) The population studied has a low prevalence of gastric intestinal metaplasia.

References:

- 1) Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Matheis C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Globocan 2008. *Int J Cancer*. 2010;127:2893-2917.
- 2) Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007;133:659-672.
- 3) Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Mol Cell Biol* 2003;4:33-45.
- 4) Sugino T, Gorham H, Yoshida K et al. Progressive loss of CD44 gene expression in invasive bladder cancer. *Am J Pathol* 1996;149:873-882.
- 5) Ko YH, Won HS, Jeon EK, Hong SH, Roh SY, Hong YS, Byun JH, Jung CK, Kang JH. Prognostic significance of CD44s expression in resected non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2011 Aug 7;11:340. doi: 10.1186/1471-2407-11-340.
- (6) Lin Z, Cho S, Jeong H, KimH, Kim I. Immunohistochemical analysis of CD44s and CD44v6 in endometriosis and adenomyosis: comparison with normal, hyperplastic and malignant endometrium. *J Korean Med Sci* 2001;16:317-322.
- 7) Khoursheed M, Mathew TC, Makar RR, Sonia L, Abul H, Asfar S, Al-Sayer H, Dashti HM, Al-Bader A. Expression of CD44s in human colorectal cancer. *Pathol Oncol Res* 2002;8:170-174.

- 8) Dämmrich J, Vollmers HP, Heider KH, Müller-Hermelink HK. Importance of different CD44v6 expression in human gastric intestinal and diffuse type cancers for metastatic lymphogenic spreading. *J Mol Med* 1995;73:395-401.
- 9) Gulmann C, Grace A, Leader M, Butler D, Patchett S, Kay E. CD44v6: a potential marker of malignant transformation in intestinal metaplasia of the stomach? An immunohistochemical study using tissue microarrays. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:981-986.
- 10) Yamamichi K, Uehara Y, Kitamura N, Nakane Y, Hioki K. Increased expression of CD44v6 mRNA significantly correlates with distant metastasis and poor prognosis in gastric cancer. *Int J Cancer* 1998;79:256-262.
- 11) Castellà EM, Ariza A, Pellicer I, Fernández-Vasalo A, Ojanguren I. Differential expression of CD44v6 in metastases of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. *Clin Pathol* 1998;51:134-137.
- 12) Mazzoleni LE, Sander GB, Francesconi F et al. Helicobacter pylori eradication in functional dyspepsia: Heroes trial. *Arch Intern Med* 2011;21:1929-1936.
- 13) Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, et al. Classification and grading of gastritis: the updated Sydney System. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1161-1181.
- 14) Jass JR, Filipe MI. The mucin profiles of normal gastric mucosa, intestinal metaplasia and its variants and gastric carcinoma. *Histochem J.* 1981;13:931-9.
- 15) Peterson F, Borch K, Franzén LE. Prevalence of subtypes of intestinal metaplasia in the general population and in patients with autoimmune chronic atrophic gastritis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37:262-266.
- 16) Eriksson NK, Kärkkäinen PA, Färkkilä MA, Arkkila PE. Prevalence and distribution of gastric intestinal metaplasia and its subtypes. *Dig Liv Dis* 2008; 40:355-360.
- 17) Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G, Tannenbaum S, Collazos T, Ruiz B. Gastric precancerous process in a high risk population: cross-sectional studies. *Cancer Res* 1990;50:4731-4736.
- 18) Li Y, Chang X, Zhou W et al. Gastric intestinal metaplasia with basal gland atypia: a morphological and biologic evaluation in a large Chinese cohort. *Hum Pathol* 2013;44:578-590.
- 19) de Vries AC, Meijer GA, Looman CWN et al. Epidemiological trends of pre-malignant gastric lesion: a long-term nationwide study in the Netherlands. *Gut* 2007; 56:1665-70.
- 20) Morales TG, Sampliner RE, Camargo E, Marquis S, Garewal HS, Fennerty MB. Inability to noninvasively diagnose gastric intestinal metaplasia in hispanics or

- reverse the lesion with *Helicobacter pylori* eradication. *J Clin Gastroenterol* 2001;32:400-404.
- 21) Russo A, Maconi G, Spinelli P, Di Felice G, Eboli M, Andreola S, Ravagnani F, Settsoldi D, Ferrari D, Lombardo C, Bertario L. Effect of lifestyle, smoking, and diet on development of intestinal metaplasia in *H.Pylori*-positive subjects. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1402-1408.
 - 22) Rubio CA, Hirota T, Itabashi M, Hirohashi S, Kato Y. Quantitation of gastric intestinal metaplasia by morphometry in Japanese patients. *Jpn. J. Cancer Res.* 1992;83:495-498.
 - 23) Garewal H, Fennerty B, Sampliner R, Ramsey L. Demonstration of a field defect in gastric intestinal metaplasia by biological marker analysis. *Cancer Epidemiol Biom Prev* 1994;3:683-686.
 - 24) Cassaro M, Ruge M, Gutierrez O, Leandro G, Graham D, Genta RM. Topographic patterns of intestinal metaplasia and gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1431-1438.
 - 25) Correa P, Piazuelo B, Wilson KT. Pathology of gastric intestinal metaplasia: clinical implications. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:493-498.
 - 26) Liu Q, The M, Ito K et al. CDX2 expression is progressively decreased in human gastric intestinal metaplasia, dysplasia and cancer. *Modern Pathology* 2007;20:1286-1297.
 - 27) Jong HS, Park YI, Kim S et al. Up-regulation of human telomerase catalytic subunit during gastric carcinogenesis. *Cancer* 1999;86:559-565.
 - 28) Yu J, Leung WK, Ng EKW et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on expression of cyclin D2 and p27 in gastric intestinal metaplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1505-1511.
 - 29) Holmes K, Egan B, Swan N, O'Morain C. Genetic mechanisms and aberrant gene expression during the development of gastric intestinal metaplasia and adenocarcinoma. *Curr Genomics* 2007;8:379-397.
 - 30) Ruibal A, Barandela J, Pubul V, Rodriguez J. Expresión de CD44v6 en carcinomas escamosos de pulmón. Asociación con altas concentraciones de EGFR, proteína erbB2 y elevada proliferación celular. *Oncología*, 2004;27:499-504.
 - 31) Lou G, GaoY, Ning XM, Zhang QF. Expression and correlation of CD44v6, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-2, and matrix metalloproteinases-9 in Krukenberg tumor. *World J Gastroenterol* 2005;11:5032-5036.
 - 32) da Cunha CB, Oliveira C, Wen X et al. *De novo* expression of CD44

variants in sporadic and hereditary gastric cancer. *Laboratory Investigation* 2010;90:1604-1614.

- 33) Tatematsu M., Tsukamoto T., Inada K. Stem cells and gastric cancer: role of gastric and intestinal mixed intestinal metaplasia. *Cancer Sci* 2003;94:135-141
- 34) Meining A, Miehlke S, Bayerdörffer E, Stolte M. Atrophy-metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in the stomach: reality or merely an hypothesis? *Best Practice & Research Clin Gastroenterol* 2001;5:983-998.
- 35) Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Scientific Publications* 2004;157:327-349.
- 36) Wada R, Yamaguchi T, Tanizaki T. Mucin phenotypic expression and p53 gene abnormality of gastric super-minute well-differentiated adenocarcinoma: re-evaluation with relationship between histogenesis of well-differentiated adenocarcinoma and intestinal metaplasia in distal stomach. *J Carcinogenesis* 2005;4:14-20.
- 37) Cassaro M, Rugge M, Tieppo C et al. Indefinite for non-invasive neoplasia lesions in gastric intestinal metaplasia: the immunophenotype. *J Clin Pathol* 2007;60:615-621.
- 38) Miwa H, Wada R, Nagahara A, Endo K, Watanabe S, Sato N. A dislocated and enlarged proliferative zone in human gastric intestinal metaplasia. *Cancer Letters*. 1996;103:33-39.