

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:  
CLÍNICA MÉDICA**

**ESTUDO DA CARCINOGENESE DO ADENOCARCINOMA DE  
ESÔFAGO: ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA E MOLECULAR DO  
GENE p53 EM PACIENTES COM METAPLASIA INTESTINAL DA  
CÁRDIA E COM ESÔFAGO DE BARRETT .**

**AUTOR: Fábio Segal**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. João Carlos Prolla  
CO-ORIENTADORA: Prof. Dra. Sandra Leistner**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
2002**

**S454e** Segal, Fábio

Estudo da carcinogênese do adenocarcinoma de esôfago : análise imunohistoquímica e molecular do gene p53 em pacientes com metaplasia intestinal da cárdia e com esôfago de Barrett / Fábio Segal ; orient. João Carlos Prolla ; co-orient. Sandra Leistner. – Porto Alegre, 2002.

103 f. :il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina : Clínica Médica.

1. Neoplasias esofágicas. 2. Imunohistoquímica. 3. Biologia Molecular. 4. Gene p53. 5. Adenocarcinoma. 6. Esôfago. 7. Esôfago de Barrett. I. Prolla, João Carlos. II. Leistner, Sandra. III. Título.

NLM: WI 250

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## ÍNDICE

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| LISTA DE FIGURAS   | I             |
| LISTA DE TABELAS   | I             |
| LISTA DE ABREVIATURAS  | II            |
| I. INTRODUÇÃO  | 2             |
| 1. EPIDEMIOLOGIA   | 2             |
| 2. FISIOPATOGÊNESE   | 3             |
| II. REVISÃO DA LITERATURA  | 5             |
| 1. ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS   | 5             |
| 1.1 ESÔFAGO DE BARRETT DE SEGMENTO CURTO<br>E METAPLASIA INTESTINAL DA CÁRDIA    | 7             |
| 1.2 ESÔFAGO DE BARRETT   | 9             |
| 2. ALTERAÇÕES GENÉTICAS NA CARCINOGENESE   | 10            |
| 3 . GENES ENVOLVIDOS NA CARCINOGENESE  | 12            |
| 4. TIPOS DE MUTAÇÕES   | 13            |
| 4.1 POLIMORFISMOS OBSERVADOS NO GENE p53   | 14            |
| 5. O GENE p53 E O CICLO CELULAR  | 15            |
| 6. TÉCNICAS LABORATORIAIS  | 18            |
| 6.1 EXTRAÇÃO DE DNA  | 18            |
| 6.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)   | 19            |
| 6.3 ELETROFORESE   | 20            |
| 6.4 SSCP (SINGLE-STRAND CONFORMATION<br>POLYMORPHISM)                            | 21            |
| 7. FONTES DE DNA   | 21            |
| 8. IMUNOREATIVIDADE DA PROTEÍNA p53 NO<br>ESÔFAGO DE BARRETT E NO ADENOCARCINOMA | 22            |

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| 9. MUTAÇÕES DESCRITAS NO ESÔFAGO DE BARRETT | 25            |
| 10. PERDA DA HETEROZIGOSIDADE               | 28            |
| 11. INSTABILIDADE GENÔMICA                  | 30            |
| 12. PERSPECTIVAS                            | 33            |
| <br>  |               |
| III. OBJETIVOS DO ESTUDO                    | 33            |
| IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS              | 34            |
| V. ARTIGO EM INGLÊS                         | 45            |
| VI. VERSÃO DO ARTIGO EM PORTUGUÊS           | 72            |
| VII. ANEXOS                                 | 101           |
| ANEXO 1. CONSENTIMENTO INFORMADO            | 102           |
| ANEXO 2. FICHA DE REGISTRO DE PACIENTES     | 103           |



## LISTA DE FIGURAS

|   | Página |
|---|--------|
| • FIG 1 - Seqüência patogênica do Esôfago de Barrett<br>ao adenocarcinoma             | 4      |
| • FIG 2 - Papel do p53 no Ciclo Celular   | 18     |
| • FIG 3 - Representação esquemática do processo<br>de perda de heterozigosidade       | 28     |
| • FIG 4 - Modelo de instabilidade genômica e evolução clonal no Esôfago de<br>Barrett | 31     |
| • FIG 5 - Representação esquemática de distribuição das bandas<br>no gel de SSCP      | 32     |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| • TAB 1 - Polimorfismos no p53 que não alteram a seqüência de aminoácidos | 14 |
| • TAB 2 - Polimorfismos no p53 que alteram a seqüência de aminoácidos     | 15 |

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**A:** adenina

**G:** guanina

**C:** citosina

**T:** timina

**p53:** gene p53

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico

**cDNA:** DNA complementar

**MIC:** Metaplasia Intestinal da Cárdia

**EB:** Esôfago de Barrett

**LOH:** Loss of Heterozigosity  
(Perda da Heterozigosidade)

**GI:** Genomic Instability  
(Instabilidade Genômica)

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*  
(Reação em Cadeia da Polimerase)

**SSCP:** *Single-Strand Conformation Polymorphism*  
(Análise de Conformação de Cadeia Simples)

**HCPA:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**HMV:** Hospital Moinhos de Vento

## AGRADECIMENTOS

A minha esposa Suanni por todo amor, pela dedicação e compreensão, que permitiu que concluíssemos mais uma etapa em nossa longa jornada.

Aos meus pais Berta e David Henrique, pelo amor incondicional, pelo talento de superar o meio, por todo esforço para que seus filhos encontrassem a felicidade e a realização profissional.

Ao meu querido irmão Salomão, exemplo de perseverança na busca de seus ideais e pela felicidade de ter uma bela família.

Ao meu querido irmão Jair, pelos muitos momentos compartilhados de nossas vidas, sempre juntos.

Ao Dr. João Carlos Prolla, pela grandeza da humildade, pela capacidade de enxergar além dos horizontes, pela competência de ser bem-sucedido e por ser um verdadeiro Professor.

A Dra. Sandra Leistner Segal, que, além de Co-Orientadora, é minha cunhada, por todo seu empenho, paciência e criatividade, que tornou esta pesquisa possível.

À Ana Paula B. Kaspary, por sua dedicação, cujo auxílio foi fundamental para a realização deste trabalho.

As Doutoras Maria Francisca Torres Lopes e Mônica Blaya de Azevedo e aos técnicos do Setor de Imunohistoquímica do Laboratório AnatPat, por proporcionarem a infra-estrutura necessária e pelo tempo despendido na preparação das lâminas.

Ao amigo Dr. Vinicius Silva, por sua contribuição na revisão das lâminas e pelo incentivo nesta longa jornada.

A Equipe de Técnicos do Hospital Moinhos de Vento e, principalmente, aos funcionários do Setor de Endoscopia por todo cuidado com os pacientes, pelo apoio e colaboração para que esta pesquisa fosse bem-sucedida.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do HCPA pelo auxílio editorial e, especialmente, ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica pela disponibilidade e ajuda.

À Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro que permitiu à execução deste trabalho.

À Dra. Themis Reverbel da Silveira pelo exemplo de vida, pela inteligência, por sua incrível capacidade de construir e agregar, pela incansável vontade de tentar, mostrando, com talento e competência, que é possível passar pela vida deixando marcas e tornando os sonhos uma realidade.

Aos amigos Cláudio H. Wolff e Ismael Maguilnik, por me inspirarem na busca das melhores soluções.

**Não me leias se buscas  
flamante novidade  
ou sopro de Camões.  
Aquilo que revelo  
e o mais que segue oculto  
em vítreos alçapões  
são notícias humanas,  
simples estar-no-mundo,  
e brincos de palavra,  
um não-estar-estando  
mas de tal jeito urdidos  
o jogo e a confissão  
que nem distingo eu mesmo  
o vivido e o inventado.  
Tudo vivido? Nada.  
Nada vivido? Tudo.  
A orelha pouco explica  
de cuidados terrenos  
e a poesia mais rica  
é um sinal de menos.**

**( Poema de Drummond que  
serviu de orelha para o livro  
*Poemas, 1959*).**

### **Seis Propostas para o próximo Milênio**

- 1- Leveza**
- 2- Rapidez**
- 3- Exatidão**
- 4- Visibilidade**
- 5- Multiplicidade**
- 6- Consistência**

**Estas são as seis qualidades que apenas a  
literatura pode salvar, virtudes a nortear não apenas as  
atividades dos escritores,mas cada um dos gestos de  
nossa existência.**

**(Ítalo Calvino,1985)**

# INTRODUÇÃO



## I. INTRODUÇÃO

### 1. EPIDEMIOLOGIA

O Esôfago de Barrett é uma complicação da doença do refluxo gastroesofágico, sendo encontrado em 10 a 12% dos pacientes sintomáticos, com queixas de refluxo que se submetem à endoscopia (Spechler, 1986; Winters et al., 1987; Mann et al., 1989; Haggitt, 1994). Entretanto, como a maioria dos pacientes com Esôfago de Barrett é assintomática, a real prevalência dessa condição é desconhecida, podendo ser 20 vezes maior do que a descrita (Cameron, 1990).

A grande importância do Esôfago de Barrett reside no fato de ser uma desordem pré-maligna, levando ao adenocarcinoma em 10% dos pacientes (Naef et al., 1975; Haggitt et al., 1978; Skinner et al., 1983; Thompson et al., 1983). Além disso, esta neoplasia tem aumentado em frequência mais rapidamente que todos outros tumores malignos, nos EUA e na Europa, nas últimas duas décadas (Blot et al., 1991; Cameron, 1992; Pera et al., 1993). A incidência de adenocarcinoma em pacientes submetidos à vigilância endoscópica por Esôfago de Barrett é estimada em 1 por 100-200 pacientes/ano (Cameron et al., 1985; Spechler, 1987; Drewitz et al., 1997). O risco preciso de desenvolvimento do adenocarcinoma em pacientes com esôfago de Barrett é desconhecido, entretanto varia entre 0,2% a 2,1% por ano em pacientes sem displasia, o que representa cerca de 30 a 40 vezes mais que a população em geral (Provenzale et al., 1994).

Pelo fato da incidência do adenocarcinoma esofágico estar aumentando mais rapidamente do que qualquer outra neoplasia maligna, muitos autores têm exhaustivamente ressaltado a importância da investigação endoscópica anual (Provenzale et al., 1999). Entretanto, um estudo observacional, após a vigilância endoscópica por 10 anos, em pacientes com Esôfago de Barrett, demonstrou que esta estratégia tem um valor limitado, pelo baixo número de neoplasias identificadas (Macdonald et al., 2000).

A evolução para o adenocarcinoma é um processo de múltiplas etapas que se caracteriza não só morfológicamente pela seqüência metaplasia -> displasia -> neoplasia, como também por uma instabilidade genômica somática adquirida, com perda dos controles proliferativos e aparecimento de clones de células epiteliais anormais (Levine, 1997).

## 2. FISIOPATOGÊNESE

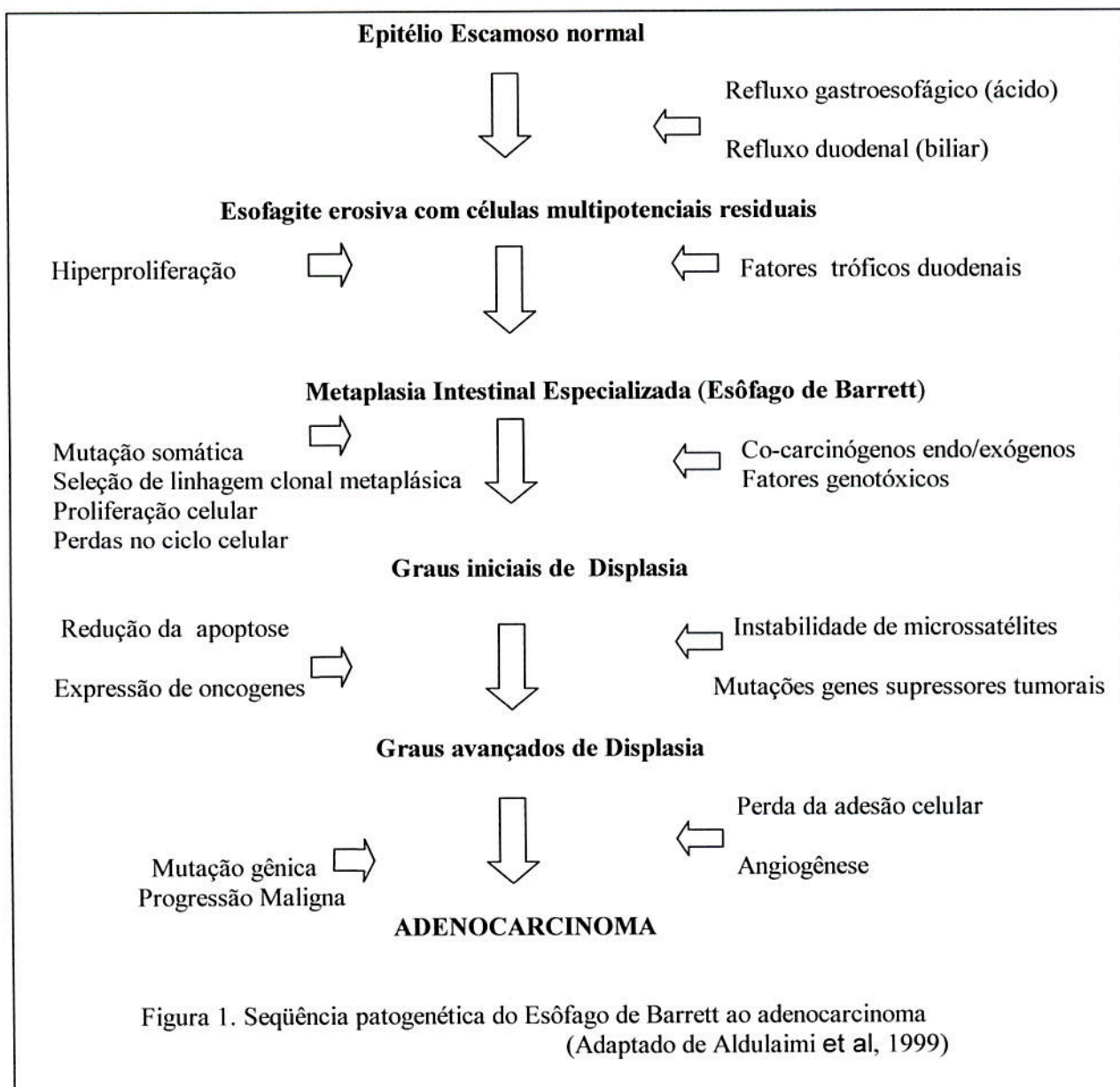
Entre os fatores de risco relacionados à progressão para um epitélio colunar especializado está a doença do refluxo gastroesofágico (DRGE). Entretanto, o efeito do refluxo intermitente ou contínuo de ácido, bile e de outros conteúdos gastroduodenais sobre o epitélio esofágico e sua contribuição na seqüência metaplasia/displasia/adenocarcinoma necessita melhor elucidação. Entre os fatores de risco adicionais de menor relevância encontram-se: raça branca, sexo masculino, obesidade, sendo que consumo de álcool, tabagismo, infecção pelo *Helicobacter pylori*, quimioterapia prévia são considerados fatores de risco de significância mínima (Aldulaimi et al., 1999).

O refluxo de secreções cloridro-pépticas e duodenais acarreta um efeito lesivo à mucosa esofágica. Após a desnudação do epitélio escamoso, as células progenitoras primordiais multipotenciais e indiferenciadas (*stem cells*) migram para a superfície desnudada e substituem o epitélio escamoso. O refluxo persistente proporcionaria um meio anormal na qual pode ocorrer uma diferenciação colunar destas células imaturas e explicaria a diversidade celular observada na metaplasia colunar especializada (Attwood et al. 1989; Lin et al., 1991).

Após a metaplasia, a próxima etapa na seqüência é o desenvolvimento de displasia. A prevalência de displasia na metaplasia intestinal especializada varia entre 10 a 20% (Gillen et al., 1988; Ireland et al., 1991). A displasia de baixo grau é acompanhada pela perda de controle de proliferação das células multipotenciais (*stem cells*) com expressão



gênica inapropriada, acompanhada de estimulação de fatores de crescimento locais e citocinas (Jankowski et al., 1993<sup>a,b</sup>). A progressão para a displasia de alto grau, que está associada ao adenocarcinoma em cerca de 50% ou mais dos casos, é acompanhada pelo aumento da proliferação, aneuploidia, instabilidade de microssatélites, além da perda de adesão celular e angiogênese (Aldulaimi et al., 1999). Esta seqüência de eventos esta ilustrada na figura 1.



## II - REVISÃO DA LITERATURA

### 1. ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS

A Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) em sua evolução pode produzir alterações na mucosa esofágica, que variam desde a esofagite leve à metaplasia intestinal da cárdia, o Esôfago de Barrett, a displasia e a neoplasia. Metaplasia é definida como a conversão de um epitélio diferenciado por outro, sendo que o epitélio substituído não está presente normalmente neste órgão. A metaplasia geralmente ocorre em área de injúria ou inflamação persistente, no caso seria uma resposta adaptativa ao dano à mucosa esofágica pelo refluxo (Souza et al., 1997).

A esofagite de refluxo prolongada está relacionada com a inflamação e com a morte celular. Observa-se, em resposta, um aumento tanto na altura da zona de proliferação quanto no comprimento da papila basal, acompanhadas por um aumento do epitélio esofágico, levando as células multipotenciais (*stem cells*) para a extremidade das papilas, tornando-as mais superficiais e permitindo uma maior exposição a fatores nocivos. Estes agentes agressores podem levar a morte destas células, ao dano celular ou a seleção de clones com fenótipo glandular do epitélio de Barrett (Aldulaimi et al., 1999).

Até a década de 80, a definição de Esôfago de Barrett era muito vaga e relacionada à presença de epitélio colunar esofágico. Uma definição mais refinada ocorreu com resultado de um melhor entendimento das relações anatômicas obtido pelo desenvolvimento da endoscopia e pela importância da presença da metaplasia intestinal. A popularização da endoscopia permitiu o reconhecimento daqueles pacientes que tinham hérnia hiatal e esofagite, além de determinar precisamente onde terminava o esôfago e onde começava o estômago. A grande dificuldade era identificar a zona de transição entre o epitélio escamoso esofágico e o epitélio colunar gástrico. Em 1961, Hayward publicou uma excelente revisão procurando definir conceitualmente a cárdia. Este autor considerou

a cárdia como a porção final do esôfago entre a inserção do ligamento freno-esofágico e a junção esofagogástrica. Descreveu também a junção escamo-colunar como a área junto à inserção desse ligamento onde a cárdia “normal” apresentaria um pequeno segmento de epitélio colunar, medindo entre 1 a 2 cm, que se estenderia proximalmente desde a junção esofagogástrica até à junção escamo-colunar. (DeMeester et al, 2000)

Para evitar superestimar o diagnóstico de Esôfago de Barrett resultante tanto da impossibilidade de reconhecer a porção tubular de um estômago herniado à endoscopia bem como a dificuldade em determinar os 2 cm de mucosa colunar encontrado no esôfago distal, no início da década de 80, estabeleceu-se que, para o diagnóstico de Esôfago de Barrett, era necessária a presença de, no mínimo, 3 cm de epitélio colunar acima da junção gastroesofágica (DeMeester et al, 2000).

O potencial maligno associado ao Esôfago de Barrett motivou a busca de critérios morfológicos mais rígidos para se estabelecer o papel da metaplasia intestinal na evolução para o adenocarcinoma. Em 1951, Boscher e colaboradores descreveram a presença de células calciformes em esôfago distal como indicativo de metaplasia intestinal. Em 1976, Paull e colaboradores descreveram a presença de 3 tipos distintos de epitélio colunar dentro do esôfago, além do epitélio escamoso estratificado. Poderiam ser encontrados o epitélio tipo fúndico, composto por células parietais e principais; o epitélio tipo juncional composto por glândulas mucosa, sem células parietais e o epitélio colunar especializado composto por uma superfície viliforme e criptas , além de células calciformes, semelhante à mucosa intestinal. Em 1978, Haggitt sugeriu que a mucosa colunar do tipo intestinal era uma condição pré-maligna e que este seria o único tipo epitelial associado ao adenocarcinoma, o que posteriormente foi confirmado por outros investigadores (Skinner et al.,1983; Reid et al.,1987). Dessa forma, o diagnóstico histológico assumiu grande importância, e para o diagnóstico de Esôfago de Barrett era



necessária tanto a presença de 3 cm de mucosa colunar no esôfago distal quanto de metaplasia intestinal ao exame histopatológico (DeMeester et al, 2000).

Observou-se também que este epitélio colunar especializado é uma metaplasia intestinal incompleta, pois não possui células intestinais absortivas, além de ser um epitélio funcionalmente imaturo (Rothery et al., 1986; Gottfried et al., 1989). Em indivíduos normais, pode-se encontrar o epitélio fúndico e juncional, mas a presença do epitélio colunar especializado é considerado anormal (Weinstein et al, 1984; Reid et al, 1985; Hamilton et al, 1987; Weston et al, 1997). Raramente focos de metaplasia intestinal completa, isto é, presença de células absortivas e células de Paneth encontram-se misturadas ao epitélio do Esôfago de Barrett (Haggitt, 1994).

As células colunares tipo cárdicas apresentam grânulos de muco assemelhando-se às células secretoras gástricas, quando se utiliza uma coloração convencional (Hematoxilina-Eosina). Entretanto, com o uso de uma coloração especial (Alcian-Blue em pH 2,5) estas células colunares ficam com uma tonalidade de positividade, mas pelo fato de não terem forma de “barrilete”, diferem das células caliciformes que se coram mais intensamente com este corante. Dessa forma, estas células não devem ser confundidas com aquelas observadas no epitélio do Esôfago de Barrett (Haggitt, 1994).

## **1.1 ESÔFAGO DE BARRETT DE SEGMENTO CURTO (“SHORT BARRETT”) E**

### **METAPLASIA INTESTINAL DA CÁRDIA**

Uma questão amplamente discutida era o que é considerada uma mucosa normal na junção esofagogástrica. Observou-se que em indivíduos normais, sem refluxo gastroesofágico, o epitélio escamoso esofágico está ligado diretamente à mucosa oxíntica do fundo gástrico, não ocorrendo interposição de segmentos de epitélio cárdico (tipo juncional). Entretanto, a presença de pequenas projeções de mucosa cárdica é comum em adultos (DeMeester et al., 2000). A hipótese de que a mucosa cárdica desenvolve-se como consequência à injúria induzida pelo ácido é respaldada tanto por estudos

experimentais (Bremner et al.,1970) quanto por ensaios clínicos, sugerindo-se que a inflamação na cárdia (cardite) pode representar a manifestação mais precoce de DRGE e a persistência do refluxo pode levar a colunarização do epitélio escamoso (Oberg et al,1997). Observou-se que biópsias colhidas de uma junção esofagogástrica macroscopicamente de aspecto normal demonstraram a presença de focos microscópicos de metaplasia intestinal em mucosa cárdica, o que foi denominado de Metaplasia Intestinal da Cárdia (DeMeester et al, 2000).

A presença de mucosa cárdica é uma condição benigna e somente com a transformação em metaplasia intestinal ela adquire a condição de alteração pré-maligna. O evento celular específico que induz a mudança da mucosa cárdica para uma intestinalizada é desconhecido, no entanto, parece ser um evento progressivo, pela evolução para a displasia e o adenocarcinoma (Chandrassoma, 1997). Não está claro se o desenvolvimento de metaplasia intestinal representa uma alteração fenotípica secundária à indução por genes ou se é um evento mutacional dentro das células colunares esofágicas (DeMeester et al, 2000).

O desenvolvimento dos equipamentos de endoscopia e a disponibilidade de medicamentos inibidores da secreção ácida levando a cicatrização do processo inflamatório permitiu a identificação de pequenas lingüetas de mucosa (< 3cm), contendo epitélio colunar, projetando-se acima da junção gastroesofágica, o que se chamou de Esôfago de Barrett de Segmento Curto, estando associada ao refluxo e apresentando potencial maligno (Clark et al., 1997).

Dessa forma, tanto a metaplasia intestinal limitada à junção esofagogástrica ou Metaplasia Intestinal da Cárdia, quanto o Esôfago de Barrett estão relacionados diretamente à DRGE e não estão associados nem com a infecção pelo *Helicobacter pylori* nem com a metaplasia intestinal do estômago (Oberg et al.,1997; Weston et al.,1997; Nandurcar et al.,1997).



## 1.2 ESÔFAGO DE BARRETT

O diagnóstico do Esôfago de Barrett é sugerido endoscopicamente se o epitélio colunar, róseo e aveludado, se introduz no esôfago na forma de projeções digitiformes, ilhotas ou circunferencialmente, com a junção escamo-colunar posicionando-se proximalmente. Quanto ao aspecto histológico, a relação entre Metaplasia Intestinal da Cárdia, Esôfago de Barrett de Segmento Curto (< 3 cm) e Esôfago de Barrett propriamente dito (> 3 cm) permanece ainda controversa. Entretanto, a definição atual considera Esôfago de Barrett como a mudança de um epitélio escamoso estratificado para um epitélio colunar, de qualquer extensão, visível endoscopicamente e que a biópsia demonstre a presença de metaplasia intestinal especializada (Sampliner, 1998). Dessa forma, a presença de metaplasia intestinal restrita à junção esofagogástrica não é considerada Esôfago de Barrett (DeMeester et al., 2000).

Durante a endoscopia podem ser utilizados diversos corantes para aumentar a sensibilidade diagnóstica do Esôfago de Barrett. O azul de toluidina cora seletivamente a mucosa metaplásica, deixando inalterado o epitélio escamoso (Chobanian et al., 1987). O lugol é um outro corante vital que faz contraste entre o epitélio escamoso e o colunar. Woolf e colaboradores (1989) relatam uma sensibilidade de 89%, uma especificidade de 93% e uma acurácia de 91%, utilizando o lugol em paciente com Esôfago de Barrett. Já o azul de metileno a 0,5% detecta áreas de metaplasia intestinal corando as células displásicas, observando-se alta sensibilidade (95%), especificidade (97%), valor preditivo positivo (98%) e negativo (92%) na detecção de metaplasia intestinal (Canto et al., 1996).

## 2. ALTERAÇÕES GENÉTICAS NA CARCINOGENESE

A proliferação e diferenciação celular dependem de eventos coordenados que incluem (1) duplicação precisa do DNA, previamente à divisão celular; (2) divisão equitativa dos cromossomos durante a divisão celular; (3) divisões especificamente programadas para cada tipo celular, e (4) controle diferencial da expressão gênica no tempo e no espaço. O equilíbrio necessário para o funcionamento harmônico desses eventos depende, por sua vez, de mecanismos biológicos que assegurem (1) incorporação correta das bases nitrogenadas na molécula de DNA em replicação; (2) ligação dos cromossomos ao fuso mitótico e segregação das cromátides irmãs na anáfase, e (3) recepção e tradução corretas dos sinais que induzem a proliferação e a diferenciação celular (Bevilaqua et al, 1997; Louro, 2000).

Um gene é um segmento de DNA que contém o arquivo completo da seqüência de aminoácidos para fabricar uma cadeia polipeptídica específica, como uma proteína. Como as mutações ocorrem ao acaso, sem qualquer planejamento, na maioria das vezes, as células com um gene mutante são menos eficientes no desempenho de suas funções (Farah, 1997).

A carcinogênese se desenvolve em múltiplas etapas, numa seqüência de eventos que inicia com a alteração genética em uma simples célula. Se esta alteração genética conferir uma vantagem ao crescimento celular, esta célula progenitora pode expandir-se com a produção de um clone anormal de células (Nowell, 1976). Essa alteração também confere uma instabilidade genômica no clone de células, levando ao aumento subsequente e a seleção seqüencial de populações celulares com maior capacidade de crescimento que as células vizinhas (Haggitt, 1994). Assim, todo tumor deriva de uma célula inicialmente normal, mas que sofreu uma mutação e passou a proliferar autonomamente, produzindo um clone que dará origem à massa tumoral.

A neoplasia é o resultado de uma seleção natural entre células somáticas e aparece quando alguns controles celulares independentes são perdidos, em decorrência de um número crítico de mutações que irão afetar o crescimento ou a diferenciação celular (Bishop, 1991). A perda do controle ocorre em decorrência de alterações envolvendo genes ou seus produtos, que estão relacionados com o sistema de reparo do DNA (*mismatch repair genes*) e com genes relacionados ao controle do ciclo celular e com a tradução dos sinais de diferenciação celular, como os oncogenes e os genes supressores tumorais. Tais alterações, genericamente chamadas de mutações, decorrem de:

- Mudanças discretas na molécula do DNA, que resultam na substituição de bases nitrogenadas, sendo detectadas em nível molecular e chamadas de mutação de ponto.
- Mudanças mais grosseiras, que comprometem a estrutura do cromossoma ou alteram o número cariotípico normal, sendo detectadas por análise citogenética.

A ocorrência espontânea de mutações é um evento raro, calculada em torno de  $1,4 \times 10^{-10}$  mutações em pares de bases por geração celular ou em  $1 \times 10^{-5}$  mutações por locus, por gameta. A ocorrência de mutações é, contudo, significativamente aumentada pela ação de diversos agentes, que são capazes de lesar o DNA de um modo ou em uma frequência tal que escapam aos mecanismos de controle e reparo do DNA. Esses agentes mutagênicos são de natureza física, química ou biológica e potencialmente podem levar à transformação maligna, induzindo mutações de ponto ou alterações cromossômicas que envolvam diretamente oncogenes ou genes supressores tumorais ou, de modo indireto, lesando genes de reparo do DNA (Bevilacqua et al, 1997).



**3 . GENES ENVOLVIDOS NA CARCINOGENESE** (Bevilacqua et al, 1997; Farah, 1997; Louro, 2000).

- a) Oncogenes:** São genes altamente conservados na evolução das espécies e seus produtos são reguladores importantes do crescimento e diferenciação de células, pois são genes que estimulam a divisão celular. Nas células normais, a expressão destes é rigorosamente regulada, logo não causam malignidade. Normalmente codificam proteínas reguladoras do ciclo celular, da diferenciação ou migração celulares, cujos produtos mutantes causam profundas alterações destas funções celulares, levando à transformação maligna. A versão mutante é excessivamente ativa, tendo um caráter dominante, pois um único alelo pode afetar o fenótipo da célula. Entretanto, nenhum oncogene é capaz de induzir, isoladamente, uma célula normal para o fenótipo maligno.
- b) Genes supressores tumorais:** São genes que codificam proteínas inibidoras da proliferação celular, ou relacionadas com a morte celular programada (apoptose). A perda, inativação ou mutação, durante a carcinogênese, leva à proliferação celular “desregulada”, à perda da integridade do DNA ou à inibição da apoptose. Mutações nesses genes têm caráter recessivo, sendo necessária a perda das duas cópias do gene normal para manifestação desta perda de função reguladora, que, nesses casos, resulta na ausência da proteína. As alterações mais freqüentemente encontradas nos tumores associados a esses genes são deleções que propiciam a inativação gênica, por perda total ou parcial da seqüência correspondente, ou mutações de ponto que resultam em proteína inativa.
- c) Genes de Reparo do DNA (mismatch repair genes):** A reprodução fiel de uma célula exige que esses eventos sejam coordenados na seqüência correta, para que a mitose não aconteça antes de todos os cromossomas terem sido replicados, e a célula

tenha duplicado de tamanho. Estes genes são responsáveis pela manutenção da integridade do genoma e fidelidade da transferência de informações.

#### **4 – TIPOS DE MUTAÇÕES** (Chang et al., 1995; Bosso, 2000)

A aplicação da análise molecular na investigação de doenças genéticas começou a ser utilizada como avaliação rotineira em laboratórios no decorrer da última década.

Um marco essencial para a aplicação dos fundamentos de biologia molecular na rotina laboratorial foi o desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), no final dos anos 80, a qual é utilizada atualmente para identificação de mutações e/ou polimorfismos presentes nos pacientes. As doenças genéticas são causadas por alterações (mutações e/ou polimorfismos) no DNA as quais podem ser identificadas por protocolos laboratoriais de análise molecular. Existem vários tipos de mutações associadas às doenças genéticas e diferentes técnicas laboratoriais mais frequentemente utilizadas para detectar alguma alteração na seqüência normal de um gene.

Uma mutação é simplesmente uma mudança na estrutura primária do DNA que consiste em uma seqüência linear de pares de nucleotídeos representando a informação química armazenada. O efeito que uma mutação tem no fenótipo de um organismo varia do "trivial" ao "letal", dependendo da propriedade da proteína codificada pelo gene alterado e de como aquela alteração afeta o desenvolvimento e a manutenção do nosso corpo.

Muitas mutações produzem efeitos fenotípicos, acarretando conseqüências tais como cor diferente de cabelo e que são chamadas mutações não causadoras de doença (ou polimorfismos), enquanto outras podem ter conseqüências mais graves tais como aquelas que levam a doenças e que são denominadas mutações causadoras de doença.

As mutações podem ser germinativas, ocorrem em células germinais que são aquelas destinadas a se tornarem ovo ou esperma. Estas mutações não afetam as

peças nas quais ocorrem, mas podem ser transmitidas e causar danos em futuras gerações. As mutações somáticas, por outro lado, ocorrem em células de diferentes órgãos do corpo e podem afetar o fenótipo do seu portador, mas não são transmitidas para os seus descendentes. Esta classe de mutações é a mais envolvida no desenvolvimento do câncer.

#### 4.1- POLIMORFISMOS OBSERVADOS NO GENE p53.

Além das mutações associadas ao câncer, pelo menos 10 polimorfismos já foram descritos no gene p53, tanto em regiões codificantes quanto não codificantes do gene. O polimorfismo se caracteriza pela existência, em uma população, de dois ou mais alelos de um gene, sendo que a frequência dos alelos mais raros é maior do que uma mutação recorrente sozinha, em geral maior que 1% (Lackie et al., 1999).

Em relação ao gene p53 somente em 2 destes polimorfismos ocorre a alteração na seqüência de aminoácidos da proteína. As tabelas abaixo listam as variações observadas nos éxons 2, 4 e 6. (tabela I e II). (IARC – 2001)

**Tabela I - Polimorfismos no p53 que não alteram a seqüência de aminoácidos.**

| Éxon   | Códon | Tipo de Mutação | Alelo A | Alelo B | Descrição  | Prevalência | Referência            |
|--------|-------|-----------------|---------|---------|------------|-------------|-----------------------|
| Éxon 2 | 21    | Ponto           | GAC     | GAT     | Silenciosa | ?           | Ahuja et al. (1990)   |
| Éxon 4 | 36    | Ponto           | CCG     | CCA     | Silenciosa | 4%          | Felix et al. (1994)   |
| Éxon 6 | 213   | Ponto           | CGA     | CGG     | Silenciosa | 11%         | Carbone et al. (1991) |



**Tabela II - Polimorfismos no p53 que alteram a seqüência de aminoácidos.**

| Éxon   | Códon | Tipo de Mutação | Alelo A | Alelo B | Descrição | Prevalência | Referência   |
|--------|-------|-----------------|---------|---------|-----------|-------------|--|
| Éxon 4 | 47    | Ponto           | CCG     | TCG     | Pro>Ser   | 1,5%        | Gerwin et al. (1990)<br>Felley-Bosco et al. (1993) |
| Éxon 4 | 72    | Ponto           | CGC     | CCC     | Arg>Pro   | Wild range  | Harris et al. (1994)<br>Beckman et al. (1994)      |

### 5 - O GENE p53 E O CICLO CELULAR (Weinberg, 1996; Scherr, 1996)

O ciclo celular é composto por uma série de etapas que são reguladas positiva ou negativamente por vários fatores. O gene supressor tumoral p53 localiza-se no braço curto do cromossoma 17, mais precisamente, na região 17p13.1, codificando uma proteína que é o principal regulador negativo deste ciclo estando envolvido na divisão, diferenciação celular e apoptose (Renault et al., 1993).

A alteração ou a inativação do p53 por mutação ou por interação com oncogenes pode levar a perda desta função reguladora, provocando o aumento no crescimento celular, que pode levar ao câncer (Levine, 1991; Cameron, 1992). Estas mutações são as alterações genéticas mais comuns nas neoplasias humanas, tanto que já foram descritas mais de 3000 mutações. O perfil das mutações é peculiar e estas podem ser resultantes da exposição ambiental a fatores genotóxicos. (Levine, 1991; Audrézet et al., 1996).

O ciclo de divisão celular consiste de quatro fases: G1 (Gap 1), S (Síntese do DNA), G2 (Gap2) e M (Mitose). (Ireland et al., 1997; Sjögren et al., 1996; Louro, 2000).

O efeito do gene p53 normal (*wild-type*) na proliferação celular inclui a regulação da transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular e um papel importante na

determinação da morte celular através da apoptose. O gene p53 parece exercer sua função como um fator controlador na fase G1/S do ciclo celular (Lane 1992; Hartwell, 1992).

Estas funções reguladoras parecem ser mediadas por interações da proteína p53 com seqüências específicas no DNA as quais permitem regulação de outros genes ao nível da transcrição, ou talvez por iniciar a replicação do DNA. Na presença de dano no DNA, a proteína p53 se acumula e promove a expressão do gene WAF1/Cip1, cujo produto protéico – p21 se liga a quinases ciclino-dependentes (CDK) e inibe sua atividade. Dessa forma, o ciclo celular é interrompido antes da síntese do DNA. À célula é dada a oportunidade de reparar o DNA lesado. Se tal reparo não ocorre de forma satisfatória, a presença do p53 íntegro pode alternativamente induzir a morte celular programada (apoptose) (Figura 2).

A progressão neoplásica do Esôfago de Barrett está associada a, pelo menos, 3 tipos de anormalidades no ciclo celular: a) mobilização das células na fase G0 e G1; b) perda do controle da transição entre a fase G1 e S e c) acúmulo das células na fase G2 (Reid et al., 1991).

A perda da função normal de p53 pode ocorrer em duas formas básicas (Chang et al 1995):

- Alterações no gene p53, determinando a ocorrência de proteína alterada;
- Inativação funcional da proteína p53, pela formação de complexos protéicos com oncoproteínas virais ou celulares ou pelo deslocamento da proteína para o citoplasma.

Alterações no gene p53 (Holstein et al., 1991; Chang et al 1995).

- a) Mutações do tipo de sentido trocado (*missense*): é a mais freqüente das alterações genéticas nos cânceres humanos, representando mais de 50% das alterações, envolvendo quase todos os tipos de tumores, especialmente

carcinomas colo-retais, pulmão, esôfago, estômago, fígado, mama e bexiga. Mais de 90% das mutações relatadas em tumores malignos encontram-se entre os éxons 5 e 9 do gene p53.

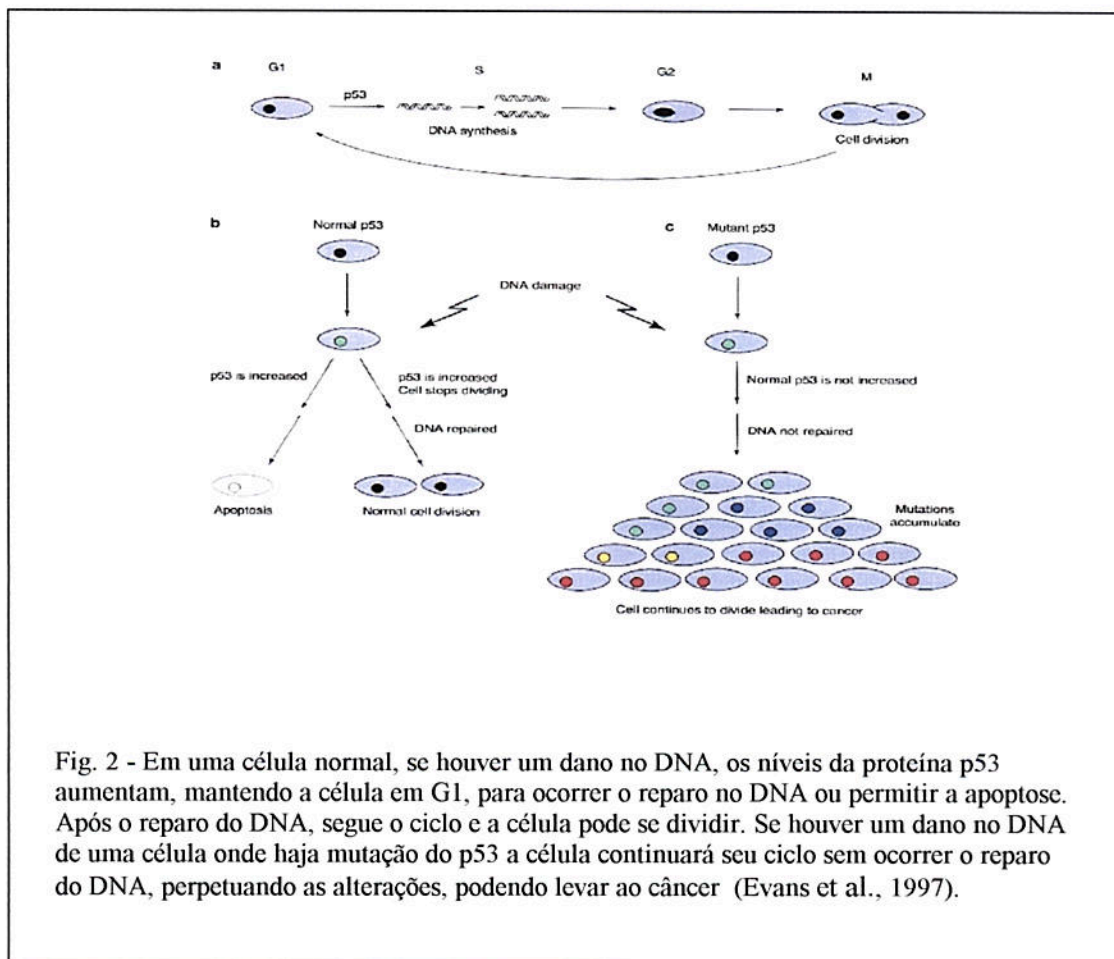
- b) Mutações sem sentido (*nonsense*): encontradas em até 5% dos carcinomas de pulmão, esôfago e outros tumores.
- c) Rearranjos genéticos: freqüentemente associados a osteosarcomas, sarcomas de tecidos moles, linfomas e leucemias mielóides crônicas.
- d) Perdas alélicas: ocorrem ocasionalmente em tumores de diferentes tipos de neoplasias como o câncer colo-retal, o carcinoma de mama, o câncer esofágico, os linfomas e os osteosarcomas.
- e) Mutações em linhas germinativas: associadas à síndrome de Li-Fraumeni e a um pequeno número de pacientes com sarcomas, câncer de mama e leucemias em crianças.

#### Inativação funcional da proteína p53

- a) Ligação à oncoproteína E6 do HPV (papilomavírus humano), envolvendo os carcinomas associados ao papilomavírus humano, particularmente os tumores do trato ano-genital.
- b) Ligação ao EBNA-5 e BZLF1 do EBV (Epstein-Baar vírus), envolvendo os linfomas e carcinomas naso-faríngeos associados ao EBV.
- c) Ligação ao HBsAg, encontrado nos carcinomas hepatocelulares primários.
- d) Ligação à oncoproteína MDM2: encontradas em até um terço dos sarcomas.
- e) Seqüestro ou deslocamento da proteína p53 no citoplasma celular: Devido ao fato da proteína p53 ser um fator de transcrição, somente a proteína localizada no núcleo pode agir como um regulador negativo da proliferação celular. O seqüestro da mesma no citoplasma impede sua ação supressora



tumoral. Ocorre em até um terço dos carcinomas de mama e em um pequeno número de carcinomas colo-retais com o gene p53 íntegro. (Holstein et al., 1991; Chang et al 1995).



## 6. TÉCNICAS LABORATORIAIS

### 6.1 – EXTRAÇÃO DE DNA (Bosso, 2000, Leistner, 2000)

A extração e purificação do DNA podem ser realizadas por protocolos que utilizam reagentes preparados no próprio laboratório ou através do uso de kits comerciais, os quais simplificam o procedimento, mas, em geral, aumentam o custo do exame.

Todos os protocolos se baseiam (1) no rompimento das células nucleadas, (2) no rompimento da membrana nuclear e (3) na separação do DNA das proteínas através da precipitação e posterior solubilização do DNA em solução aquosa.

A fonte de obtenção de DNA, assim como a técnica de extração do mesmo, influencia diretamente a qualidade e a quantidade do material ao final do processo. De um modo geral, a técnica de PCR pode ser realizada com pouca quantidade de DNA e mesmo com um DNA fragmentado.

## 6.2 - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é a técnica mais utilizada na análise molecular de doenças, sendo desenvolvida por Mullis, em 1985 (Saiki *et al*, 1988), permitindo a análise de regiões específicas de um gene ou fragmentos de cDNA. A PCR é um método *in vitro*, simples e rápido, que permite a síntese enzimática de seqüências específicas de DNA gerando até 10<sup>9</sup> cópias a partir de uma única molécula alvo. Esta técnica permite a detecção e a análise de seqüências gênicas específicas em uma pequena amostra de tecido ou células do paciente.

Uma reação de PCR padrão requer os seguintes componentes:

- DNA alvo: o DNA a ser amplificado;
- Oligonucleotídeos iniciadores (ou *primers*): em geral são dois pequenos oligonucleotídeos sintéticos que hibridizam com as regiões complementares no DNA alvo e adjacentes à região de interesse a ser analisada, servindo como um ponto de partida para a síntese de duas novas fitas de DNA;
- DNA polimerase: enzima que cataliza a formação de DNA a partir da adição de novos nucleotídeos complementares ao DNA alvo;
- Desóxi-ribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs): são os 4 nucleotídeos essenciais para a síntese de novas fitas de DNA pela DNA polimerase;



- Tampão de reação: fornece as condições de pH assim como o cofator para a reação.

A reação da cadeia da polimerase (PCR) constitui-se de uma série repetida de ciclos (em média de 30 a 35) envolvendo os seguintes passos:

1. Desnaturação do DNA → aquecimento da reação a 90-95°C para que o DNA alvo se apresente como fita simples.
2. Anelamento → resfriamento da reação para permitir a hibridização do *primer* com o DNA alvo de fita simples. Neste passo, a temperatura se baseia na  $T_m$  (*melting temperature*) dos *primers* que deve ser calculada de acordo com a sua composição em pares de base.
3. Extensão → a DNA polimerase sintetiza uma nova fita de DNA tendo como molde a fita original, e como início o sítio de anelamento dos *primers*. Neste passo a temperatura varia normalmente de 72 a 74°C, dependendo da temperatura ideal de atividade da enzima.

O resultado desta reação, que se completa em algumas horas, é o acúmulo exponencial de um fragmento específico cujas extremidades são definidas pelas terminações 5' dos *primers*.

### 6.3 – ELETROFORESE (Leistner, 2000)

A eletroforese é a técnica utilizada para separação de fragmentos de DNA, sendo utilizada para análise dos resultados de outros procedimentos laboratoriais, como extração de DNA, PCR, digestão com enzimas de restrição, etc. Ela consiste na aplicação de uma corrente elétrica por uma fase semimóvel (suporte), promovendo a migração de moléculas de acordo com a sua carga elétrica e peso molecular. A escolha do tipo e da concentração do suporte depende do tamanho dos fragmentos que se deseja separar e da necessidade de resolução dos mesmos, sendo utilizados, em geral, géis de agarose

ou poliacrilamida. A corrente elétrica é conduzida por um tampão salino, em geral TAE (Tris-Acetato-EDTA) ou TBE (Tris-Borato-EDTA). O tempo de corrida também varia com o tamanho do fragmento que se deseja visualizar, utilizando-se, como referência, os chamados “marcadores de peso molecular” para estimativa do tamanho do fragmento visualizado.

#### **6.4 - SSCP (SINGLE-STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM) OU ANÁLISE DE CONFORMAÇÃO DE CADEIA SIMPLES**

Esta técnica permite detectar padrões de bandas alterados no DNA de fita simples após eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante, após a coloração com prata, para evitar o uso de radioatividade. Este procedimento se baseia no fato de que duas moléculas de DNA de fita simples que diferem uma da outra por, pelo menos, um par de bases, assumem uma conformação tridimensional diferente e migram em posições diferentes no gel. Assim, um fragmento de DNA de fita simples apresentando uma mutação teria uma mobilidade diferente no gel quando comparado com um fragmento de DNA normal. Esta mobilidade depende não só do tamanho do DNA a ser analisado, mas também de sua conformação que é determinada pela sua seqüência e dobramento. O SSCP é ideal para a análise de fragmentos pequenos (até 200 pb) e sua sensibilidade depende ainda de fatores como temperatura, percentagem de acrilamida, e força iônica do tampão de eletroforese (Orita *et al*, 1988 e 1989).

#### **7. FONTES DE DNA (Leistner, 2000)**

O DNA pode ser obtido a partir de qualquer tecido que contenha células nucleadas. Por exemplo, o sangue pode ser coletado diretamente por punção venosa, utilizando, preferencialmente, EDTA como anticoagulante. A coleta de sangue em heparina não é recomendável por ser um potencial inibidor da reação de PCR.

O sangue pode ser armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por um longo período de tempo antes de ser utilizado para extrair DNA. Biópsias de pacientes e células em cultura também são utilizadas como fonte de obtenção de DNA. A biópsia é especialmente útil em estudos de câncer, casos em que tecidos específicos podem apresentar diferenças na constituição do material genético com relação ao DNA do resto do corpo. Finalmente, DNA pode ser obtido a partir de material armazenado, como tecidos em blocos de parafina. Estas fontes são úteis para estudos retrospectivos, nos quais não é possível obter material diretamente dos pacientes.

## **8. IMUNOREATIVIDADE DA PROTEÍNA p53 NO ESÔFAGO DE BARRETT E NO ADENOCARCINOMA**

A proteína p53 normal (*wild-type*) tem uma meia-vida curta e é indetectável pelo estudo imunohistoquímico. Muitas mutações no gene p53 podem resultar numa proteína com uma meia-vida prolongada, que pode se acumular na célula. Este acúmulo ou o aumento na expressão desta proteína é a base da técnica imunohistoquímica (Ireland et al., 1997).

A técnica de imunohistoquímica baseia-se no uso de anticorpos direcionados contra marcadores antigênicos. Os anticorpos podem ser policlonais, derivado do soro de animais imunizados, ou monoclonais, derivados de hibridomas de ratos. Eles podem ser usados para corar células desagregadas de tecidos sólidos ou em suspensão, vistas por citometria de fluxo ou em esfregaços ou secção de tecidos em lâminas vistas ao microscópio ótico (Sklar, 1993).

A imunohistoquímica é usada principalmente para detectar a expressão de genes específicos, como identificar a origem tecidual de um tumor específico ou detectar proteína mutante, tais como produtos de oncogenes ou genes supressores tumorais. As vantagens desta técnica incluem a rapidez, a possibilidade de medir os resultados com a



citometria de fluxo, a habilidade de relacionar a localização antigênica com a área de tecido corado ao microscópio. Entre as desvantagens estão a destruição de muitos epítopes antigênicos pela fixação dos tecidos e a variação de sensibilidade e especificidade das diferentes preparações de anticorpos (Sklar, 1993).

O relato da expressão imunohistoquímica de p53 em mucosa normal ou em esofagites é raro (Gao et al 1994, Safatle-Ribeiro 1996, Mandard et al., 1997).

Pouco se conhece sobre os eventos genéticos que ocorrem no epitélio metaplásico, antes da evolução para a displasia. O valor preditivo da positividade do p53 no epitélio displásico no Esôfago de Barrett também é desconhecido. Provavelmente, a perda da função do gene p53 exerça um importante papel na seqüência metaplasia-displasia-adenocarcinoma (Ireland et al., 1997).

Existem inúmeros relatos relacionados à expressão do p53 pela imunohistoquímica ao Esôfago de Barrett. Há uma alta taxa de positividade em pacientes com displasia de alto grau e adenocarcinoma (Flejou et al., 1993). Teoricamente, o aumento da expressão da proteína por esta técnica detectaria a mutação no gene p53 (Ireland et al., 1997). Entretanto, existe muita discordância entre a associação da mutação genética e o aumento da expressão da proteína (Casson et al., 1994; Ireland et al., 1997), já que a função do gene p53 pode ser inativada por outros mecanismos que não a mutação (Blount et al, 1994; Coggi et al., 1997), além de ser um evento freqüente sem um definido significado prognóstico (Flejou et al, 1994).

Muitos estudos têm sugerido uma forte associação entre a expressão imunohistoquímica da proteína p53 e diversos tipos de neoplasia (Fearon et al 1990, Hollstein et al 1991, Harris et al., 1993, Wagata et al 1993, Nakanischi et al 1995, Cruz et al 1998).

Demonstrou-se, em peças cirúrgicas ressecadas por carcinoma epidermóide de esôfago, a expressão imunohistoquímica da proteína p53 em áreas de esofagite, distantes da lesão carcinomatosa (Mandard et al., 1997).

Younes e colaboradores (1997), ao acompanharem pacientes com Esôfago de Barrett por um período médio de 40 meses, encontraram expressão imunohistoquímica de p53 precedendo em até 4 anos o desenvolvimento de displasia de alto grau e adenocarcinoma.

A imunohistoquímica não define a existência de mutações genéticas, mas existem dados que sugerem a relação entre o prolongamento da estabilidade da proteína p53 e, conseqüentemente, a sua expressão imunohistoquímica, com mutações ocorrendo no epitélio esofágico, principalmente as mutações do tipo *missense* (Harris et al., 1993, Wagata et al 1993, Montesano et al 1996).

Fagundes e colaboradores (2000) observaram a expressão da proteína p53 em 17% de 182 pacientes tabagistas e alcoolistas sob risco de carcinoma epidermóide de esôfago. Esta expressão aumentou gradativamente, de acordo com a gravidade da alteração histológica encontrada, desde mucosa normal até displasia e câncer. Este estudo confirma outras pesquisas que observaram uma forte associação da expressão de p53 com lesões avançadas (carcinoma) e com displasias de alto grau, mas, adicionalmente, identificou a expressão de p53 em mucosa normal e em lesões histológicas consideradas sem caráter evolutivo para câncer, em indivíduos assintomáticos.

A maioria dos trabalhos publicados sobre o gene p53 em pacientes com Esôfago de Barrett é baseada em estudos imunohistoquímicos, analisando o aumento da expressão da proteína p53. Infelizmente, ela é uma técnica de pouca acurácia na identificação de mutações, tendo uma sensibilidade baixa, com uma positividade em torno de 65% nos pacientes com neoplasia invasiva (Ireland et al., 1997). Um estudo



comparando 5 diferentes anticorpos anti-p53 pela imunohistoquímica identificou uma positividade entre 18 a 35% em casos de carcinoma de mama, quando se utilizou um único anticorpo. A associação de dois anticorpos demonstrou uma positividade em 45% dos casos, nestas mesmas lesões (Elledge et al., 1994).

É possível que o acúmulo da proteína p53 em células tumorais possa, em alguns casos, indicar a existência de um defeito regulatório na seqüência codificadora proteica do gene, ao invés de uma mutação. Diversos investigadores (Casson et al., 1994; Flejou et al., 1995; Audezet et al., 1996; Coggi et al., 1997) observaram discrepâncias entre a expressão da proteína p53 e a presença de mutações. Por exemplo, observou-se a presença de coloração positiva em células sem mutações (Harris et al., 1993). Em alguns casos, uma coloração fraca pode representar uma flutuação normal dos níveis de proteína dentro do ciclo celular (Ireland et al., 1997). Além disso, pode ocorrer a mutação no gene p53, sem aumento na expressão da proteína (Hartwell, 1992, Ireland et al., 1997).

Resultados falsos-negativos da expressão imunohistoquímica de p53 representam em torno de 10% de todas as mutações de p53 e ocorrem, principalmente, nas lesões com mutações de ponto (Bennet et al 1992, Mandard et al., 1997). Este tipo de resultado também pode ocorrer por ligação da proteína p53 com outras proteínas (Hall et al., 1994, Save et al 1998).

A discordância observada entre os achados nas técnicas de imunohistoquímica e de biologia molecular indica que estas devam ser consideradas como métodos complementares e não competitivos nos estudos para identificação de marcadores biológicos nas neoplasias (Wynford, 1992, Casson et al. 1994).

## **9 - MUTAÇÕES DESCRITAS NO ESÔFAGO DE BARRETT**

O papel do p53 como gene supressor tumoral pode ser confirmado pela ocorrência de deleções no locus 17p em associação à mutação de outro alelo. Recentemente, o

papel deste gene também se observou pelo desenvolvimento de ratas transgênicas com 2 linhagens germinativas com alelos do p53 nulos (homozigotos) ou com um alelo nulo (heterozigoto) que apresentaram susceptibilidade a tumores espontâneos, em que o heterozigoto manifesta um retardo na manifestação desta característica em comparação ao homozigoto (Donehover et al., 1992; Harvey et al., 1993).

Durante a evolução do Esôfago de Barrett para o adenocarcinoma observam-se mudanças genômicas numéricas e estruturais (Krishnadath et al., 1995). A falta de um denominador citogenético comum indica que diversas alterações gênicas podem estar envolvidas na progressão para o adenocarcinoma (Menke-Pluymers, 1996<sup>a,b</sup>). Amostras de epitélio metaplásico de diferentes sítios, de um mesmo paciente com Esôfago de Barrett, apresentaram mutações idênticas no p53, sugerindo uma origem clonal. Entretanto, o desenvolvimento de neoplasia, em que não ocorreram mutações no p53, sugerem que outros eventos, tais como mutações em oncogenes, são necessários à evolução para o câncer (Casson et al., 1991<sup>b</sup>).

Existe um rigoroso sistema de controle da replicação celular. A entrada da célula na fase G1 do ciclo celular é influenciada por estímulos extra-celulares, através de receptores ciclino-dependentes, pelos genes p15 e p16, pelo fator de crescimento (TGF- $\beta$ ) e o p21, produto do p53. Tanto o TGF- $\beta$  como o p53 inibem a proliferação celular. A inativação ou a perda dos receptores TGF- $\beta$  tem sido descrita no adenocarcinoma esofágico e a perda alélica no 9p21, localização dos genes p15 e p16, precede o desenvolvimento de aneuploidia em mais de 80% dos casos (Barrett et al., 1996).

Foram descritas mutações no p53 em 25% dos casos de pacientes com Esôfago de Barrett submetidos à vigilância endoscópica e em mais de 75% dos pacientes com adenocarcinoma (Schneider et al., 1996; Casson et al., 1998).

Em termos gerais, as mutações em oncogenes da família *ras* e do APC (*Adenomatous polyposis coli*), outro gene de supressão tumoral, têm sido descritas em



áreas de malignidade ou de displasia em ressecções esofágicas, entretanto numa frequência menor à observada na neoplasia colo-retal (Vogelstein et al, 1988; Baker, 1990; Abdelatif et al., 1991).

A displasia de alto grau é acompanhada de alterações na expressão de oncogenes, tais como *c-src* e *c-erb-2*, exercendo importante papel na transformação celular, mas que não estão associados no prognóstico das lesões esofágicas metaplásicas e displásicas (Jankowski et al, 1992<sup>a</sup>, Bhargava et al, 2000).

A redução na apoptose pode ocorrer tardiamente na evolução para o adenocarcinoma, estando associada à mutação no gene p53. Já a expressão do gene Bcl-2 que está relacionada à perda da apoptose no câncer colo-retal, não parece estar associado à metaplasia, displasia ou ao adenocarcinoma de esôfago, tendo um valor prognóstico limitado (Bhargava et al, 2000).

Entre os marcadores de proliferação celular, observou-se a maior expressão do Ki-67 em epitélios com displasia, representando um parâmetro adicional na avaliação do risco para o adenocarcinoma, entretanto este também não apresenta valor prognóstico (Hong et al., 1995)

Fatores de crescimento como EGF (*epidermal growth factor*) e TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor- $\alpha$* ) são expressos no tecidos com metaplasia intestinal (Jankowski, 1991). Estas proteínas se ligam a receptores e são capazes de estimular a transformação celular e a proliferação, ocorrendo maior expressão com a evolução da displasia (Jankowski et al., 1992<sup>b</sup>, 1993; Filipe et al., 1993; Brito et al, 1995)

A instabilidade de microssatélites reflete a diminuição do reparo do DNA e ocorre frequentemente antes da aneuploidia. Esta decorre do descontrole na replicação celular e à medida que o epitélio se torna mais displásico, maior é o aumento na frequência de aneuploidia, sinalizando maior risco para a progressão para o adenocarcinoma (Meltzer, 1994; Mencke-Pluymers et al., 1994). Entretanto, a instabilidade de microssatélites parece



não exercer um papel tão importante na carcinogênese esofágica, quando comparada a outros tumores (Muzeau et al., 1997).

O desenvolvimento para um fenótipo maligno mais agressivo com invasão e metastatização está associado à presença de alterações no sistema cadherina/catenina, responsáveis pela adesão e mobilidade celular (Bongiorno et al., 1995), estando também associado à ativação de oncogenes, tais como o *c-myc* (Jankowski et al., 1997).

## 10 - PERDA DA HETEROZIGOSIDADE (LOH)

A perda da heterozigossidade é um evento comum e precoce na maioria dos cânceres. Este evento é utilizado para descrever a perda de material cromossômico que, como conseqüência, deixa a célula com apenas um alelo de um gene mutante. Se a região deletada contém um gene supressor tumoral, este evento pode levar a neoplasia, como ilustra a figura 3.

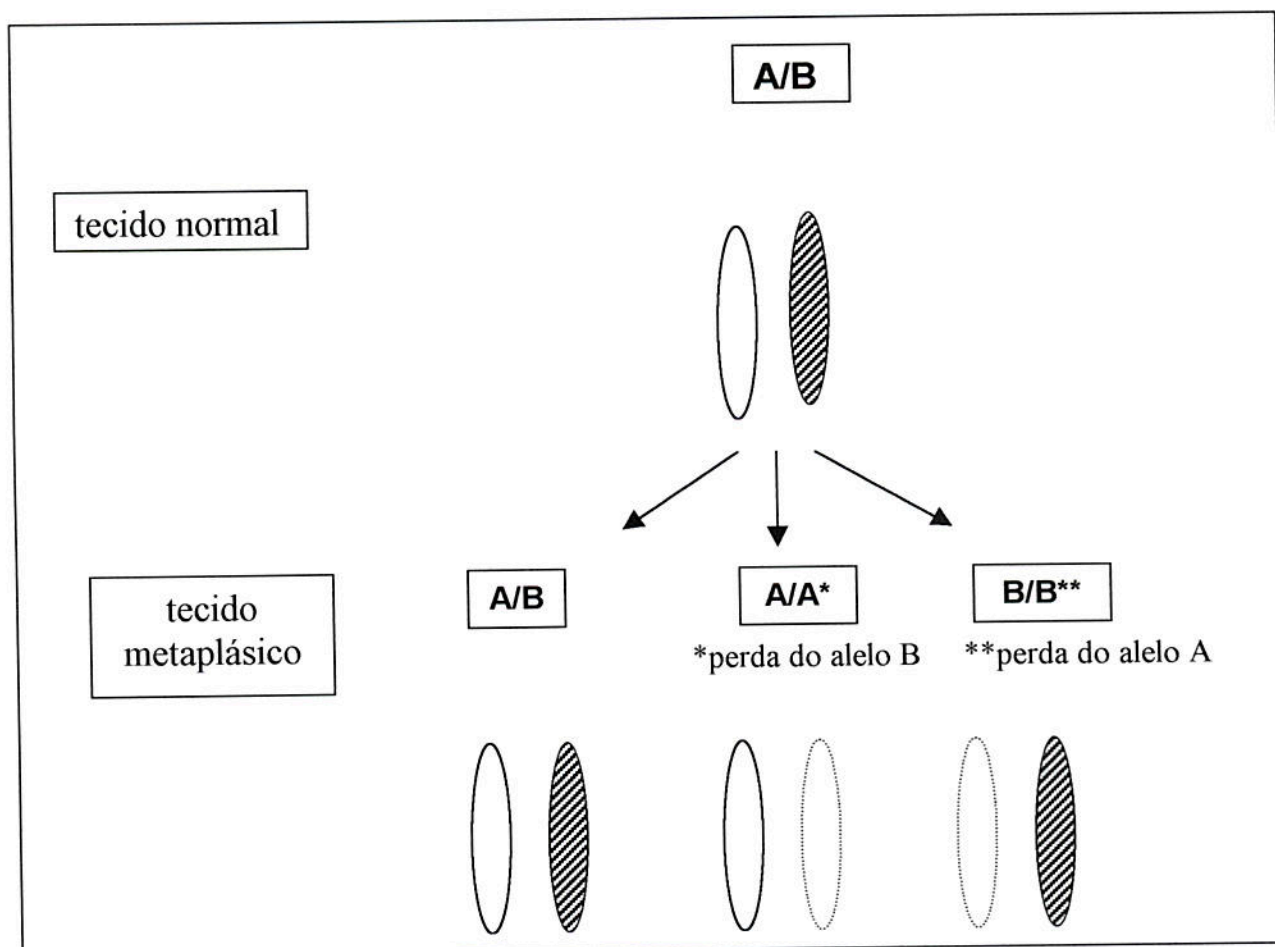


Fig 3. Representação esquemática do processo de perda de heteroziguidade

Vários relatos têm descrito uma alta prevalência de perda de heteroziguidade em sítios específicos do genoma e diferentes tipos de neoplasias. Muitos autores identificam uma alta frequência de LOH comprometendo regiões cromossômicas que abrigam genes supressores tumorais, incluindo o p53 (Jankowski et al. 1993; Hamelin et al., 1994; Nakamura et al. 1994).

A maioria das investigações de perda da heteroziguidade (LOH) no cromossoma 17 no adenocarcinoma associado ao esôfago de Barrett tem se concentrado na região que contém o gene p53, localizado no braço curto (17p) deste cromossoma. Swift e colaboradores (1995), ao analisarem os braços curto e longo do cromossoma 17, observaram uma alta frequência de LOH no braço longo. Propuseram que na região 17q 11.2-12 haja um gene que predisponha ao Adenocarcinoma associado ao Esôfago de Barrett, podendo representar o sítio de um outro gene supressor tumoral. (*TCF-2*). Isso permitiu o mapeamento do braço longo do cromossoma 17.

Gleeson e colaboradores (1995) observaram que, com exceção de um caso, todos os tumores apresentaram perda da heteroziguidade (LOH) no *loci* 17p, onde se observou a mutação nos éxons 5 e 8 do gene p53, demonstrando uma associação altamente significativa ( $p=0,00879$ ) entre o gene mutante e a perda alélica do 17p. No caso em que não se observou tal associação é possível que tenha ocorrido uma mutação em um éxon não analisado. Estes achados sugerem que o p53 seja um provável marcador para a perda alélica do 17p na maioria dos adenocarcinomas esofágicos. Dessa forma, a inativação do p53 pode ser um evento precoce na carcinogênese esofágica (Gleeson, 1995; Flejou, 1995).

Barrett e colaboradores (1996) observaram uma alta frequência de perda de heterozigosidade (LOH) em pacientes com adenocarcinoma de esôfago, em diversos cromossomas, tais como 17p (100%), 5q (80%), 9p (64%), 13q (43%), 18q (43%) e 1p (41%). Observou-se, na maioria dos indivíduos com displasia de alto grau, a presença de um mosaico de clones e subclones, com diferentes padrões de perda de heterozigosidade, sendo que esta presença foi mais freqüente no cromossoma 9p que no 17p em amostras diplóides, detectadas em grandes áreas do epitélio metaplásico (Galipeau et al., 1999).

## **11 - INSTABILIDADE GENÔMICA**

A Instabilidade Genômica é uma expressão de sentido amplo, que pode representar eventos intracelulares, podendo ocorrer em diferentes momentos, dentro de um clone ou em subpopulações celulares dentro do mesmo clone. Existem diversas técnicas que demonstram tais modificações na molécula de DNA, relacionadas com a fase do ciclo celular em que as células se encontram ou de acordo com a perda ou ganho de material genético (decorrentes de alterações numéricas ou estruturais nos cromossomas). Através da citometria de fluxo é possível identificar-se modificações mais grosseiras na molécula de DNA, tornando-se mais evidentes de acordo com o grau de diferenciação celular, variando desde células normais até a neoplasia.

A citometria de fluxo permite a análise rápida de grandes números de núcleos ou de células com a utilização de fluorocromos que se unem a diferentes componentes celulares e permitem avaliar a quantidade de DNA nos núcleos. Por esta técnica é possível avaliar as mudanças no conteúdo do DNA (populações aneuplóides) que se correlacionam com as modificações cromossômicas encontradas na malignidade. Além disso, permite avaliar a proliferação celular, identificando em que fase do ciclo celular a célula se encontra. Em tecidos normais, a maioria das células se encontra no intervalo  $G_0$



ou  $G_1$  do ciclo celular e apenas uma fração encontra-se na fase S (Síntese) do DNA ou nos intervalos  $G_2$  /mitóticos do ciclo celular ( Reid, 1991). Observou-se que a prevalência de aneuploidia, as populações  $G_2$ /tetraplóides e as frações da fase S aumentam com o maior risco histológico de malignidade, apresentando maior risco para displasia de alto grau e neoplasia. A progressão para a neoplasia estava associada ao acúmulo de anormalidades na citometria de fluxo. O surgimento seriado dessas anormalidades é compatível com um processo de expansão clonal e com o surgimento de células com uma perda progressiva no controle proliferativo (Reid, 1991), como esta detalhado na figura 4.

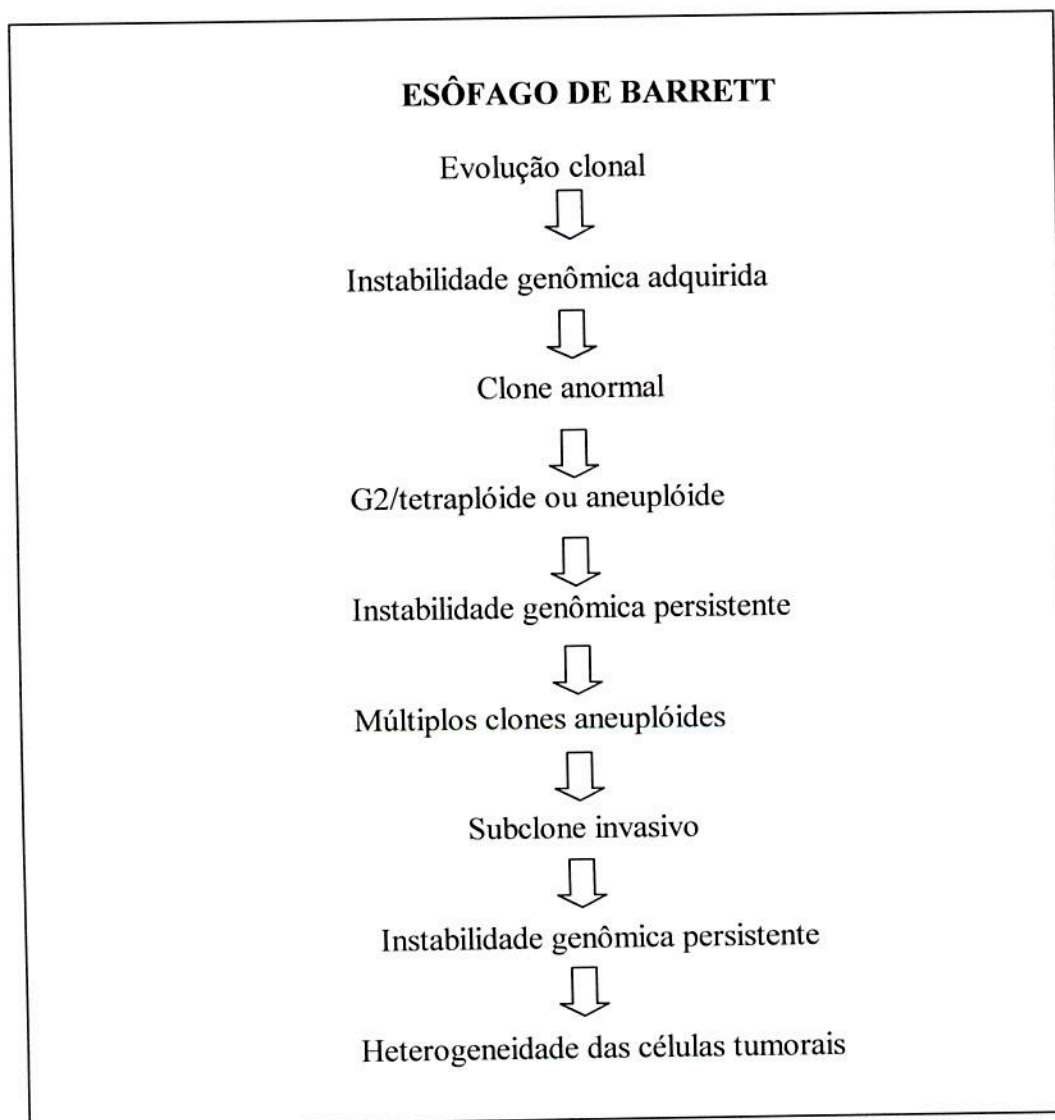


Figura 4. Modelo de instabilidade genômica e evolução clonal no Esôfago de Barrett.  
(Adaptação Brian Reid, 1991)

As mudanças mais discretas na molécula do DNA, tanto nas mutações de ponto, com a substituição de um nucleotídeo ocasionando a troca de um aminoácido, quanto nos polimorfismos, onde não há alteração na seqüência de aminoácidos da proteína, podem ser detectadas no gel de SSCP; manifestando-se através do ganho de uma banda no tecido quando comparado ao sangue.

A Figura 5 mostra a representação esquemática da distribuição das bandas no gel com o padrão normal e as possíveis alterações moleculares como a perda de heterozigosidade (LOH) e a instabilidade genômica (IG).

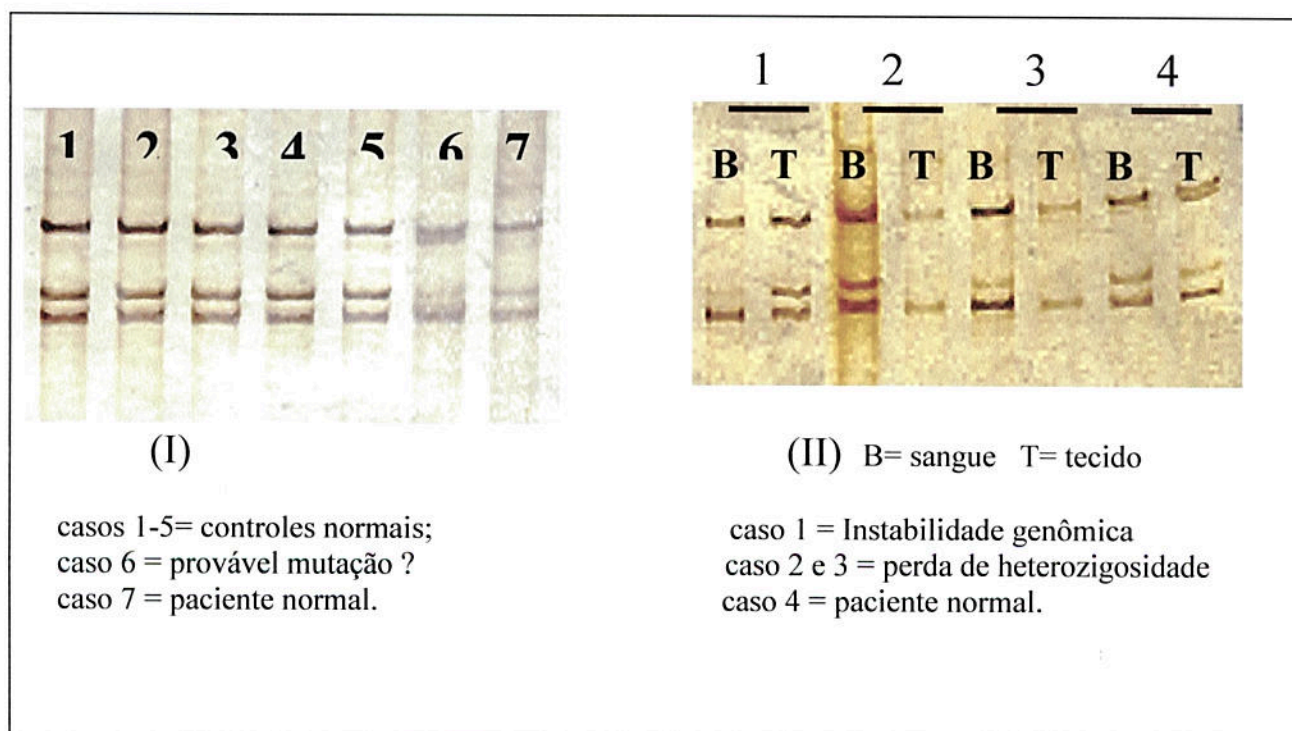


Figura 5. Análise do éxon 5 do gene p53 utilizando a técnica do SSCP.

## **12. PERSPECTIVAS**

As técnicas de Biologia Molecular têm contribuído para o entendimento do comportamento biológico das neoplasias humanas. A obtenção de DNA adequado colhido de amostras de biópsias endoscópicas, através da técnica de PCR-SSCP, tem permitido a identificação de mutações gênicas em diversos tecidos, o que permitirá no futuro a aplicabilidade clínica destas informações, com uma caracterização molecular dos tumores e a identificação de populações de risco para o desenvolvimento de neoplasias e de sua recorrência.

### **III. OBJETIVOS DO ESTUDO:**

1. Estimar a prevalência de Esôfago de Barrett ou Metaplasia Intestinal da Cárdia em pacientes com doença do refluxo gastroesofágico submetidos à Endoscopia Digestiva Alta
2. Estimar a prevalência da expressão da proteína p53 através de técnicas imunohistoquímicas em pacientes com diagnóstico de Esôfago de Barrett ou Metaplasia Intestinal da Cárdia.
3. Descrever as alterações moleculares nos éxons 5 a 8 do gene p53 em pacientes com diagnóstico de Esôfago de Barrett ou Metaplasia Intestinal da Cárdia.



## REFERÊNCIAS:

1. Abdelatif OMA, Chandler FW, Mills LR, McGuire BS, Pantazis CG, Barrett M. Differential expression of *c-myc* and *H-ras* oncogenes in Barrett's esophagus. Arch Pathol Lab Med 1991; 115:880-885.
2. Aldulaimi D, Jankowski J. Barrett's esophagus: an overview of the molecular biology. Dis of Esoph 1999; 12:177-180.
3. Attwood SEA, DeMeester TR, Bremner CG et alli. Alkaline gastroesophageal reflux: Implications in the development of complications in Barrett's columnar-lined lower esophagus. Surgery, 1989; 106:764-70.
4. Audrézet MP, Robaszkiewicz M, Mercier B et alli. Molecular analysis of the p53 gene in Barrett's adenocarcinoma. Hum Mutation 1996; 7:109-13.
5. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM et alli. P53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. Cancer Res 50: 7717-22, 1990.
6. Barrett M, Sanchez C, Neshat K, Galipeau P, Brian R. Allelic loss of 9p21 and mutations of the CDKN2/p16 gene develop as early events in neoplastic progression in Barrett's esophagus. (abstract) Gastroenterol 1996;110: 489.
7. Bhargava P, Eisen G, Holterman DA, Azumi N, Hartmann DP, Hanfelt JJ, Benjamin SB, Lippman ME, Montgomery EA. Endoscopic mapping and surrogate markers for better surveillance in Barrett's esophagus: A study of 700 biopsy specimens. Am J Clin Pathol 2000; 114 (4): 552-563.
8. Bennet WP, Hollstein MC, Metcalf RA, Welsh JA, He A, Zhu S Harris C. p53 mutation and protein accumulation during multistage human esophageal carcinogenesis. Cancer Res 1992; 52(21):5853-6138.
9. Bevilacqua RG, Cerqueira EMM, Alcântara PSM. Genética em câncer digestivo. In: Paula Castro, Savassi Rocha & Andy Petroianu. Tópicos em Gastroenterologia 7. Avanços em Gastroenterologia 1997; p 31-48. Ed. Medsi – Rio de Janeiro.
10. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. Cell 1991; 64: 235-248.

11. Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW et alli: Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 1991; 265:1287-89.
12. Blount PL, Galipeau PC, Sanchez CA et alli. 17 p allelic losses in diploid cells of patients with Barrett's esophagus who develop aneuploidy. *Cancer Res* 1994; 54: 2292-5.
13. Bongiorno PF, Kasspooles MA, Lee SW et alli. E-cadherin expression in primary and metastatic thoracic neoplasms and in Barrett's oesophagus. *Br J Cancer* 1995; 71:166-72.
14. Boshier L. & Taylor F. Heterotopic gastric mucosa in the esophagus with ulceration and stricture formation. *J Thorac Surg* 1951; 21: 306-312.
15. Bosso RMV. A origem das mutações. In: Louro ID, Llerena Jr. JC, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Schwartzmann, Conforti-Froes N. *Genética Molecular do Câncer* 2000; p 8-18. MSG Produção Gráfica – São Paulo.
16. Bremner CG, Lynch VP, Ellis HF. Barrett's esophagus: congenital or acquired? An experimental study of esophageal mucosal regeneration in the dog. *Surgery* 1970; 68: 209-216.
17. Brito MJ, Filipe MI, Linehan J, Jankowski J: Association of transforming growth factor alpha (TGF $\alpha$ ) and its precursors with malignant change in Barrett's epithelium: biological and clinics variables. *Int J Cancer*, 1995; 60: 27-32
18. Cameron AJ, Ott BJ, Payne WS. The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus. *N Eng J Med* 1985; 313:857-859.
19. Cameron AJ, Zinsmeister AR, Ballard DJ and Carney JA. Prevalence of columnar-lined (Barrett') esophagus. Comparison of population-based clinical and autopsy findings. *Gastroenterol* 1990; 99:918-22.
20. Cameron AJ. Barrett's esophagus and adenocarcinoma: From the family to the gene. (Editorials) *Gastroenterol* 1992; 102 (4):1421-1424.
21. Canto M, Setrakian S, Petras RE, Blades E, Chak A and Sivak Jr. MV. Methylene blue selectively stains intestinal metaplasia in Barrett's esophagus. *Gastroint Endosc* 1996; 44:1-7.



22. Casson AG, Mukhopadhyay T, Cleary KR et alli. P53 gene mutations in Barrett's epithelium and esophageal cancer. *Cancer Res* 1991a;51: 4495-99.
23. Casson AG, Mukhopadhyay T, Cleary KR, Ro JY, Levin B, Roth J.. Oncogene activation in esophageal cancer *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1991b 102:707-9.
24. Casson AG, Manolopoulos B, Troster M, Kerkvliet N, O'Malley F, Incullet R, Finley R, Roth JA. Clinical implications of p53 gen mutation in the progression of Barrett's epithelium to invasive esophageal cancer. *Am J Surg* 1994; 167: 52-57.
25. Casson AG, Tammemagi M, Eskandarian S, Redson M, McLaughling J, Oczelik H. p53 mutations in esophageal cancer: association with clinicopathologic features and survival. *J Clin Mol Pathol* 1998; 51:71-79.
26. Chandrassoma P. Pathophysiology of Barrett's esophagus. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 9:270-278.
27. Chang F, Sirjänen S, Sirjänen K. Implications of the p53 tumor-supressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 1995; 13(4): 1009-1022.
28. Chobanian SJ, Cattau EL Jr, Winters CR Jr, et al. In vivo staining with toluidine blue as an adjunct to the endoscopic detection of Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 1987; 33: 99-101.
29. Clark GW, Ireland AP, Peters JH, DeMeester TR, Bremner CG. Short-segment Barrett's esophagus: a prevalent complication of gastroesophageal reflux disease with malignant potencial. *J Gastrointest Surg*, 1997; 1: 113-122.
30. Coggi G, Bosari S, Roncalli M, et alli: p53 Protein accumulation and p53 gene mutation in esophageal carcinoma. A molecular and immunohistochemical Study with clinicopathologic correlations. *Cancer* 1997; 79:425-32.
31. Cruz IB, Snijders PJF, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Snow GB, Walboomers JM, Van Der Wall I. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is na early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 1998;184:360-368.
32. DeMeester SR and DeMeester TR: Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus – Fifty years of controversy. *Ann Surg* 2000; 231(3): 303-21.
33. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* 1992; 356:215-221.



34. Drewitz DJ, Sampliner RE and Garewal HS. The incidence of adenocarcinoma in Barrett's esophagus: A prospective study of 170 patients followed 4.8 years. *Am J Gastroenterol* 1997; 92(2) 212-215.
35. Elledge RM, Clark GM, Fuqua SA, Yu YY, Alfred DC. P53 protein accumulation detected by five different antibodies: relationship, prognosis and heat shock protein 70 in breast cancer. *Cancer Research* 1994; 54:3752-3757.
36. Evans SC & Lozano G. The Li-Fraumeni syndrome: an inherited susceptibility to cancer. *Molec Med Today* 1997 (Sept): 390-395.
37. Fagundes RB, Barros SGS, Moreira LF. Expressão imunohistoquímica da proteína p53 em mucosa esofágica de indivíduos sob alto risco para carcinoma epidermóide de esôfago – 1999 Tese(Doutorado) Univ. Federal do Rio Grande do Sul.
38. Farah SB. In Farah S B. Da célula ao DNA. In:DNA Segredos & Mistérios 1997; p 7-36. Sarvier São Paulo.
39. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-767.
40. Flejou JF, Potet F, Muzeau F et alli. Overexpression of p53 protein in Barrett's syndrome with malignant transformation. *J Clin Pathol* 1993; 46: 330-3.
41. Flejou JF, Paraf F, Potet F et alli: p53 protein expression in Barrett's adenocarcinoma: a frequent event with no prognostic significance. *Histopathol* 1994; 24:487-9
42. Flejou JF, Volant A, Diebold MD, Vissuzaine C et alli: Overexpression of p53 protein in Barrett's oesophagus: a frequent and early event during carcinogenesis. *Gastroenterol Clin Biol* 1995; 19:475-81.
43. Filipe MI and Jankoski J. Growth factors and oncogenes in Barrett's oesophagus and gastric metaplasia. *Endoscopy*, 1993; 25(Suppl) 637-41.
44. Galipeau PC, Prevo LJ, Sanchez CA, Longton GM and Brian Reid. Clonal expansion and loss of heterozigosity at chromossome 9p and 17p in premalignant esophageal (Barrett's) tissue. *J Nat Cancer Inst* 1999; 91 (24): 2087-95.

45. Gao H, Wang LD, Zhou Q, Hong J, Huang T, Yang CS. p53 tumor suppressor gene in early esophageal precancerous lesions and carcinoma among high-risk populations in Henan, China. *Cancer Res.* 1994; 54: 4342-4346.
46. Gleeson CM, Sloan JM, McGuigan JA, Richtie AJ and Russell SHE. Base transitions at CpG dinucleotides in the p53 gene are common in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 1995; 55:3406-11.
47. Gottfried MR, McClave SA, Boyce HW: Incomplete intestinal metaplasia in the diagnosis of columnar lined esophagus (Barrett's esophagus) *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 741-46.
48. Haggitt RC, Tryzelaar J, Ellis FG, Colcher H. Adenocarcinoma complicating columnar epithelium-lined (Barrett's) esophagus. *Am J Clin Pathol* 1978; 70:1-5.
49. Haggitt RC: Barrett's esophagus, dysplasia and adenocarcinoma. *Human Pathol* 1994; 25 (10):982-993.
50. Hall PA, Lane DP. p53 in tumour pathology: Can we trust immunohistochemistry? – Revisited. *J Pathol* 1994; 172:1-4.
51. Hamelin R, Flejou JF, Muzeau F, et al. Tp53 gene mutations and p53 protein immunoreactivity in malignant and premalignant Barrett's esophagus. *Gastroenterol* 1994; 107:1012-1018.
52. Hamilton SR, Smith RRL. The relationship between columnar epithelial dysplasia and invasive carcinoma arising in Barrett's esophagus. *Am J Clin Pathol* 1987; 87:301-312
53. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of p53 tumor suppressor gen. *N Engl J Med* 1993;329(18):1318-1326.
54. Hartwell L: Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 1992;71:543-6.
55. Harvey M, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley A Donehower LA. Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nature Genet* 1993; 5:225-229.
56. Hayward J. The lower end of the esophagus. *Thorax* 1961; 16: 36-41.

57. Hollstein M, Sidranski D, Vogelstein K, Harris C. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49-52.
58. Hong MK, Laskin WB, Herman BE, Johnston MH et al: Expansion of the Ki67 proliferative compartment correlates with degree of dysplasia in Barrett's esophagus. *Cancer* 1995;75:423-29.
59. IARC Homepage – International Agency for Research on Cancer - p53 polymorphisms – [www.p53database@iarc.fr](mailto:www.p53database@iarc.fr)
60. Ireland AP, Clark GWB and DeMeester TR. Barrett's esophagus. The significance of p53 in clinical practice. *Ann Surg* 225:17-30, 1997.
61. Jankowski J, McMenemin R, Hopwood D, et al: Abnormal expression of growth regulatory factors in Barrett's esophagus. *Clin Sci*, 1991; 81:663-8.
62. Jankowski J, Coghill G, Hopwood D, et al: Oncogenes and onco-suppressor gene in adenocarcinoma of the esophagus. *Gut* 1992a; 33:1033-1038.
63. Jankowski J, Hopwood D, Wormsley KG: Flow-cytometric analysis of growth-regulatory peptides and their receptors in Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *Scand J Gastroenterol* 1992b; 27:147-54.
64. Jankowski J, Hopwood D, Pringle R, Wormsley KG: Increase expression of epidermal growth factor receptor in Barrett's oesophagus associated with alkaline reflux: A putative model for carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 88(3):402-8, 1993.
65. Jankowski J Gene expression in Barrett's mucosa: acute and chronic adaptive responses in the oesophagus. *Gut* , 1993;34: 1649-50.
66. Krichnadath KK, Tilanus HW, Blankenstein MV et al: Accumulation of genetic abnormalities during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Cancer Res* 1995; 55: 1971-6.
67. Lackie JM, Dow JAT: *The dictionary of cell and molecular biology*, Third edition – Academic Press, London 1999.
68. Lane DP. p53 guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16.



69. Leistner S. Investigação molecular no c ncer heredit rio e espor dico. In: Louro ID, Llerena Jr. JC, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Schwartzmann, Conforti-Froes N. Genética Molecular do C ncer 2000; p 263-272. MSG Produção Gráfica – São Paulo
70. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 supressor gene. *Nature* 351:453, 1991.
71. Levine DS. Management of dysplasia in the columnar-lined esophagus. *Gastroenterol Clin North Am* 1997; 26(3): 613-33.
72. Lin KM, Ueda RK, Hinder RH, Stein HJ, DeMeester TR: Etiology and importance of alkaline esophageal reflux. *Am J Surg* 1991; 162:553-7.
73. Louro ID. Sistemas de controle celular. In: Louro ID, Llerena Jr. JC, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Schwartzmann, Conforti-Froes N. Genética Molecular do C ncer 2000; p 44-82. MSG Produção Gráfica – São Paulo.
74. Macdonald CE, Wicks AC, Playford RJ. Final results from 10 year cohort of patients undergoing surveillance for Barrett's oesophagus: observational study. *BMJ* 2000; 321(7271): 1252-1255.
75. Mandard AM, Marnay J, Lebeau C Benard S, Mandard JC. Expression of p53 protein in oesophageal squamous epithelium from surgical specimens resected for squamous cell carcinoma of the oesophagus, with special reference to uninvolved mucosa. *J Pathol* 1997; 181: 153-157.
76. Mann NS, Tsai MF, Nair PK. Barrett's esophagus in patients with symptomatic reflux esophagitis. *Am J Gastroenterol* 1989, 84: 1494-1496.
77. Meltzer SJ, Yin J, Manin B, et all: Microsatellite instability occurs frequently and in both diploid and aneuploid cell populations of Barrett's – associated esophageal carcinoma. *Cancer Res*, 1994; 54 : 3379-82.
78. Menke-Pluymers MBE, Mulder AH, Hop WCJ et alli. Dysplasia and aneuploidy as markers of malignant degeneration in Barrett's esophagus. *Gut* 1994; 35:1348-51.
79. Menke-Pluymers MBE. Risk factors for neoplastic progression in Barrett's mucosa. *Eur J Surg Oncol* 1996; 22: 311-6.
80. Menke-Pluymers MBE, Drunen E V, Vissers KJ et alli. Cytogenetic analysis of Barrett's mucosa and adenocarcinoma of the distal esophagus and cardia. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; 90: 109-117.
81. Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer (Pred. Oncol.)* 1996, 69: 225-235.

82. Muzeau F, Flejou JF, Belghiti J, Thomas G and Hamelin R. Infrequent microsatellite instability in oesophageal cancer. *Br J Cancer* 1997; 75(9):1336-9.
83. Naef AP, Savary M, Ozzello L. Columnar-lined lower esophagus: An acquired lesion with malignant predisposition *J Thorac Cardiovasc Surg* 1975;70: 826-835.
84. Nakamura T, Nekerda H, Hoelscher AH et alli. Prognostic value of DNA ploidy and c-erbB-2 oncoprotein overexpression in adenocarcinoma of Barrett's esophagus. *Cancer* 73(7):1785-94, 1994.
85. Nakanischi Y, Noguchi M, Matsuno Y, Saikawa M, Mukai K, Shimosato Y. p53 expression in multicentric squamous cell carcinoma and surrounding squamous epithelium of the aerodigestive tract. *Cancer* 1995;75:1657-1662.
86. Nandurkar S, Talley NJ, Martin CJ, Ng TH, Adams S. Short-segment Barrett's esophagus: prevalence, diagnosis and associations. *Gut* 1997; 40:710-715.
87. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194:23-28.
88. Öberg S, Peters JH, DeMeester TR et alli. Inflammation and specialized intestinal metaplasia of cardiac mucosa is a manifestation of gastroesophageal reflux disease. *Annals of Surgery* 1997; 226(4): 522-32.
89. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekida T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel eletrophoresi as single-strand conformations polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:2766-2770.
90. Orita M, Suzuki Y, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874-879.
91. Paull A, Trier JS, Dalton MD, Camp RC, Loeb P, Goyal RK. The histologic spectrum of Barrett's esophagus. *N Engl J Med* 1976; 295: 476-480.
92. Pera M, Cameron AJ, Trastek VF et alli: Increasing incidence of adenocarcinoma of esophagus and esophagogastric junction. *Gastroenterol* 1993; 104:510-3.
93. Provenzale D, Kemp JA, Arora S, Wong JB. A guide of surveillance of patients with Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 1994; 89:670-680.
94. Provenzale D, Schmitt C, Wong JB. Barrett's esophagus: a new look at surveillance based on emerging estimates of cancer risk. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:2043-2053.



95. Reid BJ & Rubin CE . When is the columnar-lined esophagus pre-malignant  
Gastroenterol 1985; 88: 1552 (abstract).
96. Reid BJ, Weinstein WM. Barrett's esophagus and Adenocarcinoma [review] Ann Rev  
Med 1987; 38: 477-492.
97. Reid BJ. Barrett's esophagus and Esophageal Adenocarcinoma. Clin Gastroent North  
Am 1991 (4):839-855
98. Renault B, Broek MVD, Fodde R et alli Base transitions are the most frequent genetic  
changes at p53 in gastric cancer. Cancer Res 1993; 53: 2614-17.
99. Rothery GA, Patterson JE, Stoddard CJ, et alli: Histological and histochemical changes  
in the columnar lined (Barrett's) oesophagus. Gut 1986; 27:1062-68.
100. Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro U, Sakai P, Clarke Mr, Fylyk SN, Kim R, Young MA,  
Vanniber NN, Reynolds JC. p53 is overexpressed in cancer and non-malignant tissues  
from patients with megaesophagus. DDW 1996 [abstract].
101. Saiki RF, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higushi R, Horn GT, Mullius KB, Erlich  
HÁ. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA  
polymerase. Science 1988; 239: 487-491.
102. Sampliner RE. Practice guidelines on the diagnosis, surveillance, and therapy of  
Barrett's esophagus. The Practice Parameters Committee of American College of  
Gastroenterology. Am J Gastroenterol 1998; 93:1028-1032.
103. Save V, Nylander K & Hall PA. Why is p53 protein stabilized in neoplasia? Some  
answers but many more questions! J Pathol 1998; 184:348-350.
104. SchneiderPM, Casson AG, Levin B et al. Mutations in p53 in Barrett's esophagus  
and Barrett's cancer: a prospective study of 98 cases. J Thorac Cardiovasc Surg 1996;  
111:323-333.
105. Sherr CJ. Cancer cell cycles. Science 274 (5293): 1672-77, 1996.
106. Sjöegren S, Inganäs M, Norberg T, Lindgren A, Norgren H, Holmberg L, Bergh J. The  
p53 gene in breast cancer: Prognostic value of complementary DNA sequencing versus  
immunohistochemistry. J Natl Canc Instit 1996; 88(3/4):173-182.



107. Skinner DB, Walther BC, Riddell RH et alli. Barrett's esophagus. Comparison os benign and malignant cases. *Ann Surg* 1983; 198:554-566.
108. Sklar J. Principles of molecular cell biology of cancer: Molecular approaches to cancer diagnosis. In: DeVita Jr, VT, Helmann S & Rosenberg AS. JB Lippincott Co. 4<sup>th</sup> Ed. Philadelphia. 1993:92-113.
109. Souza RF and Meltzer SJ. The molecular basis for carcinogenesis in metaplastic columnar-lined esophagus. *Gastroenterol Clin N Am* 1997; 26(3): 583-97.
110. Spechler SJ & Goyal, RK. Barrett's Esophagus. *N Eng J Med* 315: 362-71,1986.
111. Spechler SJ. Endoscopic surveillance for patients with Barrett's esophagus: Does the cancer risk justify the practice? *Ann Intern Med* 1987; 106:902-904.
112. Swift A, Risk JM, Kingsnorth AN, Wright TA, Myskow M, Field JK: Frequent loss of heterozygosity on chromosome 17 at 17q11.2-q12 in Barrett's adenocarcinoma. *Br J Cancer* 1995 ; 71:995-8.
113. Thompson JJ, Zinsser KR, Enterline HT. Barrett's metaplasia and adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Hum Pathol* 1983; 14:42-61.
114. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR et alli. Genetic alterations during colorectal tumor development . *N Eng L Med* 319 (9): 525, 1988.
115. Wagata T, Shibagaki I, Imamura M Shimada Y, Toguchida J, Yandell, Ikenaga M, Tobe T, Ishizaki K. Loss of 17 p mutation of the p53 gen, and overexpression of p53 protein in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 1993; 53:846-850.
116. Weinberg RA. How cancer arises. *Scient Am* 275 :32-40, 1996.
117. Weinstein W, VanDeventer G, Ippoliti A. A histologic evaluation of Barrett's esophagus using a standardized endoscopic biopsy protocol. *Gastroenterology* 1984; 86: 1296 [abstract].
118. Weston AP, Krmpotich PT, Cherian R et all: Prospective evaluation in intestinal metaplasia and dysplasia within the cardia of patients with Barrett's esophagus. *Dig Dis Sciences* 1997; 42 (3): 597-602.

119. Winters C Jr, Spurling TJ, Chobanian SJ , et alli. Barrett's esophagus: A prevalent , occult complication of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterol* 92:118-24,1987.
120. Woolf G, Riddell R, Irvine E, Hunt R. A study to examine agreement between endoscopy and histology for the diagnosis of columnar lined (Barrett's) esophagus. *Gastrointest Endosc* 1989; 35:541-4.
121. Wright TA. High grade dysplasia in Barrett's metaplasia. *Br J Surg* 1997; 84: 760-766.
122. Wynford TD. p53 in tumor pathology: Can we trust immunocytochemistry? *J Pathol* 1992;166:329-330.
123. Younes M, Ertan A, Lechago LV, Somoano JR and Lechago J. p53 protein accumulation is a specific marker of malignant potential in Barrett's metaplasia. *Dig Dis Sciences* 1997; 42 (4): 697-701.

**ARTIGO EM  
LÍNGUA INGLESA**



**p53 PROTEIN OVEREXPRESSION AND p53 MUTATION ANALYSIS IN PATIENTS WITH CARDIAC INTESTINAL METAPLASIA, BARRETT'S ESOPHAGUS AND CONTROL POPULATION - A IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND MOLECULAR STUDY.**

Fábio Segal, M.D.\*\*; Ana Paula B. Kaspariy\*, João Carlos Prolla, M.D, PhD.\*\*\*; Sandra Leistner, PhD\*

\*Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

\*\*Post Graduation Program in Medicine - UFRGS

\*\*\* Cytology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Acknowledgment: This work received editorial support from the Grupo de Pesquisa e Pós-graduação (GPPG) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (RS, Brazil) and financial support from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) and Fundo de Incentivo à Pesquisa/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

Correspondence address and proof requests:

Dr. Fábio Segal

Rua Ramiro Barcelos 910/904, CEP 90035-300, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: + 55-14-3314-1422

E-mail: fsegal@plug-in.com.br

**SUMMARY:**

p53 mutation and p53 protein overexpression seem to be the most common genetic changes in human cancers. However, the clinical significance is controversial and p53 accumulation may not correlate with gene mutation.

The aim of the study was estimate the prevalence of Cardiac Intestinal Metaplasia (CIM) and Barrett's Esophagus (BE), estimate the prevalence of p53 immunohistochemistry overexpression and describe the molecular alterations of exons 5 to 8 of the p53 gene in a group of patients with CIM and BE

We studied 68 patients with diagnosis of chronic esophagitis (27), Barrett's Esophagus (21) and intestinal metaplasia of the cardia (20). Immunohistochemical analysis of p53 was performed using monoclonal antibody DO-7. DNA was extracted from blood and tissue biopsies for the molecular analysis. The fragments corresponding to exons 5 to 8 of the p53 gene were amplified by PCR using specific primers and subsequently analyzed by SSCP.

Immunohistochemistry for p53 was performed in 20 cases of CIM and 21 cases of BE. p53 positive expression was 56.1% (23/41). It was positive in 9 cases of CIM (39.1%) and 14 cases (60.9%) of BE ( $p=0.28$ ). Regarding the molecular study, the standard distribution of bands in the SSCP analysis for exons 5 to 8 was defined using DNA controls from Hospital Blood Bank Donors and esophageal tissue from 27 patients with chronic esophagitis. We observed 15 altered cases (36.6%) in exon 5. Eight patients (19.5%) with genomic instability, 3 patients (7.3%) with loss of heterozygosity and 4 patients (9.8%) with unknown alteration. Regarding exon 7, we observed 4 altered cases (9.8%): 3 patients (7.3%) with genomic instability and 1 patient (2.4%) with loss of heterozygosity. We found no alteration in exons 6 and 8, in either group.

Overexpression of p53 protein is a common event in CIM and in BE. The molecular alterations observed can be due to loss of heterozygosity, genomic instability, polymorphisms or other unknown alteration present in exons 5 to 8.

Key words: p53, Cardiac Intestinal Metaplasia, Barrett's Esophagus.

## I - INTRODUCTION

Barrett's Esophagus (BE) is a sequela to chronic reflux esophagitis, and develops as a maladaptive response to mucosal injury induced by gastroesophageal reflux whereby the normal stratified squamous epithelium of the lower esophagus is replaced by a simple, columnar metaplastic epithelium (1,2,3). It is considered a premalignant condition that predisposes to the development of adenocarcinoma of esophagus in about 10% of the affected patients (1,2).

The annual risk of esophageal carcinoma for patients with specialized intestinal metaplasia is thought to be approximately 1%, at least 30 times that of the general population (4,5). Although the exact magnitude of the risk is difficult to estimate and the overall incidence of malignant transformation is relatively low, adenocarcinoma arising in BE often manifests at an incurable stage and more than 90% will eventually die of the disease (6,7). Unfortunately, the incidence of the adenocarcinoma is arising in United States (8) and Europe (9).

Because the incidence of Barrett's adenocarcinoma is rising faster than that of any other tumor, many authors have stressed the importance of annual endoscopic screening (10). Despite this, an observational study, after 10 years of endoscopic surveillance program for patients with Barrett's Esophagus, demonstrated that this strategy has limited value (11).

The pathogenesis of Cardiac Intestinal Metaplasia (CIM), Short Segment Barrett's Esophagus (SSBE) and Long Segment Barrett's Esophagus (LSBE) are poorly understood. These conditions are also difficult to distinguish from each other on the sole basis of endoscopic and pathologic criteria. Unfortunately, an immunophenotype study is also unable to distinguish these conditions (12,13). Adenocarcinomas of the esophagus and cardia have a similar frequency and spectrum of p53 gene mutations, suggesting that these tumors have a common pathogenesis (8,9,11).



During the evolution from Barrett's Esophagus into adenocarcinoma, numerical and structural genomic changes are observed. The lack of a cytogenetic common denominator indicates that a great number of gene alterations may be involved in adenocarcinoma progression (14). Next to be determined is the usefulness of the detection of p53 mutations in Barrett's Esophagus (15). There are many genes related to carcinogenesis, but the appreciation of the function of p53 is a major advance in the understanding of the molecular biology of cancer. This tumor suppressor gene has given new insight into regulation of the cell cycle, and appears to play an important role in many solid tumors (15-20).

The p53 gene comprises a genomic DNA of about 20 kb, contains 11 exons, and is located in the short arm of chromosome 17. It encodes a nuclear phosphoprotein made up of 393 amino acids, which fulfill several functions such as regulation of the cell cycle, cellular differentiation, and apoptosis (15).

More than 90% of the mutations described for the p53 gene occur between exons 4 and 9, which encompass protein domains II-V. This region is evolutionarily highly conserved and involves the DNA-binding domain, essential for the activity of p53 (15,19,20).

In addition to point mutations, loss of heterozygosity (LOH) is a common and early event in most cancers. This event refers to the loss of chromosomal material, which, as a result, leaves the cell with only one allele of a mutant gene. If the deleted region contains a tumor suppressor gene, such event may lead to cancer. Chromosomal regions with frequent LOH may indicate those genes with higher susceptibility, and help to understand the molecular events involved in carcinogenesis (15).

The normal p53 protein (wild type) has a short half-life and is not detectable by immunochemistry. Most mutations in p53 result in a protein with a prolonged half-life, which then accumulates in the cell. This accumulation is the basis for the

immunohistochemical detection of p53 protein overexpression. In comparison with other techniques, this method is relatively cheap, quick, easy to perform, and available in most pathology laboratories (15). Rates of p53 positivity are highest in patients with high-grade dysplasia and cancer (21-36).

Inactivation of p53 may be an early event in esophageal carcinogenesis (25). p53 protein overexpression detected by immunochemistry is an indirect method of detecting a p53 gene mutation (30,47), but there is significant discordance between p53 protein overexpression and the observation of a genetic mutation (15,36,37).

In addition to cancer-associated mutations, at least 10 polymorphisms have been described in the p53 gene, both in coding and noncoding regions. Polymorphism is characterized by the existence, in a population, of two or more alleles of a gene, with the frequency of rarer alleles being greater than a recurrent mutation alone (usually greater than 1%) (15).

## **II. OBJECTIVES:**

- 1 – Estimate the prevalence of intestinal metaplasia of the cardia and of Barrett's Esophagus in patients with gastroesophageal reflux submitted to an elective upper digestive endoscopy.
- 2- Estimate the prevalence of p53 immunohistochemistry overexpression in a group of patients with intestinal metaplasia of the cardia and Barrett's Esophagus.
- 3- Describe the molecular alterations of exons 5 to 8 of the p53 gene in a group of patients with intestinal metaplasia of cardia and Barrett's Esophagus.

## **III. METHODS AND CASES:**

A total of 68 patients were studied. Endoscopic examinations were performed between January 1997 and January 1998 at Moinhos de Vento Hospital – Porto Alegre - state of Rio Grande do Sul – Brazil. Patients were undergoing endoscopy for standard indications (symptoms of gastroesophageal reflux disease, or who were referred for

other reasons) and were found to have inlet patches and/or digitiform projections of the columnar-lined epithelium, as confirmed by endoscopic biopsy. All participating patients gave written informed consent, which was approved by the Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação – Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) and registered under number 96304.

After oropharyngeal anesthesia and intravenous conscious sedation with midazolam, routine upper endoscopic examination was performed using the GIF20 Olympus endoscope and all cases were photographed. The endoscopist measured the distance of endoscopic landmarks (squamocolumnar junction, diaphragmatic impression, lower esophageal sphincter) in centimeters from the patient's incisors and noted the presence and location of abnormal findings such as erosions, ulcers, islands of intestinal metaplasia, long or short tongues and circumferential areas of intestinal metaplasia in the esophagus. Esophagitis was graded using a modification of the Savary-Miller endoscopic classification (44). Depending on the length of Barrett's Esophagus, 4 to 8 biopsy specimens were obtained using a biopsy forceps. Biopsy specimens were obtained from distal to more proximal areas to allow blood from biopsy sites to trickle distally. Biopsies were performed at 1- to 2-cm intervals throughout the length of the metaplastic mucosa to evaluate the presence of dysplasia. Separate biopsies were performed on endoscopically visible lesions. We performed a combination of circumferential antegrade biopsies and biopsies taken with the esophagoscope retroflexed in the stomach. The location (distance in centimeters from the incisors) and source (i.e., islands, tongues or circumferential areas of intestinal metaplasia and gastroesophageal junction) of each biopsy were recorded (figure 1). The size of the lesions was estimated using an opened biopsy forceps (8 mm open span).

The specimens were immediately placed in a 10% buffered formalin solution and processed routinely by the pathologist of the same hospital (AnatPat Laboratory). All



biopsy samples were stained with hematoxylin-eosine and Alcian-blue pH 2.5 (figure 2). p53 immunohistochemical positivity was detected by the avidin-biotin-peroxidase complex method, used according to the manufacturer's protocol (D07 - DAKO).

Two pathologists who were unaware of the patients' clinical history or previous pathologic findings independently examined all specimens. These pathologists specified the proportion of each type of epithelium in every specimen (i.e., specialized columnar, junctional, fundic, or squamous). A biopsy result was considered "positive" if at least 10% of the specimen showed the typical villiform surface pattern and intestinal goblet cells characteristic of specialized columnar epithelium. This cut-off served to standardize the diagnosis of BE. Biopsies from a normal-appearing gastroesophageal junction have been found to contain microscopic foci of intestinal metaplasia within cardiac mucosa, a condition referred to as cardiac intestinal metaplasia (45,46,47). All of the specimens had varying degrees of mild chronic inflammation, characterized by infiltration of the submucosa with lymphocytes and plasma cells. Dysplasia was not present in any of the specimens.

As regards the immunohistochemical expression of the p53 protein, cases presenting more than 10% stained cells per microscope field at 400x magnification were considered positive (figure 3). There was a high degree of agreement between the two pathologists in terms of classification into the positive and negative categories: 87.8%, with a kappa coefficient of 0.74. The doubtful cases were examined by a third pathologist, who determined which were to be considered positive.

a) Molecular Analysis:

1- Blood and tissue DNA extraction – 10 ml of peripheral blood in EDTA was withdrawn from controls (chronic esophagitis), CIM and BE individuals using the salting out procedure described by Miller et al (48). The tissue of chronic esophagitis, BE and CIM

patients collected by endoscopy was kept at -20° C until DNA extraction, carried out as previously described.

2- Polymerase chain reaction (PCR) – Amplification of exons 5-8 of the p53 gene was carried out through the PCR technique. For PCR, we used 0.2 mM dNTP (Sigma), 5 µL ammonium buffer (16mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris. HCL pH 8.8, and 0.1% Tween 20), 2UI of DNA Taq polymerase Gibco, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 20 pmoles of specific primers designed for the fragment to be amplified, to a final volume of 50µL. The sequence of primers (5' to 3') used was:

Exon 5 Forward - GTG CCC TGA CTT TCA ACT  
5 Reverse - GGG CAA CCA GCC CTG TCG

Exon 6 Forward – CGT CTA GAA TTC CTC ACT GAT TGC TC  
6 Reverse – CGG TCG ACA GTT GCA TAC CAG A

Exon 7 Forward – AGG CGC ACT GGC CTC ATC TT  
7 Reverse – TCA GCG GCA AGC AGA GGC TG

Exon 8 Forward – GGA CAG GTA GGA CCT GAT TTC CTT AC  
8 Reverse – TGC ACC CTT GGT CTC CTC CAC

PCR conditions were: initial denaturation at 94 °C for 3 min., followed by 35 cycles of 40 seconds at 94 °C denaturation, 55 °C annealing, and 72 °C extension, ending with a final extension at 72 °C for 10 min. The amplified fragment of 350 pb was submitted to 2% agarose gel electrophoresis and visualized through ethidium bromide staining.

3- Single-Strand Conformation Polymorphism–SSCP - molecular analysis was carried out using the SSCP technique, where an abnormal band pattern, after electrophoresis in non-denatured polyacrylamide gel, indicates an alteration in the primary DNA sequence. Tissue samples from 27 patients with chronic esophagitis (controls) and blood samples from unidentified donors, obtained from the HCPA Blood Bank, were used to determine the normal band distribution pattern.

4- Loss of Heterozygosity (LOH) and Genomic Instability (GI) - Molecular analysis of exons 5, 6, 7 and 8 of gene p53 were carried out using DNA extracted from blood and tissue from individuals with Cardiac Intestinal Metaplasia and Barrett's Esophagus. Individuals presenting heterozygous blood samples were examined for LOH, determined when the tissue sample showed a loss of one of the alleles present the blood, using the SSCP technique. Individuals presenting homozygous blood samples were examined for IG, determined when the tissue sample showed a gain of an allele not present the blood, using the SSCP technique (figure 4).

The statistical analysis of results was performed by the Pearson's chi-square method in the EPI-INFO 6.1 software.

#### **IV – RESULTS:**

##### **1. Estimation of prevalence of Barrett's Esophagus (BE) and e Cardiac Intestinal Metaplasia (CIM)**

Sixty eight patients were examined, with the following histologic diagnoses: 27 cases with chronic esophagitis (39.7%), 21 cases with Barrett's Esophagus (30.9%), and 20 cases with Cardiac Intestinal Metaplasia (29.4%) (table I).

**Table I – Frequency of histologic findings**

| <b>Histologic diagnosis</b>          | <b>Frequency</b> | <b>Percentage (%)</b> |
|--------------------------------------|------------------|-----------------------|
| <b>Chronic esophagitis</b>           | <b>27</b>        | <b>39.7</b>           |
| <b>Barrett's Esophagus</b>           | <b>21</b>        | <b>30.9</b>           |
| <b>Cardiac Intestinal Metaplasia</b> | <b>20</b>        | <b>29.4</b>           |
| <b>Total</b>                         | <b>68</b>        | <b>100</b>            |



## 2. Immunohistochemical analysis of gene p53.

Forty one cases (21 BE and 20 CIM) were analyzed by the immunohistochemical technique, of which 23 were positive cases (56.1%) and 18 negative (43.9%). There was 60.9% positivity (14 cases) among the BE cases, and 39.1% (9 cases) among the CIM cases, which did not present a statistically significant difference between the groups ( $p=0.28$ ) (table II).

**Table II – Results of the p53 analysis by histologic diagnosis**

|                     | <b>Barrett's Esophagus</b> | <b>Cardiac Intestinal Metaplasia</b> |
|---------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| <b>p53 positive</b> | <b>14</b>                  | <b>9</b>                             |
| <b>p53 negative</b> | <b>7</b>                   | <b>11</b>                            |
| <b>Total</b>        | <b>21</b>                  | <b>20</b>                            |

$p=0.28$

## 3. Molecular analysis of the p53 gene - Exons 5, 6, 7 and 8.

Exons 5, 6, 7 and 8 of the gene p53 were analyzed by means of DNA extracted from the blood and tissue of 41 patients (21 BE and 20 CIM), with the following alterations observed:

In exon 5, 26 cases (63.4%) were observed with normal patterns (figure 5), and 15 cases (36.6%) with alterations (figure 6), these being 8 cases of genomic instability (19.5%), 3 cases of loss of heterozygosity (7.3%), and 4 cases of altered bands, probably due to mutation in that region (9.8%) (table III).

In exon 7, 37 cases (90.2%) were observed with normal patterns (figure 9), and 4 cases (9.8%) with alterations (figure 10), these being 3 cases of genomic instability (7.3%), and 1 case of loss of heterozygosity (2.4) (table IV). No alterations were observed in exons 6 and 8, in either BE or CIM patients (figures 7 and 8).

Table III – Exon 5 alterations in the SSCP gel

| SSCP band distribution | Frequency | Percentage (%) |
|------------------------|-----------|----------------|
| Normal                 | 26        | 63.4           |
| Genomic instability    | 8         | 19.5           |
| Loss of heterozygosity | 3         | 7.3            |
| Unknown alteration     | 4         | 9.8            |

Table IV – Exon 7 alterations in the SSCP gel

| SSCP band distribution | Frequency | Percentage (%) |
|------------------------|-----------|----------------|
| Normal                 | 37        | 90.2           |
| Genomic instability    | 3         | 7.3            |
| Loss of heterozygosity | 1         | 2.4            |

It was observed that in 9 cases (56.25%) with BE and in 7 cases (43.75%) with CIM, there were molecular alterations in the exons studied, with no statistically significant difference between the two groups ( $p=1.0$ ) (table V).

**Table V. Molecular and immunohistochemical alterations by histological type.**

| Cases | Sex    | Age | Type of epithelium | SSCP    | Exon    | p53 |
|-------|--------|-----|--------------------|---------|---------|-----|
| 1     | Female | 52  | BE                 | LOH     | 5       | +   |
| 2     | Male   | 20  | BE                 | LOH     | 5       | +   |
| 3     | Male   | 54  | BE                 | LOH     | 5       | +   |
| 4     | Male   | 33  | BE                 | LOH     | 7       | +   |
| 5     | Male   | 56  | BE                 | GI      | 5       | +   |
| 6     | Female | 34  | BE                 | GI      | 5       | +   |
| 7     | Female | 62  | BE                 | GI      | 5 and 7 | +   |
| 8     | Male   | 55  | BE                 | GI      | 5 and 7 | +   |
| 9     | Male   | 72  | BE                 | Unknown | 5       | -   |
| 10    | Male   | 71  | CIM                | GI      | 5 and 7 | +   |
| 11    | Male   | 80  | CIM                | GI      | 5       | -   |
| 12    | Male   | 36  | CIM                | GI      | 5       | +   |
| 13    | Female | 53  | CIM                | GI      | 5       | +   |
| 14    | Male   | 31  | CIM                | Unknown | 5       | +   |
| 15    | Male   | 63  | CIM                | Unknown | 5       | -   |
| 16    | Male   | 68  | CIM                | Unknown | 5       | +   |

BE = Barrett's Esophagus

CIM = Cardiac Intestinal Metaplasia

**V -DISCUSSION:**

In our study we observed among 68 patients: 39.7% Chronic Esophagitis (27 cases); 30.9% Barrett's Esophagus (21 cases) and 29.4% Cardiac Intestinal Metaplasia (20 cases). Although the prevalence of Barrett's Esophagus is described as 10-12% (49), our study observed a higher frequency (30.9%). This could be explained by the higher referral rate of these patients for endoscopy, and by the small sample studied.

In our study, p53 positive expression was 56.1% (23/41 patients). We observed that overexpression of p53 protein was a common event in Cardiac Intestinal Metaplasia (39.1%) and in Barrett's Esophagus (60.9%) but there was no difference between the groups ( $p=0.28$ ). Most of the published work on p53 in Barrett's Esophagus is based on immunohistochemical staining of p53 protein. Unfortunately, this test is not accurate enough to screen for mutations, and has a low sensitivity, with roughly 65% of patients with invasive carcinoma being p53 positive (34, 49).



It is possible that the accumulation of p53 in tumor cells may, in some cases, indicate the existence of a regulatory defect rather than mutations in the protein-coding sequence of the gene. Several investigators (50, 51, 52, 53) have found discrepancies between p53 protein expression and mutation status. In some cases, weak immunostaining could also represent normal cell cycle fluctuations in p53 protein levels, as indicated in some reports (54, 55).

Immunohistochemistry may show positive staining for p53 in cells that do not have p53 mutations (36, 37). Overexpression of the p53 protein does not correlate with p53 mutation (29, 34). A p53 mutation may exist without protein overexpression (35).

In our study the alterations observed in molecular analysis could be due to polymorphisms, loss of heterozygosity, genomic instability or other unknown alteration present in exons 5 to 8. Among the exons studied, alterations were observed in 39.02% (16/41) of cases, with 12 patients showing alteration in exon 5 only, one in exon 7 only, and 3 in exons 5 and 7. Exons 6 and 8 showed no alteration in any of the patients.

About 90% of mutations reported in the p53 database are found in the core domain. This proportion may be overestimated, since many investigators have limited their analysis to exons 5 to 8. Mutations at five "hotspot" codons (175, 245, 248, 249 and 273) represent about 20% of all mutations found so far (56).

Several explanations have been proposed for the inability to detect any p53 genomic abnormality in esophageal adenocarcinoma: 1) mutations of the p53 gene may not be a systematic occurrence in this type of cancer; 2) mutations may occur in other exons of the gene, which have not been studied; and 3) tumor samples may contain inflammatory and stromal cells carrying normal DNA, and a mutation might be masked by the wild type sequence of the p53 gene (6, 15). If samples used for analysis contained relatively few "abnormal" cells in relation to normal cells, this could cause the

wild type sequence to “drown out” the mutant sequence (18, 32). cDNA sequencing might also fail to detect a mutation if the alteration is located in a position disadvantageous for proper primer (cDNA or PCR). This risk would be greatest at the extreme ends of the p53-coding region (15,18). Otherwise, clonal divergence, reflecting the histological heterogeneity of Barrett’s mucosa, is suggested by the fact that changes do not occur at all biopsy sites in each patient. Probably, the best way to minimize this risk is through the microdissection technique or PCR in situ (18).

Several DNA sequence variants (polymorphisms) have been observed in the human population. In the p53 gene, only two of these variants alter the amino-acid sequence at exon 4 (codon 47 and codon 72). There are polymorphisms at exons 2 (codon 21), 4 (codon 36) and 6 (codon 213) that do not alter the amino-acid sequence (56).

Little is known about the genetic events occurring in the metaplastic epithelium before dysplasia develops. Currently, the predictive value of p53 positivity in non-dysplastic Barrett’s epithelium is unknown. Loss of p53 function plays a major and common role in the transition from Barrett’s metaplasia to dysplasia to cancer. As yet, there is no evidence that identifying loss of p53 function is important in the outcome of patients with Barrett’s Esophagus and adenocarcinoma (15).

In view of the results, with the frequent existence of loss of heterozygosity and genomic instability, an association between these events and Barrett's Esophagus is suggested. The analysis of other exons of the p53 gene is essential to check for the occurrence of these events in other regions of the gene, in addition to characterizing possible mutations in this group of patients, thus contributing to a better understanding of the progression of esophageal adenocarcinoma.

At the current time, reliable, informative genetic testing, ready for application to broad segments of the population, is an unrealized goal. For example, in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC), even in families that meet the Amsterdam criteria, gene testing is expensive and the probability of testing positive is low. The cost barriers to genetic testing, including insurance and employment discrimination, and the uncertainties in yield have coalesced to make genetic testing for predisposition to cancer a rare event nationwide. As the methodology for testing improves, however, and as better appreciation of the significance and meaning of a positive or negative test result ensues, conditions for increased use of genetic testing could emerge (57).



## References

1. Haggitt RC, Reid BJ, Rabinovitch PS, Rubin CE. Barrett's esophagus: Correlation between mucin histochemistry, flow cytometry and histologic diagnosis for predicting increased cancer risk. *Am J Pathol* 1988;131(1):53-61.
2. Thompson JJ, Zinsser KR, Enterline HT. Barrett's metaplasia and adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Hum Pathol* 1983;14:42-61.
3. Barrett MT, Galipeau PC, Sanchez CA, Emond MJ, Reid BJ. Determination of the frequency of loss of heterozygosity in esophageal adenocarcinoma by cell sorting, whole genome amplification and microsatellite polymorphisms. *Oncogene* 1996; 12:1873-1878.
4. Hamilton SR, Smith RRL. The relationship between columnar epithelial dysplasia and invasive adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus. *Am J Clin Pathol* 1987; 87:301-312.
5. Aldulaimi D, Jankowski J. Barrett's esophagus: an overview of the molecular biology. *Dis Esophagus* 1999;12:177-180.
6. Audrézet MP, Robaszkiewicz M, Mercier B, Nousbaum JB, Hardy E, Bail JP, Volant A, Lozac'h P, Gouérou H, Férec C. Molecular analysis of the TP53 gene in Barrett's Adenocarcinoma. *Hum Mutat* 1996; 7:109-113.
7. Gleeson CM, Sloan JM, McGuigan JA, Richtie AJ, Russell SHE. Base transitions at CpG dinucleotides in the p53 gene are common in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 1995; 55:3406-3411.
8. Cameron AJ, Zinsmeister AR, Ballard DJ and Carney JA. Prevalence of columnar-lined (Barrett') esophagus. Comparison of population-based clinical and autopsy findings. *Gastroenterol* 1990; 99:918-22.
9. Lagergren J, Bergström R Lindgren A and Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Eng J Med* 1999; 340(11): 825-31.
10. Provenzale D, Schmitt C, Wong JB. Barrett's esophagus: a new look at surveillance based on emerging estimates of cancer risk. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:2043-2053.
11. Macdonald CE, Wicks AC, Playford RJ. Final results from 10 year cohort of patients undergoing surveillance for Barrett's oesophagus: observational study. *BMJ* 2000; 321(7271): 1252-1255.
12. Glickman N, Chen YY, Wang H, Antonioli D, Odze RD. Phenotypic Characteristics of a Distinctive Multilayered Epithelium Suggests That It Is a Precursor in Development of Barrett's Esophagus. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(5): 569-578.

13. Ormsby AH, Goldblum JR, Rice TW, Richter JE, Falk GW, Vaezi MF, Gramlich TL. Cytokeratin Subsets Can Reliably Distinguish Barrett's Esophagus From intestinal Metaplasia of the Stomach. *Hum Pathol* 1999; 30(3):288-294.
14. Menke-Pluymers MBE. Risk factors for neoplastic progression in Barrett's mucosa. *Eur J Surg Oncol* 1996; 22:311-316.
15. Ireland AP, Clark GWB and DeMeester TR. Barrett's esophagus. The significance of p53 in clinical practice. *Annals of Surgery* 1997; 225:17-30.
16. Dahiya R, Deng G, Selph C, Carroll P, Presti JJr. A novel p53 mutation hotspot at codon 132 (AAG>AGG) in human renal cancer. *Biochem Mol Biol Int* 44(2):407-415, 1998.
17. Gottschlich S, Maune S, Preugschat J, Hoffmann M, Werner JA, Maass JD, et al. p53 analysis of laryngeal cancer in exon 4 to 9. *Anticancer Res* 2000; 20(4):2613-2616.
18. Sjöegren S, Inganäs M, Norberg T, Lindgren A, et al. The p53 gene in breast cancer: Prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Nat Cancer Institute* 1996; 21; 88(3/4): 173-82.
19. Donehower LA, Bradley A. The tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* 1993;1155:181-205.
20. Soussi T. The p53 tumour suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. *Mol Med Today* 1996; 2(1):32-37.
21. Jankowski J, Coghil G, Hopwood D, et al: Oncogenes and onco-suppressor gene in adenocarcinoma of the esophagus. *Gut* 1992; 33:1033-1038.
22. Flejou JF, Potet F, Muzeau F et al. Overexpression of p53 protein in Barrett's syndrome with malignant transformation. *J Clin Pathol* 1993;46:330- 333.
23. Flejou JF, Paraf F, Potet F et al: p53 protein expression in Barrett's adenocarcinoma: a frequent event with no prognostic significance. *Histopathol* 1994; 24:487-9.
24. Flejou JF, Muzeau F, Potet F, Lepelletier F and Fekete F. Overexpression of the p53 tumor suppressor gene product in esophageal and gastric carcinomas. *Path Res Pract* 1994;190: 1141-8.
25. Fléjou JF, Volant A, Diebold MD, Sagan C, Vissuzaine C, Croué A, Robaszkievicz M, Potet F. Surexpression de la protéine p53 et endobrachyoesophage. *Gastroenterol Clin Biol* 19:475-481, 1995.
26. Younes M, Ertan A, Lebowitz RM, Lechago LV and Lechago J. p53 protein accumulation in Barrett's metaplasia, dysplasia and carcinoma: a follow-up study. *Gastroenterol* 1993; 105: 1637-42.



27. Jones DR, Davidson AG, Summers CL et al. Potential application of p53 as an intermediate biomarker in Barrett's esophagus. *Ann Thorac Surg* 1994; 57: 598-603.
28. Hardwick RH, Shepherd NA, Moorghen M, Newcomb PV, Alderson D: Adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus: evidence for the participation of p53 dysfunction in the dysplasia/carcinoma sequence. *Gut* 1994; 35: 764-8.
29. Hamelin R, Flejou JF, Muzeau F, et al. TP53 gene mutation and p53 protein immunoreactivity in malignant and premalignant Barrett's esophagus. *Gastroenterol* 1994; 107:1012-18.
30. Rice TW, Goldblum JR, Falk GW, et al. P53 immunoreactivity in Barrett's metaplasia dysplasia and carcinoma. *J Thorac Surg* 1994; 108:1132-37.
31. Krichnadeth KK, Tilanus HW, Blankenstein MV et al. Accumulation of genetic abnormalities during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Cancer Res* 1995; 55: 1971-6.
32. Krichnadeth KK, Van Blankenstein MV Tilanus HW. Prognostic value of p53 in Barrett esophagus. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7:81-84.
33. Moore JH, Lesser EJ, Erdody DH et al. Intestinal differentiation and p53 gene alterations in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1994; 56: 487-493.
34. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein MC, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54:4855-4878.
35. Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and others neoplasms. *Science* 1990;250:1233-1238.
36. Casson AG, Mukhophadhyay T, Cleary K.R, Ro JY, Levin B, Roth JA. p53 gene mutation in Barrett's epithelium and esophageal cancer. *Cancer Res* 1991; 51:4495-4499.
37. Casson AG, Manolopoulos B, Troster M, Kerkvliet N, O'Malley F et alli. Clinical implications of p53 gene mutation in the progression of Barrett's epithelium to invasive esophageal carcinoma. *Am J Surg* 1994; 167:52-7.
38. Casson AG, Manolopoulos B, Troster M, Kerkvliet N, O'Malley F et al. Polymorphism at codon 72 of p53 is not associated with cervical cancer risk. *Mod Pathol* 2000; 13(4):373-378.
39. Makni H, Franco EL, Kaiano J, Villa LL, Labrecque S, Dudley R, Storey A, Matlashewski G. p53 polymorphism in codon 72 and risk of human papilloma-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. *Int J Cancer* 2000; 87(4):528-33.
40. Storey A, Thomas M, Kalita A, Hardwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998;396: 530-531.



41. Kawaguchi H, Ohno S, Araki K, Miyazaki M, Saeki H, Watanabe M et al. p53 polymorphism in human papillomavirus-associated esophageal cancer. *Canc Res* 2000; 60(11): 2753-2755.
42. Olschwang S, Laurent-Puing P, Vassal A, Salmon R-J, Thomas G. Characterization of a frequent polymorphism in the coding sequence of the Tp53 gene in colonic cancer patients and a control population. *Hum Genet* 1991;86:369-370.
43. Cooper DN, Krawczak M. The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions. *Human Genet* 85:55-74, 1990.
44. Armstrong D, Blum AL, Savary M. Reflux disease ad Barrett's oesophagus. *Endoscopy* 1992; 24:9 -17.
45. Ireland AP, Shibata DK, Chandrassoma P, Lord RV, Peters JH, DeMeester TR. Clinical significance of p53 mutations in adenocarcinoma of the esophagus and cardia. *Ann Surg* 2000; 231:179-187.
46. DeMeester SR and DeMeester TR: Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus – Fifty years of controversy. *Annals of Surgery* 2000; 231(3): 303-21.
47. Canto M, Setrakian S, Petras RE, Blades E, Chak A and Sivak Jr. MV. Methylene blue selectively stains intestinal metaplasia in Barrett's esophagus. *Gastroint Endosc* 1996; 44:1-7.
48. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(7):1215.
49. Cameron AJ Barrett's esophagus and adenocarcinoma: From the family to the gene. (Editorials) *Gastroenterology* 1994;102 (4):1421-1992.
50. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor supressor gene. *Nature* 1991; 351:453-6.
51. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D et al. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cel Biol* 1988; 8:531-9.
52. Barnes DM, Hanby AM, Gillett CE, MohamedS et al. Abnormal expression of wild type p53 protein in normal cells of a cancer family patient. *Lancet* 1992; 340:259-63.
53. Warren W, Eeles RA, Ponder BA, Easton DF et al. No evidence for germline mutations in exon 5-9 of the p53 gene in 25 breast cancer families. *Oncogenes* 1992; 7: 1043-6.
54. Hall PA, McKee PH, Menage HD, Dover R et al. High levels of p53protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene* 1993; 8:203-7.

55. Shaulsky G, Ben-Zeév A, Rotter V. Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells. *Oncogene* 1990; 5: 1707-11.
56. IARC Homepage – International Agency for Research on Cancer – p53 polymorphisms – [www.p53database@iarc.fr](http://www.p53database@iarc.fr)
57. Schoen RE. Families at Risk for Colorectal Cancer – Risk Assessment and Genetic Testing. *J Clin Gastroenterol* 2000; 31(2):114-120.

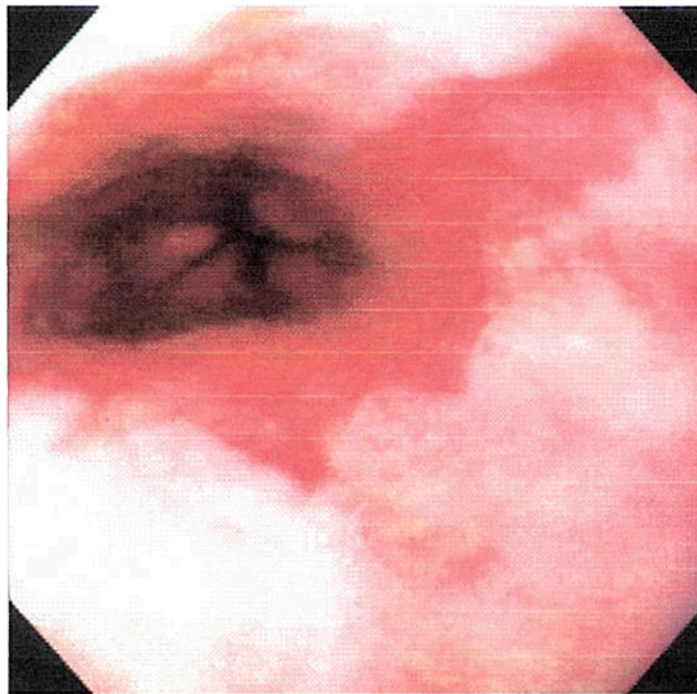
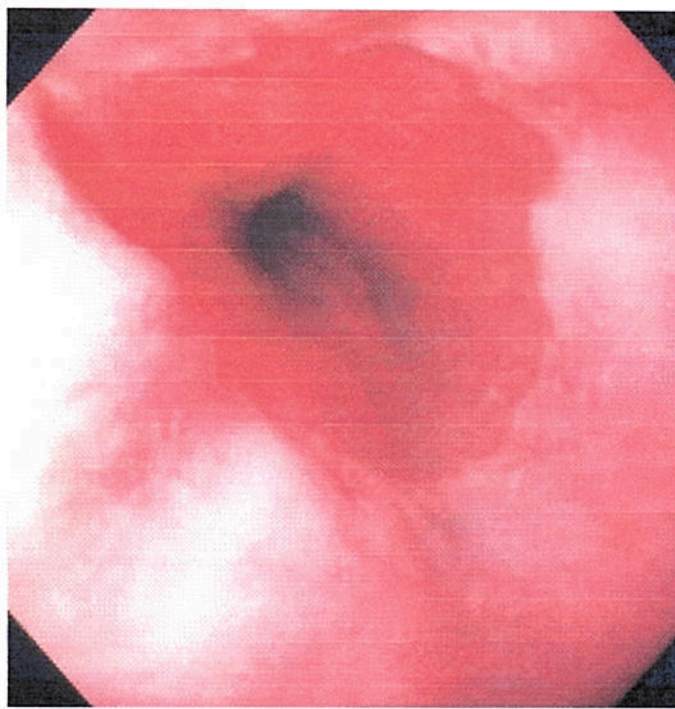


FIG. 1 · BARRETT'S ESOPHAGUS · ENDOSCOPIC ASPECTS



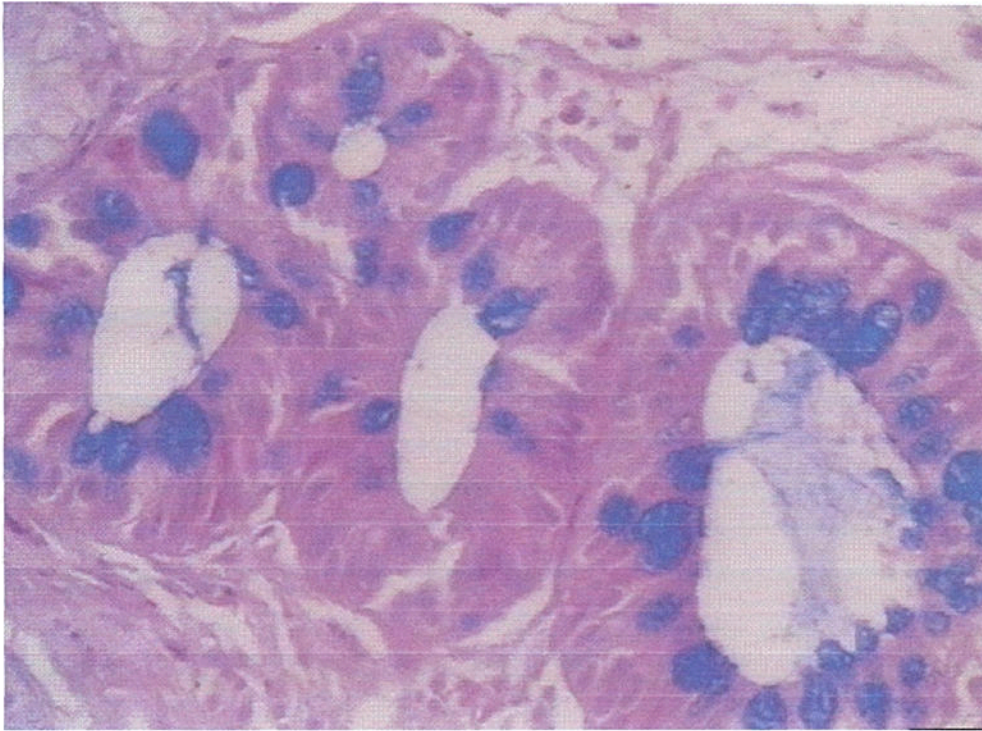


FIG. 2 · BARRETT'S ESOPHAGUS · ALCIAN-BLUE pH 2,5 STAIN

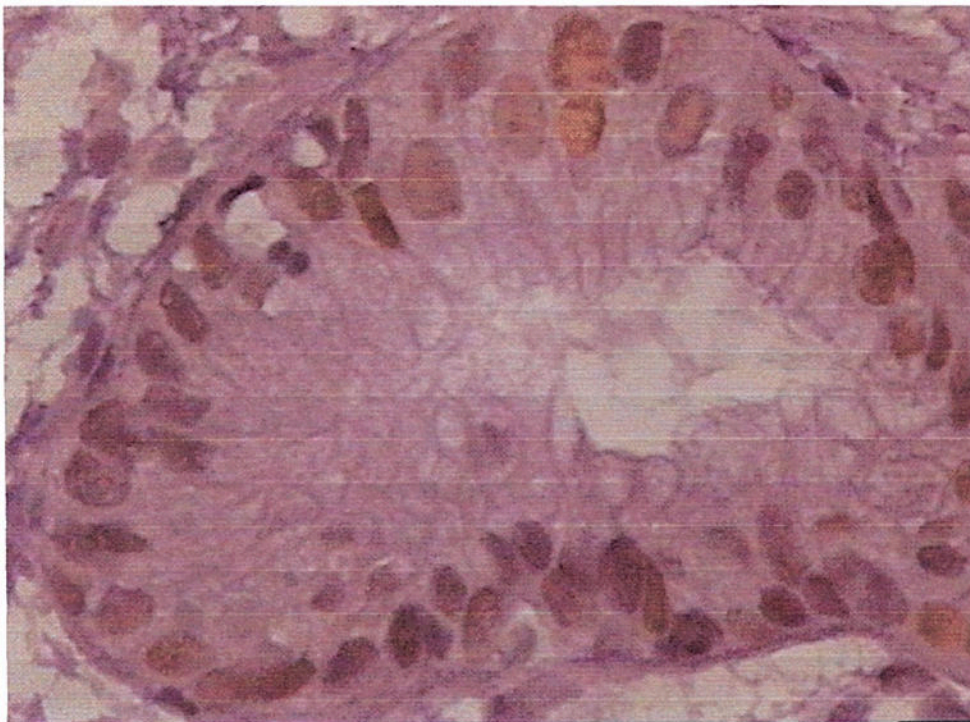
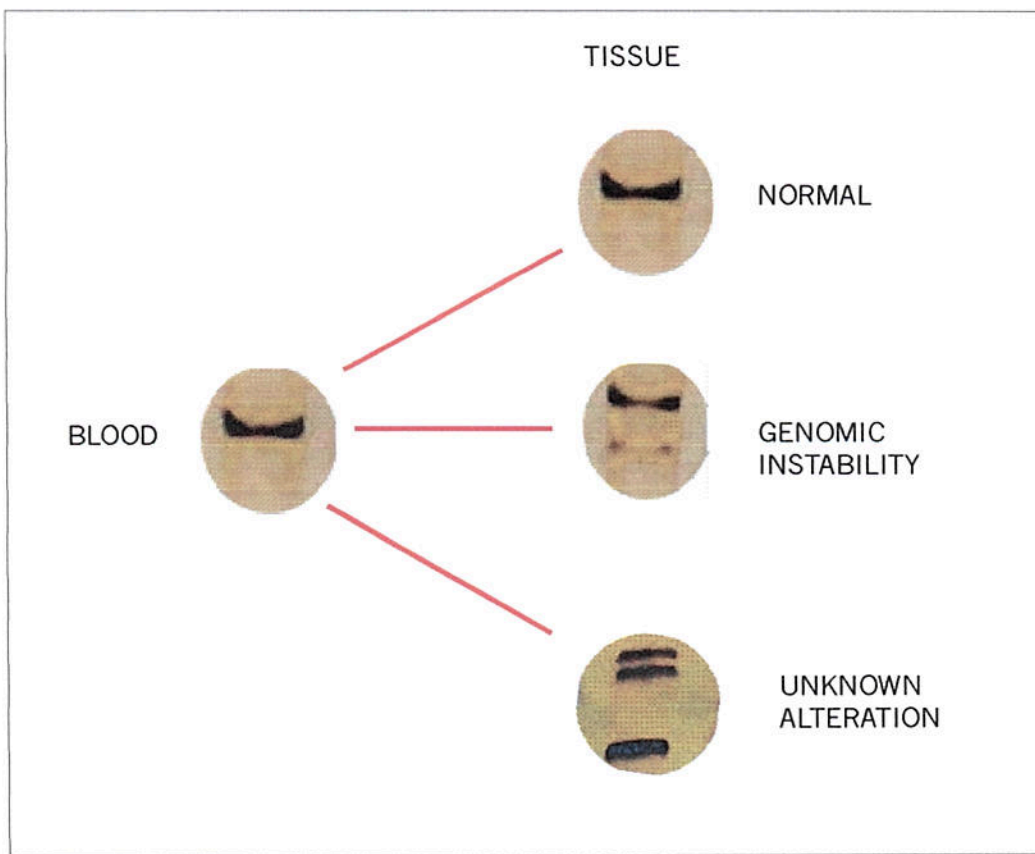
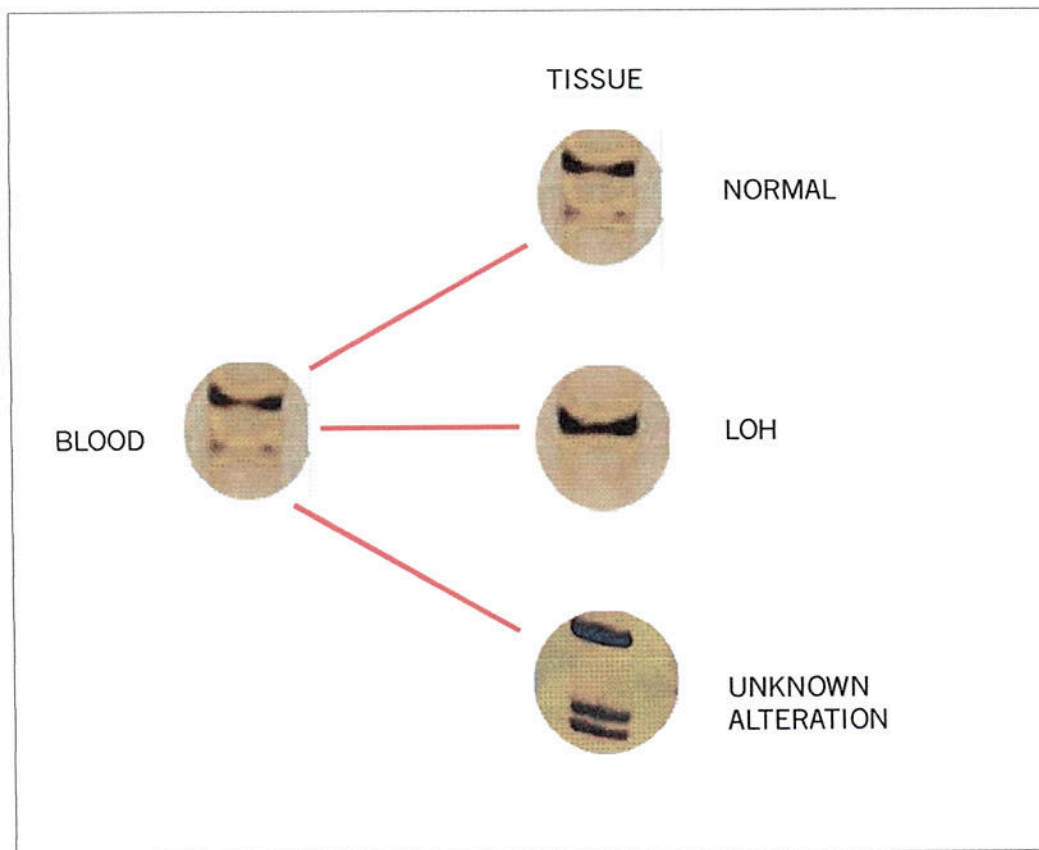


FIG. 3 · BARRETT'S ESOPHAGUS · p53 POSITIVE (IMMUNOHISTOCHEMISTRY)



A · MOLECULAR ALTERATION IN SSCP · HOMOZIGOTIC



B · MOLECULAR ALTERATION IN SSCP · HETEROZIGOTIC

FIG.4 · SCHEMATIC REPRESENTATION OF MOLECULAR ALTERATIONS IN SSCP (BLOOD AND TISSUE).



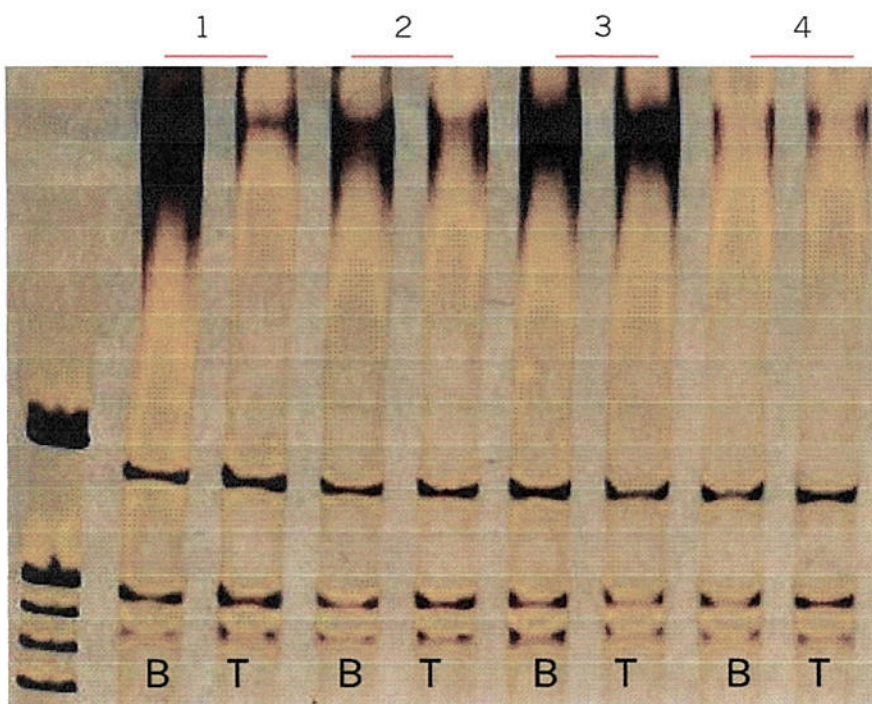


FIG. 5 -NORMAL PATTERN IN EXON 5

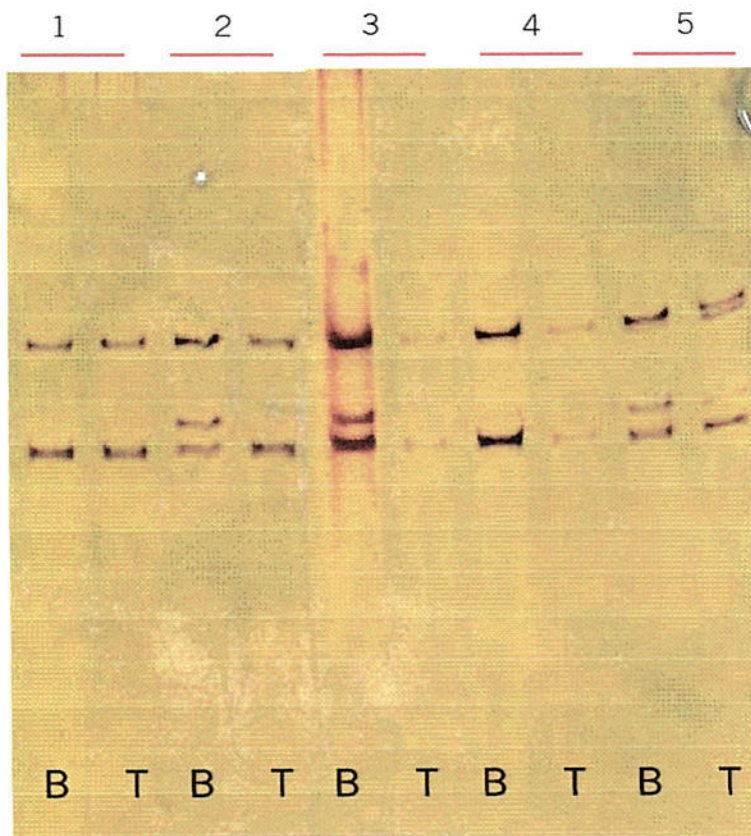


FIG. 6 - MOLECULAR ALTERATIONS IN ÉXON 5  
CASE 1 - GENOMIC INSTABILITY (GI)  
CASE 2 , 3 , 4 - LOSS OF HETEROZIGOSITY (LOH)  
CASE 5 - UNKNOWN ALTERATION



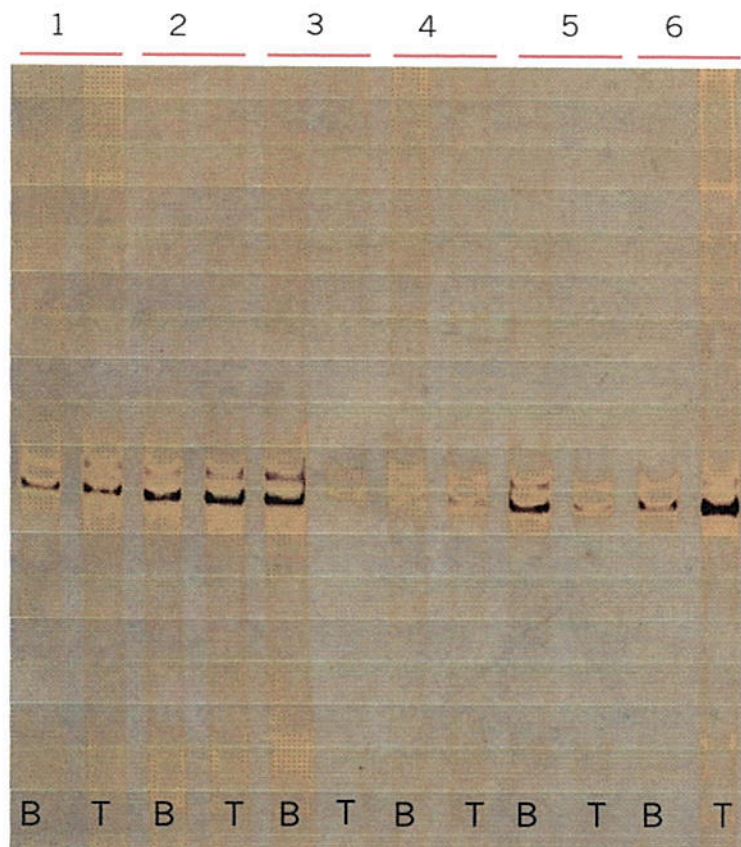


FIG. 7 -NORMAL PATTERN IN EXON 7

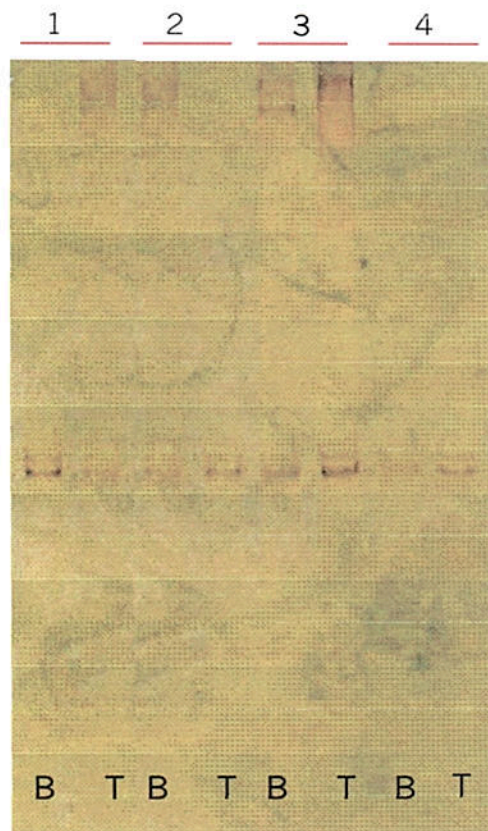


FIG. 8 -MOLECULAR ALTERATION IN EXON 7  
CASE 1 - LOSS OF HETEROZIGOSITY (LOH)  
CASE 2 , 3 , 4 - GENOMIC INSTABILITY (GI)

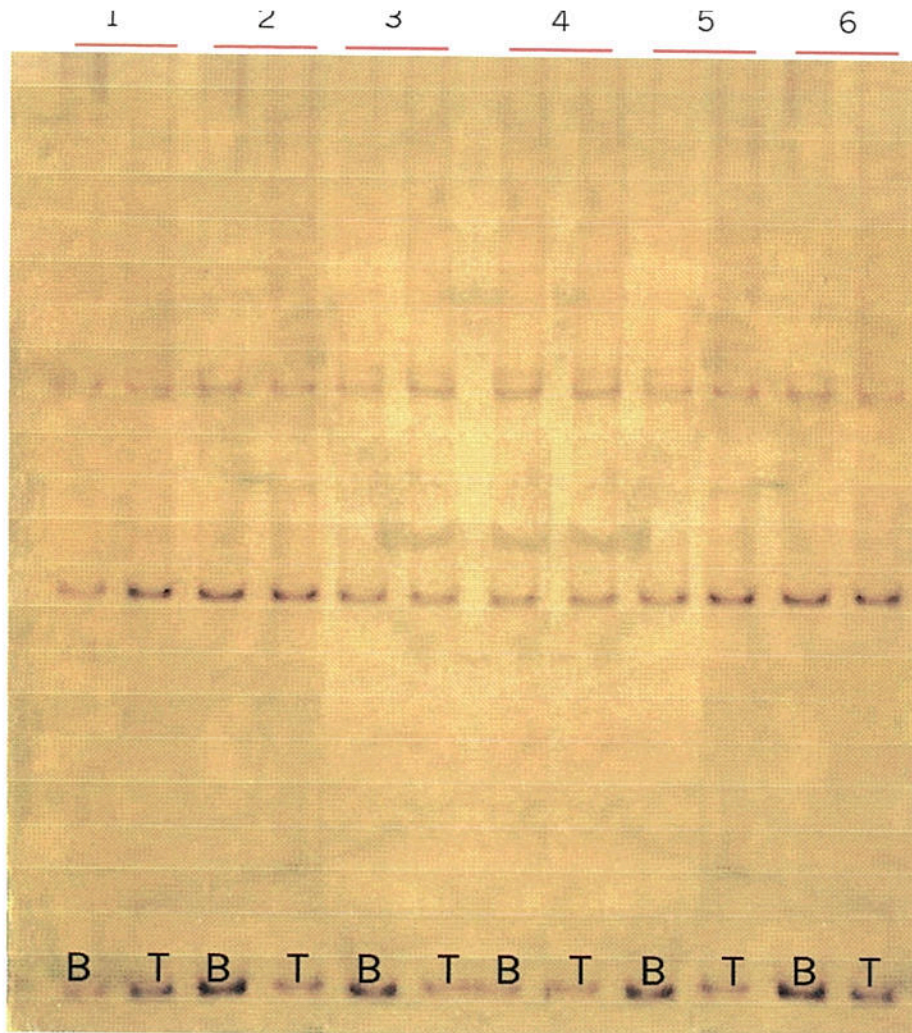


FIG. 9 -NORMAL PATTERN IN EXON 6

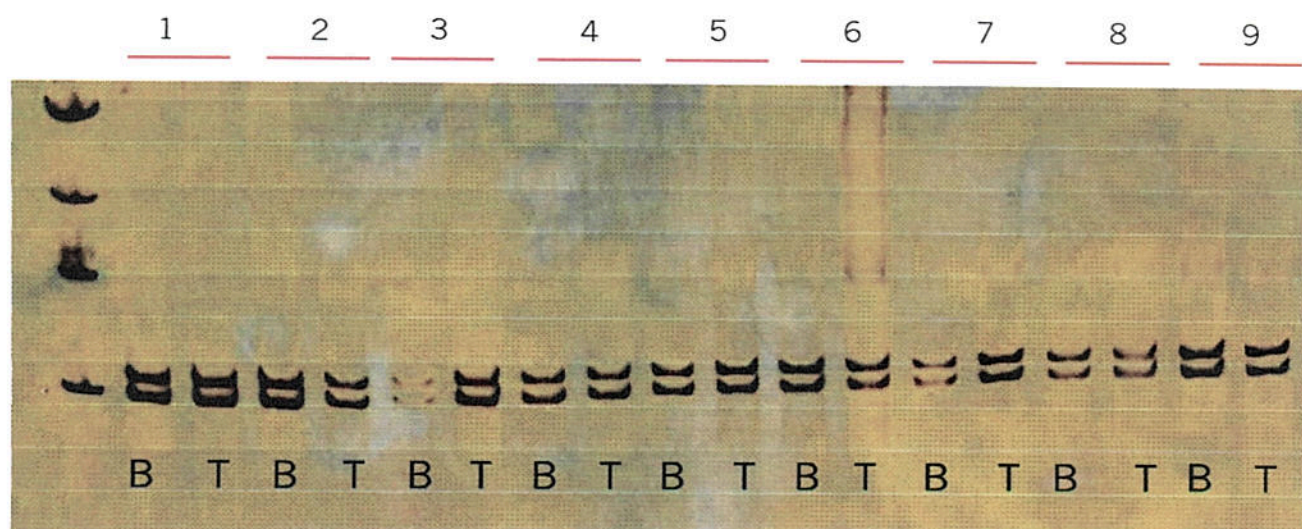


FIG. 10 -NORMAL PATTERN IN EXON 8

**ARTIGO EM LÍNGUA  
PORTUGUESA**



**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53 E ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES  
MOLECULARES NO GENE p53 EM PACIENTES COM METAPLASIA  
INTESTINAL DA CÁRDIA E NO ESÔFAGO DE BARRETT**

Fábio Segal M.D\*\*; Ana Paula B. Kaspariy\*, João Carlos Prolla, M.D, PhD.\*\*\*;  
Sandra Leistner, PhD\*

\*Serviço de Genética Médica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

\*\*Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica - UFRGS

\*\*\* Unidade de Citologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Agradecimentos: Este trabalho recebeu incentivo editorial do Grupo de Pesquisa e Pós-graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) e Fundo de Incentivo à Pesquisa/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

Endereço para correspondência:

Fábio Segal

Rua Ramiro Barcelos 910/904. CEP 90035-300, Porto Alegre, RS, Brazil.

Telefone: + 55 -14-3311-1422

e-mail: [fsegal@plug-in.com.br](mailto:fsegal@plug-in.com.br)

**RESUMO:**

**Introdução:** O aumento da expressão da proteína p53 e a presença de mutação do gene p53 são as alterações genéticas mais comuns nos tumores malignos humanos, entretanto a importância clínica desses achados ainda é controversa.

**Objetivos:** Estimar a prevalência da Metaplasia Intestinal da Cárdia (MIC) e do Esôfago de Barrett (EB), estimar a prevalência do aumento na expressão da proteína p53 e descrever as alterações moleculares nos éxons 5 a 8 do gene p53 em um grupo de pacientes com MIC e EB.

**Métodos e Casos:** Foram estudados 68 pacientes com diagnóstico de esofagite crônica (27), Esôfago de Barrett (21) e Metaplasia Intestinal da Cárdia (20). Na análise imunohistoquímica, foram utilizados anticorpos monoclonais DO-7 (DAKO). No estudo molecular, foi extraído DNA de sangue e de tecido esofágico de todos os pacientes e os fragmentos correspondentes aos éxons 5 a 8 do gene p53 foram amplificados pela PCR e após analisados pela técnica de SSCP.

**Resultados:** O estudo imunohistoquímico foi realizado em 20 casos de MIC e 21 casos de EB, observando-se uma positividade total de 56,1% (23/41), sendo 9 casos com MIC (39,1%) e 14 casos (60,9%) de EB ( $p=0,28$ ). Observou-se 15 casos alterados (36,6%) no éxon 5, sendo 8 pacientes (19,5%) com instabilidade genômica (IG), 3 pacientes (7,3%) com perda da heterozigosidade (LOH) e 4 pacientes (9,8%) com alteração desconhecida. Em relação ao éxon 7, observou-se 4 casos alterados (9,8%): 3 pacientes (7,3%) com IG e 1 paciente (2,4%) com LOH. Nenhuma alteração foi encontrada nos éxons 6 e 8.

**Conclusões:** O aumento na expressão da proteína p53 é um evento comum na MIC e no EB. As alterações moleculares observadas podem ser devido a polimorfismos, à perda da heterozigosidade, à instabilidade genômica ou por outras alterações presentes nos éxons 5 a 8 desse gene.

**Palavras-chave:** p53, Metaplasia Intestinal da Cárdia, Esôfago de Barrett.

## I – INTRODUÇÃO

O Esôfago de Barrett (EB) é uma seqüela da esofagite crônica de refluxo e desenvolve-se como uma resposta ao dano à mucosa, induzida pelo refluxo gastroesofágico . Esta entidade clínica ocorre quando há a substituição do epitélio escamoso simples por um epitélio colunar metaplásico (1,2,3). Ela é considerada uma condição predisponente ao adenocarcinoma de esôfago em cerca de 10% dos pacientes afetados (1,2).

O risco anual de carcinoma de esôfago em pacientes com metaplasia intestinal especializada é aproximadamente 1%, sendo pelo menos 30 vezes maior que a população em geral (4,5). Entretanto, a exata magnitude do risco é difícil de estimar, e a incidência da transformação maligna é relativamente baixa. O adenocarcinoma originado a partir do Esôfago de Barrett freqüentemente se manifesta em um estágio incurável e mais de 90% dos casos irão ao óbito por essa doença (6,7). Infelizmente, a incidência do adenocarcinoma está aumentando tanto nos Estados Unidos (8) como na Europa (9).

Pelo fato da incidência do adenocarcinoma esofágico estar aumentando mais rapidamente do que qualquer outra neoplasia maligna, muitos autores têm exaustivamente ressaltado a importância da investigação endoscópica anual (10). Entretanto, um estudo observacional, após um programa de vigilância endoscópica de 10 anos, em pacientes com Esôfago de Barrett, demonstrou que essa estratégia tem valor limitado (11).

A patogênese da Metaplasia Intestinal da Cárdia , do Esôfago de Barrett de Segmento Curto e do Esôfago de Barrett de Segmento Longo é pouco conhecida. Além disso, essas condições são difíceis de distinguir umas das outras, baseando-se somente



em critérios endoscópicos e histopatológicos. Infelizmente, estudos imunofenotípicos também não conseguem distinguir tais condições (12,13). O adenocarcinoma do esôfago e da cárdia têm uma frequência e um espectro de mutações no gene p53 similares, sugerindo que estes tumores tenham uma fisiopatogenia comum. Deve-se determinar a utilidade da detecção dessas mutações nesse gene tanto na MIC como no EB (8,9,11).

Durante a evolução do Esôfago de Barrett ao adenocarcinoma são observadas inúmeras alterações genômicas numéricas e estruturais. A falta de um denominador genético comum indica que um grande número de alterações gênicas possam estar envolvidas na progressão para o adenocarcinoma (14).

Existem muitos genes relacionados à carcinogênese, mas a descoberta da função do gene p53 foi o maior avanço no entendimento da biologia molecular do câncer, pois este gene supressor tumoral está relacionado à regulação do ciclo celular e exerce um importante papel em diversos tumores sólidos (15,16, 17, 18, 19, 20).

O gene p53 compreende um DNA genômico de aproximadamente 20kb, contém 11 éxons e está localizado no braço curto do cromossoma 17. Codifica uma fosfoproteína nuclear constituída por 393 aminoácidos, que tem várias funções tais como a regulação do ciclo celular, a diferenciação celular e a apoptose (15).

Mais de 90% das mutações descritas no gene p53 estão situadas entre os éxons 4 e 9, que engloba os domínios II-V da proteína. Esta região é altamente conservada evolutivamente e envolve o domínio de ligação ao DNA, essencial para a atividade do p53 (15,19,20).

Além das mutações de ponto, a perda de heterozigosidade (LOH) é um evento comum e precoce na maioria dos cânceres. Este evento é utilizado para descrever a perda de material cromossômico que, como consequência, deixa a célula com apenas

um alelo de um gene mutante. Se a região deletada contém um gene supressor tumoral, este evento pode levar ao câncer. Regiões cromossômicas com freqüentes perdas de heterozigosidade (LOH) podem apontar os genes de maior susceptibilidade e ajudar no entendimento dos eventos moleculares envolvidos na carcinogênese (15).

A proteína p53 normal (*wild-type*) tem uma meia-vida curta e é indetectável pela técnica de imunohistoquímica. Muitas mutações no gene p53 resultam em uma proteína com uma meia-vida prolongada, que se acumula na célula. Este acúmulo é a base para a detecção imunohistoquímica do aumento da expressão desta proteína. Este método é barato, rápido, fácil de realizar e disponível na maioria dos laboratórios, quando comparado a outras técnicas (15). A positividade em pacientes com displasia de alto grau e neoplasia é alta (21-36). A identificação, pela imunohistoquímica, do aumento na expressão da proteína p53 é um método indireto de detecção da mutação no gene p53 (15,35), mas existe uma significativa discordância entre o aumento na expressão da proteína e a presença de mutações no gene p53 (15,36,37).

Além de mutações associadas ao câncer, pelo menos 10 polimorfismos já foram descritos no gene p53, tanto em regiões codificantes quanto não-codificantes do gene (38-43). O polimorfismo se caracteriza pela existência, em uma população, de dois ou mais alelos de um gene, sendo que a freqüência dos alelos mais raros é maior do que uma mutação recorrente sozinha, em geral maior que 1% (15).

## **II – OBJETIVOS**

1. Estimar a prevalência de Esôfago de Barrett ou Metaplasia Intestinal da Cárdia em pacientes com doença do refluxo gastroesofágico submetidos à Endoscopia Digestiva Alta eletiva no Hospital Moinhos de Vento.
2. Estimar a prevalência da expressão da proteína p53 através de técnicas imunohistoquímicas em pacientes com diagnóstico de Esôfago de Barrett ou Metaplasia Intestinal da Cárdia
3. Descrever as alterações moleculares nos éxons 5 a 8 do gene p53 em pacientes com diagnóstico de Esôfago de Barrett ou Metaplasia Intestinal da Cárdia.

## **III – MÉTODOS E PACIENTES**

Foram estudados 68 pacientes que realizaram endoscopia digestiva alta, entre janeiro de 1997 a janeiro de 1998, no Hospital Moinhos de Vento em Porto Alegre - RS. Estes pacientes apresentavam sintomas de refluxo gastroesofágico ou foram encaminhados para realizar o exame por outras indicações. Foram identificadas ilhotas de mucosa e/ou projeções digitiformes de epitélio colunar especializado, que foi confirmado pelo estudo histopatológico. Todos os pacientes participantes assinaram um termo de consentimento que foi submetido e aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Comissões Científica e de Ética) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, registrado sob número 96304.

Após a anestesia tópica da orofaringe e a sedação com midazolam endovenoso, o exame endoscópico de rotina foi realizado com a utilização do videoendoscópio da marca Olympus, fotografando-se todos os casos. Foi registrada a distância de alguns marcos endoscópicos referenciais (junção escamocolunar e pinçamento diafragmático)



em centímetros desde a arcada dentária superior e anotadas a presença e a localização dos achados endoscópicos anormais como erosões, úlceras, ilhotas de metaplasia intestinal, lingüetas longas e curtas de mucosa metaplásica e áreas circunferenciais de metaplasia intestinal. A esofagite de refluxo foi graduada de acordo com a Classificação de Savary-Miller modificada (44). Dependendo da extensão das lingüetas no Esôfago de Barrett foram colhidas 4 a 8 amostras de biópsia, colhendo-se inicialmente na área mais distal em direção à porção mais proximal, para evitar que o sangue cobrisse a zona a ser biopsiada. Foram realizadas biópsias em intervalos de 1 a 2 cm nas áreas de mucosa metaplásica a fim de avaliar a presença de displasia. Foram realizadas biópsias sob visão direta e através da retroversão do endoscópio dentro do estômago. A localização (distância em centímetros desde os dentes incisivos) e o tipo de alteração (ilhotas, projeções digitiformes e áreas circunferenciais de metaplasia intestinal) de cada amostra de biópsia foram registradas, como ilustra a figura 1. O tamanho das lesões foi estimado usando-se como parâmetro a pinça de biópsia aberta (8 mm).

As amostras foram fixadas em solução de formalina zincada a 10% e após emblocados em parafina. Foi realizada a coloração convencional (hematoxilina-eosina) e a de Alcian-Blue pH 2,5, como pode ser visto na figura 2. Através da técnica imunohistoquímica, utilizaram-se os anticorpos monoclonais DO7, que reconhecem a forma íntegra (*wild-type*) e mutante do p53. Para determinar a positividade destes anticorpos empregou-se o método ABC (complexo avidina-biotina-peroxidase) de acordo com o protocolo do fabricante (Dako). Os anticorpos foram usados na diluição de 1:1.000 a 1:750 e o procedimento foi executado no laboratório AnatPat no Hospital Moinhos de Vento.

Todas as lâminas foram analisadas por 2 patologistas independentes, tanto para o diagnóstico histológico, como para a positividade da expressão imunohistoquímica da proteína p53 e que especificaram a proporção de cada tipo de epitélio em cada amostra

de biópsia (i.e. epitélio colunar especializado, juncional, fúndico e escamoso). Foi considerado positivo se pelo menos 10% da amostra apresenta um padrão viliforme típico, com células caliciformes características do epitélio colunar especializado, para padronizar o diagnóstico de Esôfago de Barrett. As biópsias, que continham focos de metaplasia intestinal dentro da mucosa da cárdia, obtidas de uma junção esofagogástrica aparentemente normal, foram consideradas como Metaplasia Intestinal da Cárdia (45,46,47). Todas as biópsias apresentaram graus variados de inflamação crônica, caracterizados pela infiltração de linfócitos e células plasmáticas na submucosa. Não foi identificada displasia em nenhuma das amostras.

Foram considerados positivos os casos que apresentaram mais de 10% de células coradas por campo microscópico de 400 aumentos. Classificando-se nas categorias positiva (figura 3) e negativa para a expressão do p53 a imunohistoquímica, houve um grau elevado de concordância entre os dois patologistas, ficando em 87,8%, com um coeficiente kappa = 0,74. Os casos duvidosos foram vistos por um terceiro patologista de reconhecida experiência (JCP), que determinou quais os casos seriam positivos ou negativos.

#### Investigação Molecular:

1-Extração do DNA genômico (sangue e tecido) – As amostras de tecido esofágico foram retiradas por biópsia endoscópica e foram colhidos 10mL de sangue de cada paciente, sendo colocado em tubo com EDTA. Após foi realizada a extração do DNA, tanto do sangue quanto do tecido. Foi utilizado o método de precipitação por sais, descrito por Miller *et al.*, 1988 (48). O DNA foi conservado em uma solução de Tris-EDTA (Tris-HCl 10mM pH 7,5 e EDTA 1mM pH 8) à temperatura de – 20°C. O tecido foi mantido a temperatura de -20°C até a realização da extração de DNA.

2- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) - Seguiu-se com a amplificação dos éxons 5 a 8 do gene p53, utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Na

PCR, foi utilizado em cada tubo 0,2 mM de DNTP Sigma, 5 $\mu$ L de tampão de amônio (16mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67mM de Tris.HCl pH 8.8 e 0,1% de Tween 20), 2 UI de DNA Taq polimerase (Gibco), 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 20pmóis de *primers* específicos para o fragmento (Gibco BRL) a ser amplificado, para um volume final de 50  $\mu$ L. A seqüência dos *primers* (5'to 3') utilizados foi:

Éxon 5 Forward - GTG CCC TGA CTT TCA ACT  
5 Reverse - GGG CAA CCA GCC CTG TCG

Éxon 6 Forward – CGT CTA GAA TTC CTC ACT GAT TGC TC  
6 Reverse – CGG TCG ACA GTT GCA TAC CAG A

Éxon 7 Forward – AGG CGC ACT GGC CTC ATC TT  
7 Reverse – TCA GCG GCA AGC AGA GGC TG

Éxon 8 Forward – GGA CAG GTA GGA CCT GAT TTC CTT AC  
8 Reverse – TGC ACC CTT GGT CTC CTC CAC

Utilizou-se um programa com desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 40 segundos, com 94°C de desnaturação, 51- 55°C de temperatura de anelamento (conforme o éxon) e extensão a 72°C, com extensão final de 72°C por 10 minutos. O fragmento amplificado foi visualizado pela técnica de eletroforese em gel de agarose 2%, corado com 3 $\mu$ L de brometo de etídio. O produto amplificado foi armazenado a uma temperatura de 4°C até a análise.

3- Análise de Conformação de Cadeia Simples (*Single-Strand Conformation Polymorphism* – SSCP): A análise molecular foi realizada utilizando-se a técnica de SSCP, em que um padrão anormal de bandas, após a eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante, indica uma alteração na seqüência primária no DNA. Para determinar o padrão normal de distribuição das bandas no gel de SSCP foram consideradas as amostras de tecido de 27 pacientes com esofagite crônica (casos controles) e de sangue de doadores não-identificados obtidos no Banco de Sangue do HCPA.



#### 4- Análise da Perda da Heterozigosidade (LOH) e Instabilidade Genômica (GI)

Foi realizada a análise molecular dos éxons 5, 6, 7 e 8 do gene p53 a partir do DNA extraído de sangue e tecido dos indivíduos com Metaplasia Intestinal da Cárdia e com Esôfago de Barrett. Em relação à análise de perda de heterozigosidade (LOH), foram considerados os indivíduos que apresentaram padrão heterozigoto no sangue, correlacionando-o com os achados no tecido. Pela técnica de SSCP, foi considerada perda de heterozigosidade (LOH) quando ocorreu o desaparecimento de uma banda ao gel de SSCP, representando a perda de um dos alelos no tecido esofágico, em comparação ao número de bandas contidas nas amostras do sangue dos pacientes. Na análise de instabilidade genômica (IG) foram considerados apenas os indivíduos homozigotos no sangue. Foi considerado IG quando ocorreu o ganho de um alelo no tecido, quando comparado ao sangue, pela técnica de SSCP. Outras alterações, na distribuição das bandas no gel de SSCP, observadas no tecido em relação ao sangue, podem ser atribuídas a prováveis mutações, sendo consideradas na análise dos resultados, como alterações desconhecidas. Tais alterações são exemplificadas na figura 4. O seqüenciamento (cDNA) seria o método ideal para a identificação da natureza dessas alterações.

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo Método de Qui-quadrado de Pearson no programa EPI-INFO 6.1.

## **IV – RESULTADOS**

### **1. Resultados dos exames endoscópico e histopatológico.**

Foram estudados 68 pacientes com os seguintes diagnósticos histológicos: 27 casos com esofagite crônica (39,7%), 21 casos com Esôfago de Barrett (30,9%) e 20 casos com Metaplasia Intestinal da Cárdia (29,4%), conforme tabela I.

Tabela I – Freqüência de acordo com os achados histológicos

| Diagnóstico histológico         | Freqüência Absoluta | Percentual (%) |
|---------------------------------|---------------------|----------------|
| Esofagite crônica               | 27                  | 39,7           |
| Esôfago de Barrett              | 21                  | 30,9           |
| Metaplasia Intestinal da Cárdia | 20                  | 29,4           |
| <b>Total</b>                    | <b>68</b>           | <b>100</b>     |

## 2. Análise imunohistoquímica do gene p53.

Foram analisados 41 casos (21 EB e 20 MIC) através da técnica de imunohistoquímica, identificados 23 casos positivos (56,1%) e 18 casos negativos (43,9%).

Nos casos de EB, houve uma positividade de 60,9% (14 casos) e 39,1% (9 casos) na MIC de à imunohistoquímica, não se observando diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,28$ ), conforme tabela II.

Tabela II – Resultados do p53 de acordo com diagnóstico histológico

|                                 | P53 Positivo | P53 negativo | Total |
|---------------------------------|--------------|--------------|-------|
| Esôfago de Barrett              | 14           | 7            | 21    |
| Metaplasia Intestinal Da Cárdia | 9            | 11           | 20    |

Chi-Square = 1,17     $p= 0,28$

### 3. Análise da molecular do gene p53 – Éxons 5, 6, 7 e 8.

Foram analisados os éxons 5, 6, 7 e 8 do gene p53 através do DNA extraído de sangue e tecido de 41 pacientes (21 casos de EB e 20 casos de MIC), e observadas as seguintes alterações:

No éxon 5 foram observados 26 casos (63,4%) com padrões normais de distribuição das bandas (fotografia 5) e em 15 casos (36,6%) foram observadas alterações (fotografia 6), tais como 8 casos de instabilidade genômica (19,5%), 3 casos de perda de heterozigosidade (7,3%) e 4 casos padrões de bandas alterados provavelmente devido à mutação naquela região (9,8%), conforme se observa na tabela III.

Em relação ao éxon 7, observou-se uma distribuição normal das bandas no gel de SSCP em 37 casos (90,2%) e 4 casos alterados (9,8%), sendo 3 casos de instabilidade genômica (7,3%) e 1 caso de perda de heterozigosidade (2,4%), como pode ser visto na tabela IV e nas figuras 7 e 8.

Não foram observadas alterações nos éxons 6 e 8 tanto nos casos de Esôfago de Barrett como na Metaplasia Intestinal da Cárdia (figuras 9 e 10).

**Tabela III – Alterações no éxon 5 no gel de SSCP**

| <b>Distribuição das bandas no SSCP</b> | <b>Frequência Absoluta</b> | <b>Frequência Relativa (%)</b> |
|--|----------------------------|--------------------------------|
| <b>Normal</b>                          | <b>26</b>                  | <b>63,4</b>                    |
| <b>Instabilidade genômica</b>          | <b>8</b>                   | <b>19,5</b>                    |
| <b>Perda de heterozigosidade</b>       | <b>3</b>                   | <b>7,3</b>                     |
| <b>Alteração desconhecida</b>          | <b>4</b>                   | <b>9,8</b>                     |



Tabela IV – Alterações no éxon 7 no gel de SSCP

| Distribuição das bandas no SSCP | Frequência Absoluta | Frequência Relativa (%) |
|---------------------------------|---------------------|-------------------------|
| Normal                          | 37                  | 90,2                    |
| Instabilidade genômica          | 3                   | 7,3                     |
| Perda de heterozigosidade       | 1                   | 2,4                     |

Foi observado que em 9 casos (56,25%) com EB e em 7 casos (43,75%) de MIC houve alterações moleculares nos éxons estudados, não ocorrendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,845$ ) como pode ser visto na tabela V

Tabela V. Alterações moleculares e imunohistoquímicas de acordo com o tipo histológico

| Casos | Sexo      | Idade | Tipo de epitélio | SSCP         | Éxon  | p53 |
|-------|-----------|-------|------------------|--------------|-------|-----|
| 1     | Feminino  | 52    | EB               | LOH          | 5     | +   |
| 2     | Masculino | 20    | EB               | LOH          | 5     | +   |
| 3     | Masculino | 54    | EB               | LOH          | 5     | +   |
| 4     | Masculino | 33    | EB               | LOH          | 7     | +   |
| 5     | Masculino | 56    | EB               | IG           | 5     | +   |
| 6     | Feminino  | 34    | EB               | IG           | 5     | +   |
| 7     | Feminino  | 62    | EB               | IG           | 5 e 7 | +   |
| 8     | Masculino | 55    | EB               | IG           | 5 e 7 | +   |
| 9     | Masculino | 72    | EB               | Desconhecida | 5     | -   |
| 10    | Masculino | 71    | MIC              | IG           | 5 e 7 | +   |
| 11    | Masculino | 80    | MIC              | IG           | 5     | -   |
| 12    | Masculino | 36    | MIC              | IG           | 5     | +   |
| 13    | Feminino  | 53    | MIC              | IG           | 5     | +   |
| 14    | Masculino | 31    | MIC              | Desconhecida | 5     | +   |
| 15    | Masculino | 63    | MIC              | Desconhecida | 5     | -   |
| 16    | Masculino | 68    | MIC              | Desconhecida | 5     | +   |

EB = Esôfago de Barrett

LOH = Perda da Heterozigosidade

Desconhecida = Alteração desconhecida

MIC = Metaplasia Intestinal da Cárdia

IG = Instabilidade Genômica

$p= 0,845$

## V – DISCUSSÃO

Observamos em nosso estudo 68 pacientes: 39,7% de esofagite crônica (27 casos), 30,9% de Esôfago de Barrett (21 casos) e 29,4% de Metaplasia Intestinal da Cárdia (20 casos).

Apesar de ser descrita uma prevalência de 10-12% de Esôfago de Barrett em pacientes com queixas de refluxo (49) , em nosso estudo, observou-se uma alta frequência (30,9%). Isso pode ser explicado por uma maior referência de pacientes sintomáticos para fazer endoscopia e pela pequena amostra de pacientes estudados.

A positividade para a expressão da proteína p53 foi de 56,1% (23/41 pacientes) observando-se que o aumento da expressão da proteína foi um evento comum na Metaplasia Intestinal da Cárdia (39,1%) e no Esôfago de Barrett (60,9%). Apesar disso, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,28$ ).

A maioria dos trabalhos publicados sobre o p53 em pacientes com Esôfago de Barrett é baseada em estudos imunohistoquímicos. Infelizmente, esta técnica não apresenta acurácia suficiente para identificar mutações, pois tem baixa sensibilidade, com uma positividade em torno de 65% em pacientes com carcinoma invasor (34,49).

É possível que o acúmulo do p53 em células tumorais pode, em alguns casos, indicar a existência de um defeito regulatório na seqüência codificadora de proteínas ao invés de mutações no gene. Muitos investigadores (50-55) têm observado discrepâncias entre a expressão da proteína p53 e a presença de mutações. Em alguns casos, uma coloração fraca pode representar a flutuação normal nos níveis da proteína p53 no ciclo celular (54,55).

A técnica de Imunohistoquímica pode exibir uma positividade na expressão da proteína em células que não apresentam mutações na p53 (36,37). O aumento da expressão da proteína não se correlaciona com a mutação (29,34), uma vez que esta mutação pode existir sem aumento da expressão da proteína (35).

Em nosso estudo, as alterações observadas na análise molecular podem ser devido a polimorfismos, à perda da heterozigosidade, à instabilidade genômica ou outras alterações presentes nos éxons 5 a 8. Observaram-se alterações moleculares em 39,0% (16/41) dos casos nos éxons estudados, sendo que em 7 pacientes as alterações foram no éxon 5 e em 1 caso no éxon 7 e em 3 pacientes as alterações ocorreram nos éxons 5 e 7. Não foram identificadas alterações nos éxon 6 e 8 em nenhum dos indivíduos examinados.

Cerca de 90% das mutações relatadas encontra-se nas regiões de domínio de ligação ao DNA do gene p53. Esta proporção pode ser superestimada, já que a maioria das investigações limita suas análises aos éxons 5 a 8. Mutações em cinco códons considerados "*hot spots*" (175,245,248,249e 273) representam cerca de 20% das mutações descritas (56).

Diversas explicações têm sido propostas para justificar a inabilidade de detectar anormalidades genômicas no adenocarcinoma: 1) mutações no gene p53 podem não ser uma ocorrência sistemática neste tipo de neoplasia; 2) mutações podem ocorrer em outros éxons do gene, que não foram estudados; ou 3) a amostra do tumor pode apresentar células inflamatórias e do estroma contendo DNA normal; dessa forma, a mutação pode ser mascarada por uma seqüência normal do gene p53 (6,15), porque se a amostra utilizada para a análise contiver uma quantidade relativamente pequena de células tumorais, em relação às células normais, pode ocorrer a amplificação



preferencial da seqüência normal (wild-type) em relação a seqüência mutante (18,32). O seqüenciamento (cDNA) também pode falhar na detecção de mutações se a alteração estiver localizada em uma posição desvantajosa ao *primer* (cDNA ou PCR). Este risco pode ser maior nas porções extremas das regiões codificantes do p53 (15,18). Por outro lado, observam-se divergências clonais, refletindo a heterogeneidade da mucosa do Barrett, pelo fato das mudanças não ocorrerem em todas as áreas da biópsia. Provavelmente, a melhor forma de minimizar este risco é através da técnica de microdissecção ou PCR *in situ* (18).

Muitas variantes seqüenciais do DNA (polimorfismos) têm sido descritas. No gene p53 apenas duas dessas variantes alteram a seqüência dos aminoácidos no éxon 4 (códon 47 e códon 72). Existem polimorfismos no éxon 2 (códon 21), no éxon 4 (códon 36) e no éxon 6 (códon 213) que não alteram a seqüência de aminoácidos (56). Pouco se sabe sobre eventos genéticos ocorridos no epitélio metaplásico antes do desenvolvimento da displasia. O valor preditivo da positividade do p53 no epitélio de Barrett não displásico é desconhecido. A perda da função do p53 representa um importante papel na transição da metaplasia intestinal característica do Esôfago de Barrett para a displasia do câncer. Entretanto, até o momento, não há evidências que provem que a perda da função do gene seja importante na evolução dos pacientes com Esôfago de Barrett para o adenocarcinoma (15).

Diante dos resultados encontrados, com a presença freqüente da perda de heterozigidade e da instabilidade genômica, poderíamos sugerir uma associação entre estes eventos e o Esôfago de Barrett. A análise de outros éxons do gene p53 é de fundamental importância para verificar a existência destes eventos em outras regiões do gene, além da caracterização de possíveis mutações neste grupo de pacientes, contribuindo para um melhor entendimento da progressão do carcinoma esofágico.

Até o presente momento, testes genéticos informativos, prontos a serem aplicados em grandes segmentos da população, ainda são uma realidade distante. Por exemplo, no câncer colo-retal não polipóide hereditário, mesmo em famílias que preencham os critérios de Amsterdã, os testes genéticos são caros, com uma baixa positividade, além de existir resistência nas empresas de seguro-saúde, risco de discriminação entre empregadores e a incerteza destes testes demonstrarem a predisposição ao câncer, numa pequena amostra da população afetada . O aprimoramento na metodologia desses testes, com uma melhor interpretação dos resultados, permitirá um adequado uso diagnóstico e uma melhora no prognóstico dos pacientes (57).

## Referências

1. Haggitt RC, Reid BJ, Rabinovitch PS, Rubin CE. Barrett's esophagus: Correlation between mucin histochemistry, flow cytometry and histologic diagnosis for predicting increased cancer risk. *Am J Pathol* 1988;131(1):53-61.
2. Thompson JJ, Zinsser KR, Enterline HT. Barrett's metaplasia and adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Hum Pathol* 1983;14:42-61.
3. Barrett MT, Galipeau PC, Sanchez CA, Emond MJ, Reid BJ. Determination of the frequency of loss of heterozygosity in esophageal adenocarcinoma by cell sorting, whole genome amplification and microsatellite polymorphisms. *Oncogene* 1996; 12:1873-1878.
4. Hamilton SR, Smith RRL. The relationship between columnar epithelial dysplasia and invasive adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus. *Am J Clin Pathol* 1987; 87:301-312.
5. Aldulaimi D, Jankowski J. Barrett's esophagus: an overview of the molecular biology. *Dis Esophagus* 1999;12:177-180.
6. Audrézet MP, Robaszkiewicz M, Mercier B, Nousbaum JB, Hardy E, Bail JP, Volant A, Lozac'h P, Gouérou H, Férec C. Molecular analysis of the TP53 gene in Barrett's Adenocarcinoma. *Hum Mutat* 1996; 7:109-113.
7. Gleeson CM, Sloan JM, McGuigan JA, Richtie AJ, Russell SHE. Base transitions at CpG dinucleotides in the p53 gene are common in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 1995; 55:3406-3411.
8. Cameron AJ, Zinsmeister AR, Ballard DJ and Camey JA. Prevalence of columnar-lined (Barrett') esophagus. Comparison of population-based clinical and autopsy findings. *Gastroenterol* 1990; 99:918-22.
9. Lagergren J, Bergström R Lindgren A and Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Eng J Med* 1999;340 (11): 825-31.
10. Provenzale D, Schmitt C, Wong JB. Barrett's esophagus: a new look at surveillance based on emerging estimates of cancer risk. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:2043-2053.



11. Macdonald CE, Wicks AC, Playford RJ. Final results from 10 year cohort of patients undergoing surveillance for Barrett's oesophagus: observational study. *BMJ* 2000; 321(7271): 1252-1255.
12. Glickman N, Chen YY, Wang H, Antonioli D, Odze RD. Phenotypic Characteristics of a Distinctive Multilayered Epithelium Suggests That It Is a Precursor in Development of Barrett's Esophagus. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(5): 569-578.
13. Ormsby AH, Goldblum JR, Rice TW, Richter JE, Falk GW, Vaezi MF, Gramlich TL. Cytokeratin Subsets Can Reliably Distinguish Barrett's Esophagus From intestinal Metaplasia of the Stomach. *Hum Pathol* 1999; 30(3):288-294.
14. Menke-Pluymers MBE. Risk factors for neoplastic progression in Barrett's mucosa. *Eur J Surg Oncol* 1996; 22:311-316.
15. Ireland AP, Clark GWB and DeMeester TR. Barrett's esophagus. The significance of p53 in clinical practice. *Annals of Surgery* 1997; 225:17-30.
16. Dahiya R, Deng G, Selph C, Carroll P, Presti JJr. A novel p53 mutation hotspot at codon 132 (AAG>AGG) in human renal cancer. *Biochem Mol Biol Int* 44(2):407-415, 1998.
17. Gottschlich S, Maune S, Preugschat J, Hoffmann M, Werner JA, Maass JD, et al. p53 analysis of laryngeal cancer in exon 4 to 9. *Anticancer Res* 2000; 20(4):2613-2616.
18. Sjöegren S, Inganäs M, Norberg T, Lindgren A, et al. The p53 gene in breast cancer: Prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Nat Cancer Institute* 1996; 21; 88(3/4): 173-82.
19. Donehower LA, Bradley A. The tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* 1993;1155:181-205.
20. Soussi T. The p53 tumour suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. *Mol Med Today* 1996; 2(1):32-37.
21. Jankowski J, Coghill G, Hopwood D, et alli: Oncogenes and onco-suppressor gene in adenocarcinoma of the esophagus. *Gut* 1992; 33:1033-1038.
22. Flejou JF, Potet F, Muzeau F et alli. Overexpression of p53 protein in Barrett's syndrome with malignant transformation. *J Clin Pathol* 1993; 46:330-3.
23. Flejou JF, Paraf F, Potet F et alli: p53 protein expression in Barrett's adenocarcinoma: a frequent event with no prognostic significance. *Histopathology* 1994; 24:487-9.

24. Flejou JF, Muzeau F, Potet F, Lepelletier F and Fekete F. Overexpression of the p53 tumor suppressor gene product in esophageal and gastric carcinomas. *Path Res Pract* 1994;190: 1141-8.
25. Fléjou JF, Volant A, Diebold MD, Sagan C, Vissuzaine C, Croué A et al. Surexpression de la protéine p53 et endobrachyoesophage. *Gastroenterol Clin Biol* 19:475-481, 1995.
26. Younes M, Ertan A, Lebowitz RM, Lechago LV and Lechago J. p53 protein accumulation in Barrett's metaplasia, dysplasia and carcinoma: a follow-up study. *Gastroenterol* 1993; 105: 1637-42.
27. Jones DR, Davidson AG, Summers CL et al. Potential application of p53 as an intermediate biomarker in Barrett's esophagus. *Ann Thorac Surg* 1994; 57: 598-603.
28. Hardwick RH, Shepherd NA, Moorghen M, Newcomb PV, Alderson D. Adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus: evidence for the participation of p53 dysfunction in the dysplasia/carcinoma sequence. *Gut* 1994; 35: 764-8.
28. Hamelin R, Flejou JF, Muzeau F, et al. TP53 gene mutation and p53 protein immunoreactivity in malignant and premalignant Barrett's esophagus. *Gastroenterol* 1994; 107:1012-18.
29. Rice TW, Goldblum JR, Falk GW, et al. P53 immunoreactivity in Barrett's metaplasia, dysplasia and carcinoma. *J Thorac Surg* 1994; 108:1132-37.
30. Krichnadeth KK, Tilanus HW, Blankenstein MV et al. Accumulation of genetic abnormalities during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Cancer Res* 1995; 55: 1971-6.
31. Krichnadeth KK, Van Blankenstein MV Tilanus HW. Prognostic value of p53 in Barrett's esophagus. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7:81-84.
32. Moore JH, Lesser EJ, Erdody DH et al. Intestinal differentiation and p53 gene alterations in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1994; 56: 487-493.
33. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein MC, Harris CC. Mutations in the p53 tumor supressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54:4855-4878.
34. Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and others neoplasms. *Science* 1990; 250:1233-1238.



35. Casson AG, Mukhopadhyay T, Cleary K.R, Ro JY, Levin B, Roth JA. p53 gene mutation in Barrett's epithelium and esophageal cancer. *Cancer Res* 1991; 51:4495-4499.
36. Casson AG, Manolopoulos B, Troster M, Kerkvliet N, O'Malley F et alli. Clinical implications of p53 gene mutation in the progression of Barrett's epithelium to invasive esophageal carcinoma. *Am J Surg* 1994; 167:52-7.
38. Casson AG, Manolopoulos B, Troster M, Kerkvliet N, O'Malley F et al. Polymorphism at codon 72 of p53 is not associated with cervical cancer risk. *Mod Pathol* 2000; 13(4):373-378.
39. Makni H, Franco EL, Kaiano J, Villa LL, Labrecque S, Dudley R, et al. p53 polymorphism in codon 72 and risk of human papilloma-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. *Int J Cancer* 2000; 87(4):528-33.
40. Storey A, Thomas M, Kalita A, Hardwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 1998;396: 530-531.
41. Kawaguchi H, Ohno S, Araki K, Miyazaki M, Saeki H, Watanabe M et al. p53 polymorphism in human papillomavirus-associated esophageal cancer. *Canc Res* 2000; 60(11): 2753-2755.
42. Olschwang S, Laurent-Puing P, Vassal A, Salmon R-J, Thomas G. Characterization of a frequent polymorphism in the coding sequence of the Tp53 gene in colonic cancer patients and a control population. *Hum Genet* 1991;86:369-370.
43. Cooper DN, Krawczak M. The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions. *Human Genet* 1990, 85: 55-74.
44. Armstrong D, Blum AL, Savary M. Reflux disease ad Barrett's oesophagus. *Endoscopy* 1992; 24:9 -17.
45. Ireland AP, Shibata DK, Chandrassoma P, Lord RV, Peters JH, DeMeester TR. Clinical significance of p53 mutations in adenocarcinoma of the esophagus and cardia. *Ann Surg* 2000; 231:179-187.
46. DeMeester SR and DeMeester TR: Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus – Fifty years of controversy. *Ann Surg* 2000; 231(3): 303-21.
47. Canto M, Setrakian S, Petras RE, Blades E, Chak A and Sivak Jr. MV. Methylene blue selectively stains intestinal metaplasia in Barrett's esophagus. *Gastroint Endosc* 1996; 44:1-7.



48. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(7):1215.
49. Cameron AJ Barrett's esophagus and adenocarcinoma: From the family to the gene. (Editorials) *Gastroenterol* 1994;102 (4):1421-1992.
50. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor supressor gene. *Nature* 1991; 351:453-6.
51. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D et al. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cel Biol* 1988; 8:531-9.
52. Barnes DM, Hanby AM, Gillett CE, MohamedS et al. Abnormal expression of wild type p53 protein in normal cells of a cancer family patient. *Lancet* 1992; 340:259-63.
53. Warren W, Eeles RA, Ponder BA, Easton DF et al. No evidence for germline mutations in exon 5-9 of the p53 gene in 25 breast cancer families. *Oncogenes* 1992; 7: 1043-6.
54. Hall PA, McKee PH, Menage HD, Dover R et al. High levels of p53protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene* 1993; 8:203-7.
55. Shaulsky G, Ben-Zeév A, Rotter V. Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells. *Oncogene* 1990; 5: 1707-11.
56. IARC Homepage–International Agency for Research on Cancer – p53 polymorphism – [www.p53database@iarc.fr](mailto:www.p53database@iarc.fr)
57. Schoen RE. Families at Risk for Colorectal Cancer – Risk Assessment and Genetic Testing. *J Clin Gastroenterol* 2000; 31(2):114-120.

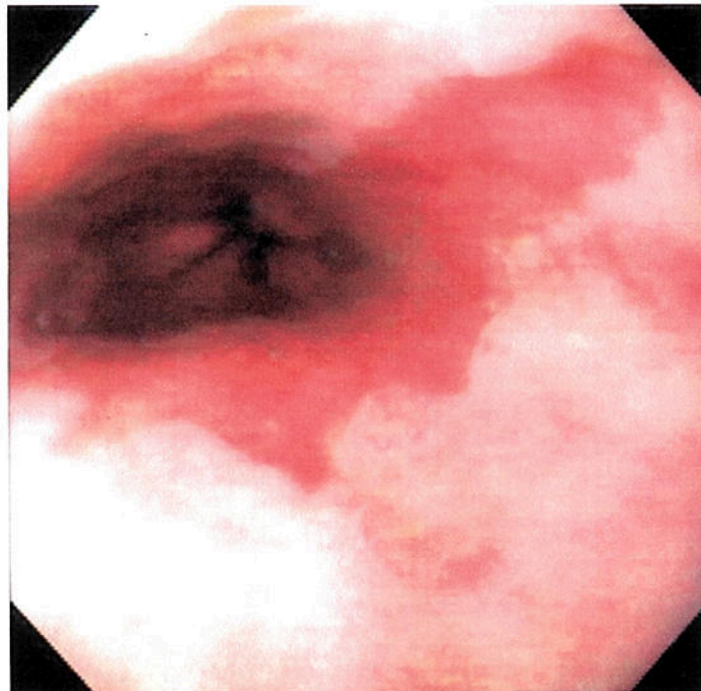


FIGURA 1 - ALTERAÇÕES ENDOSCÓPICAS SUGESTIVAS DE ESÓFAGO DE BARRETT.

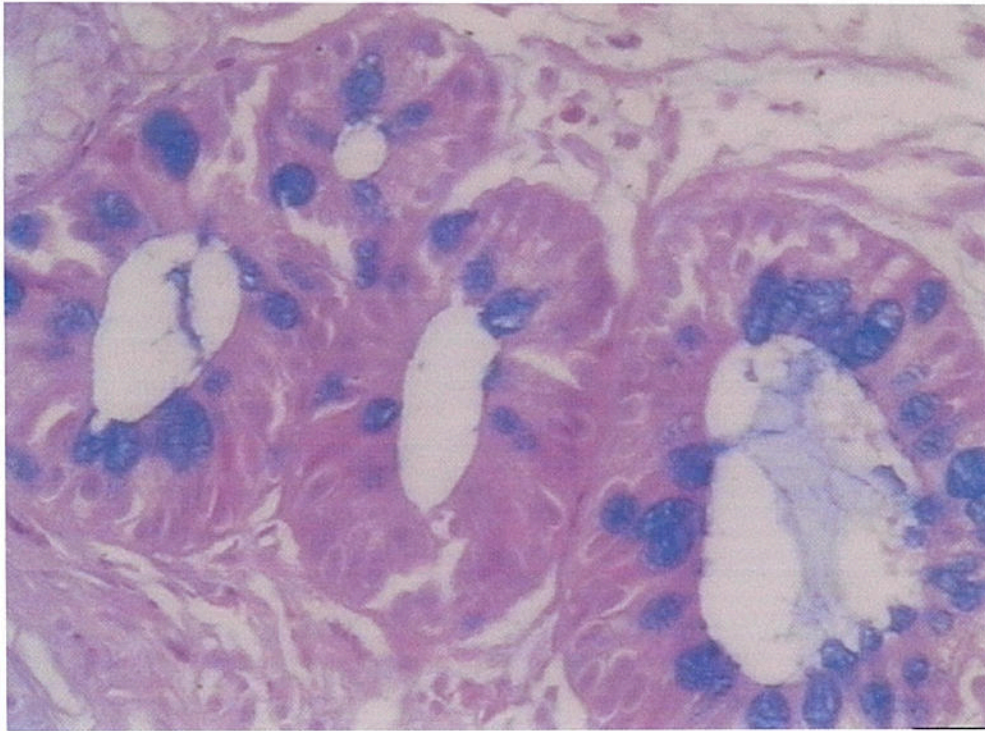


FIGURA 2 - ESÔFAGO DE BARRETT - ALCIAN-BLUE pH 2,5

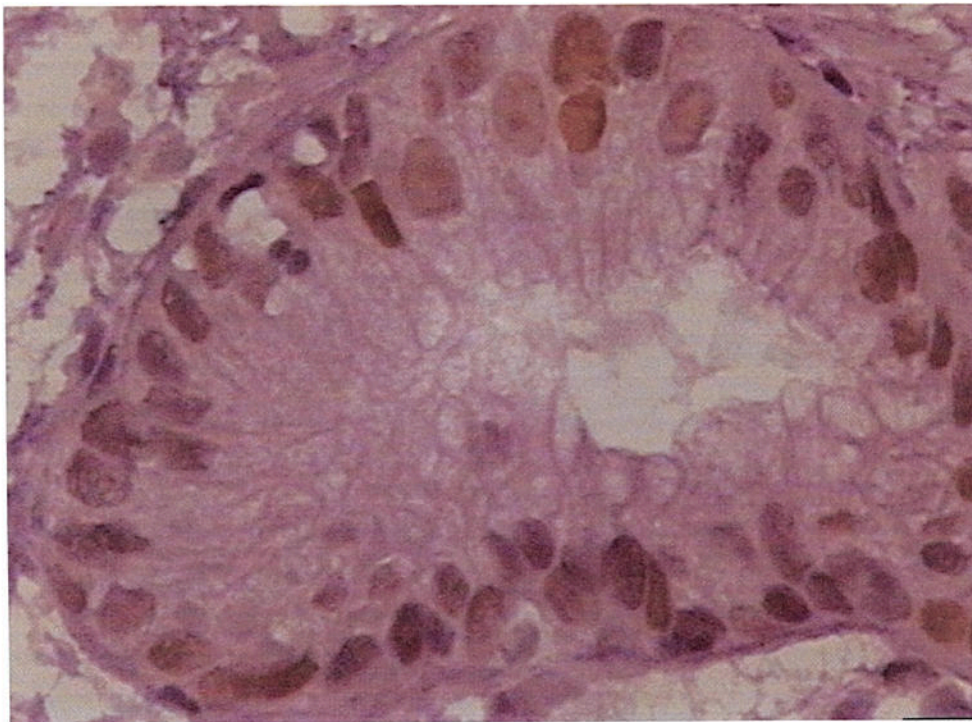
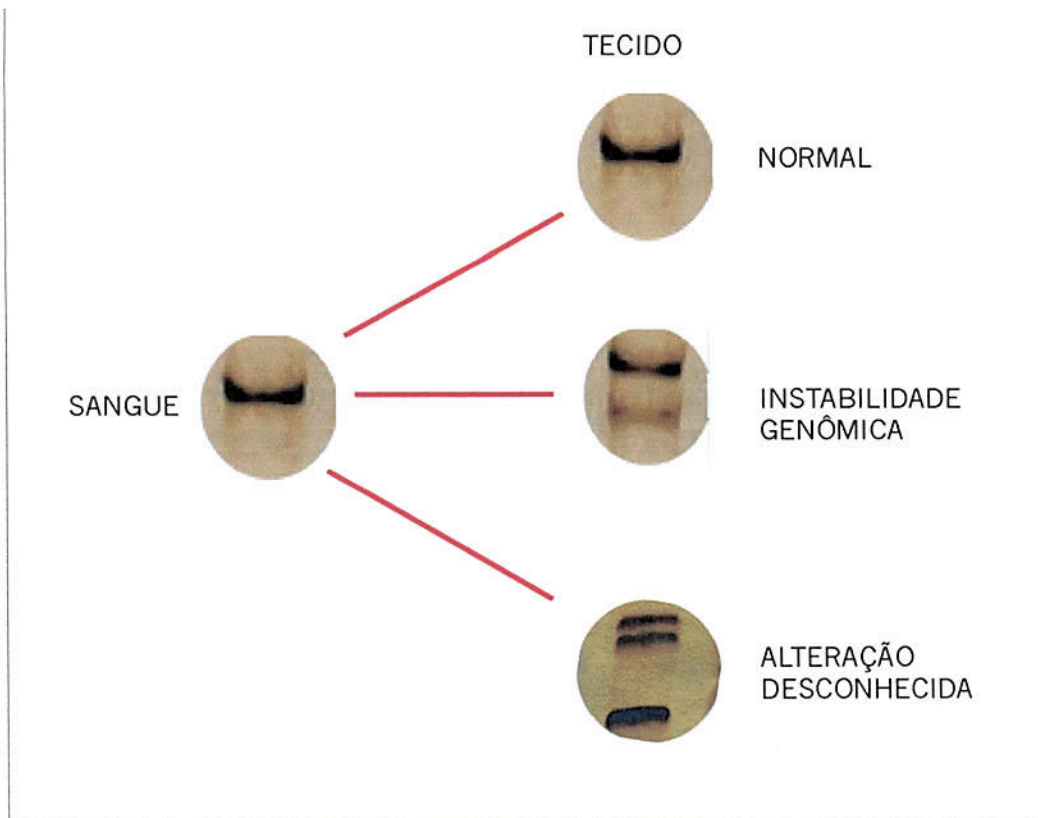
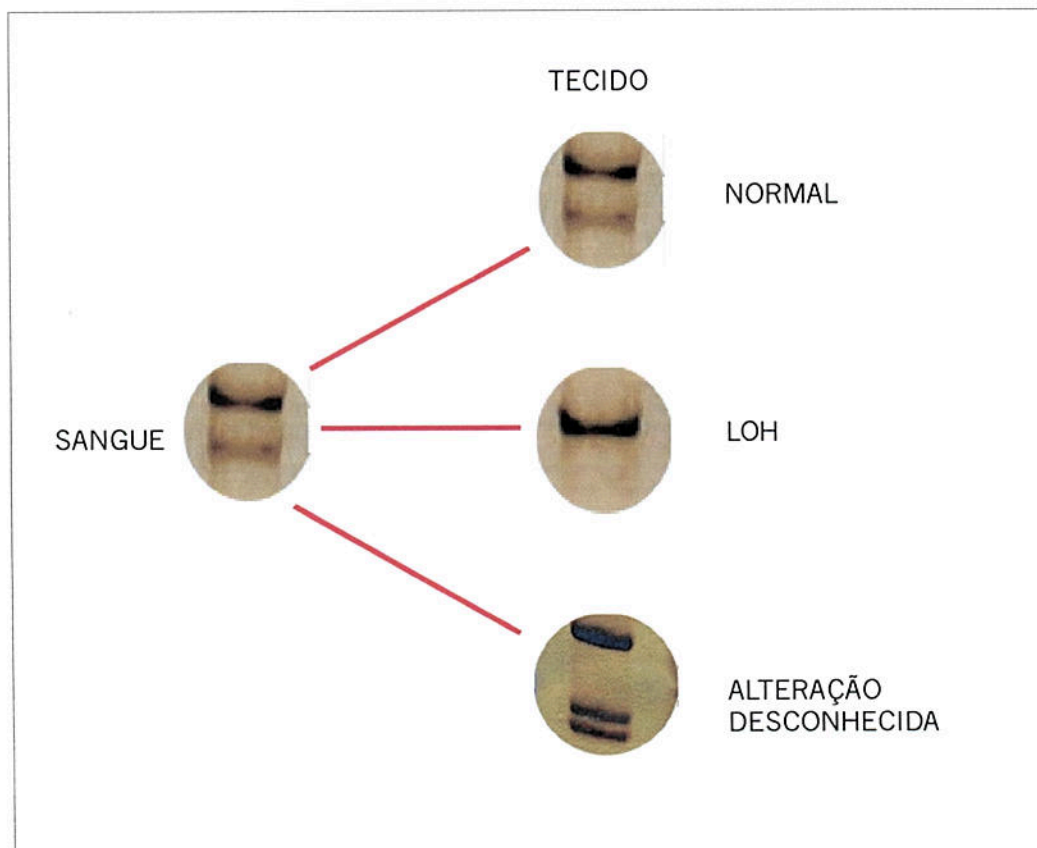


FIGURA 3 - ESÔFAGO DE BARRETT p53 POSITIVO





A - ALTERAÇÕES MOLECULARES NO GEL DE SSCP - HOMOZIGOTO



B- ALTERAÇÕES MOLECULARES NO GEL DE SSCP - HETEROZIGOTO

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ALTERAÇÕES MOLECULARES DO GENE p53

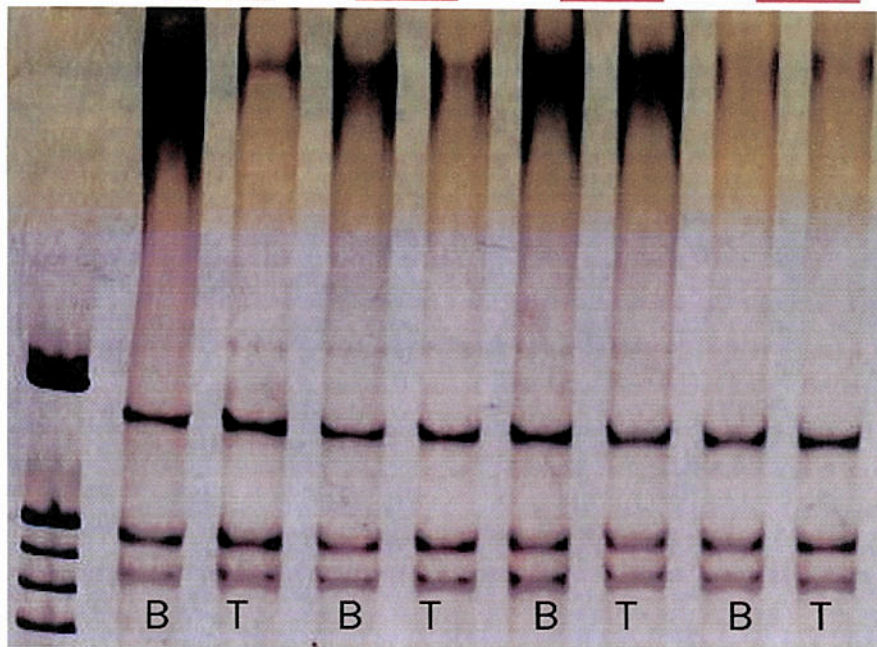


FIGURA 5 - PADRÃO NORMAL ÉXON 5

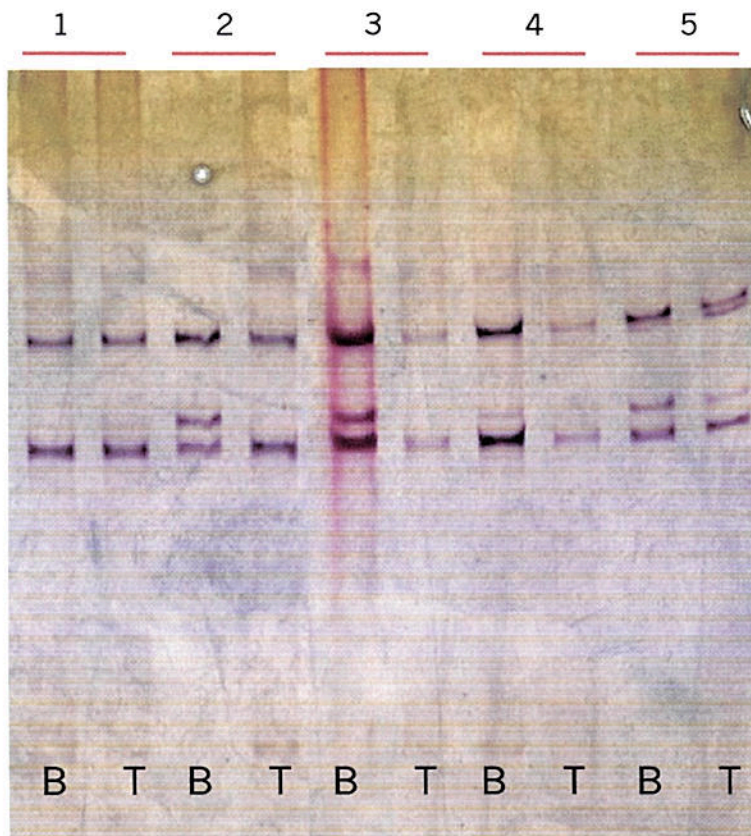


FIGURA 6 - ALTERAÇÕES MOLECULARES NO ÉXON 5

CASO 1 - INSTABILIDADE GENÔMICA (IG)

CASO 2 , 3 , 4 - PERDA DE HETEROZIGOSIDADE (LOH)

CASO 5 - ALTERAÇÃO DESCONHECIDA (PROVÁVEL MUTAÇÃO)

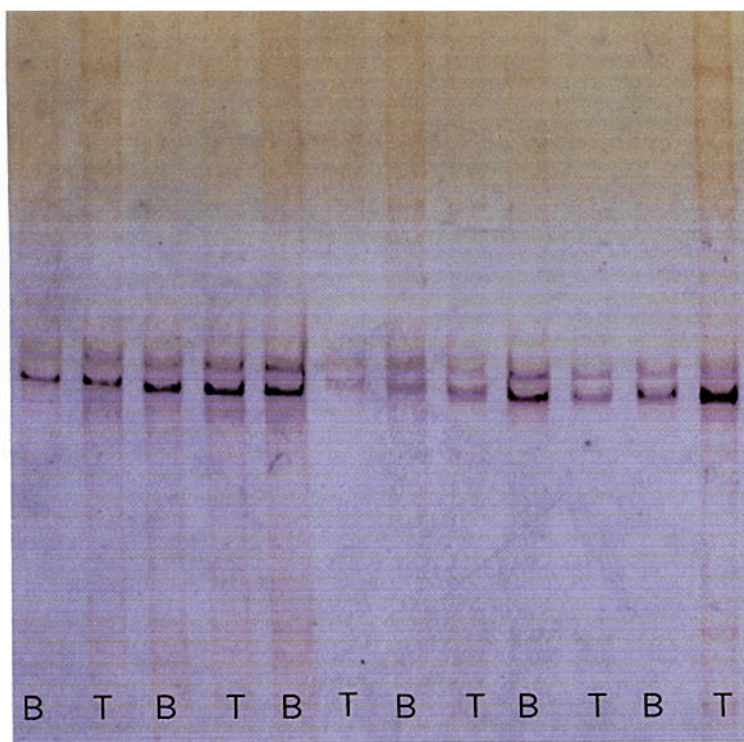


FIGURA 7 - PADRÃO NORMAL ÉXON 7



FIGURA 8 - ALTERAÇÕES MOLECULARES ÉXON 7

CASO 1 - PERDA DE HETEROZIGOSIDADE (LOH)

CASO 2 , 3 , 4 - INSTABILIDADE GENÔMICA (IG)



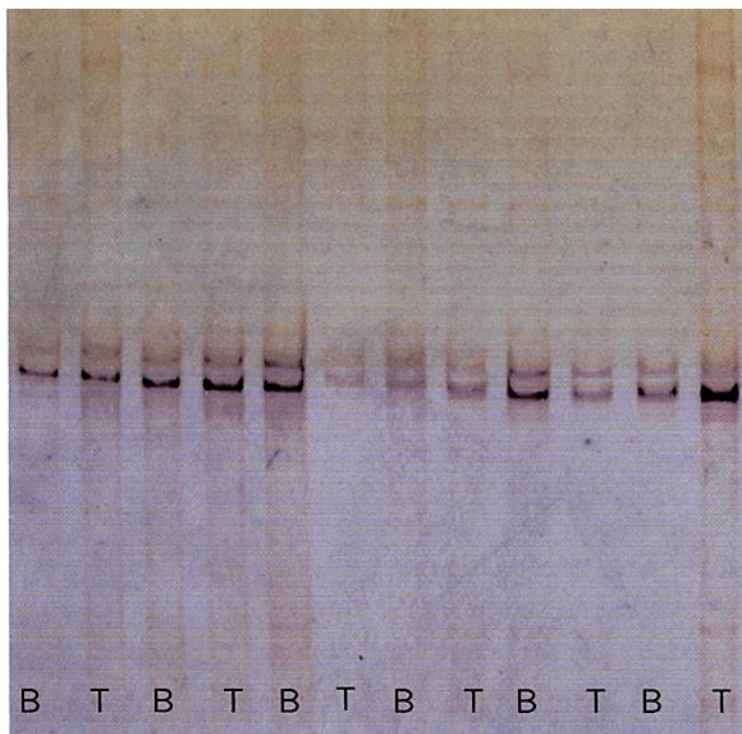


FIGURA 7 - PADRÃO NORMAL ÉXON 7



FIGURA 8 - ALTERAÇÕES MOLECULARES ÉXON 7

CASO 1 - PERDA DE HETEROZIGOSIDADE (LOH)

CASO 2 , 3 , 4 - INSTABILIDADE GENÔMICA (IG)

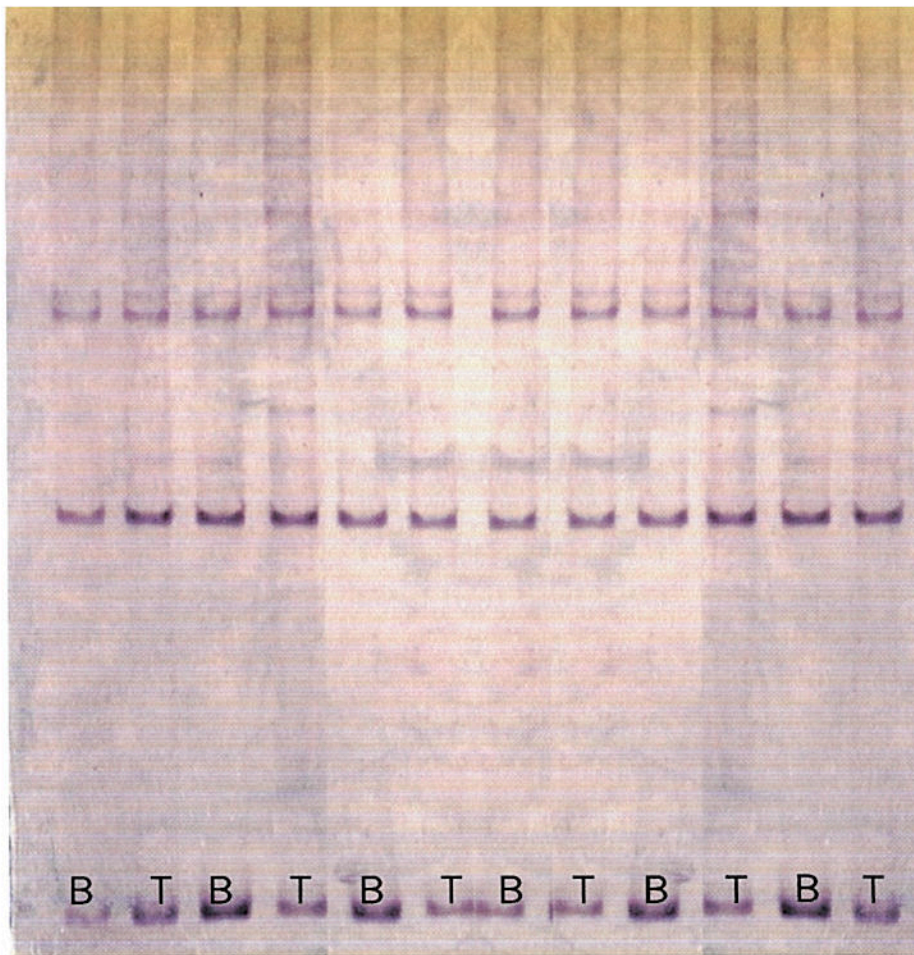


FIGURA 9 - PADRÃO NORMAL ÉXON 6

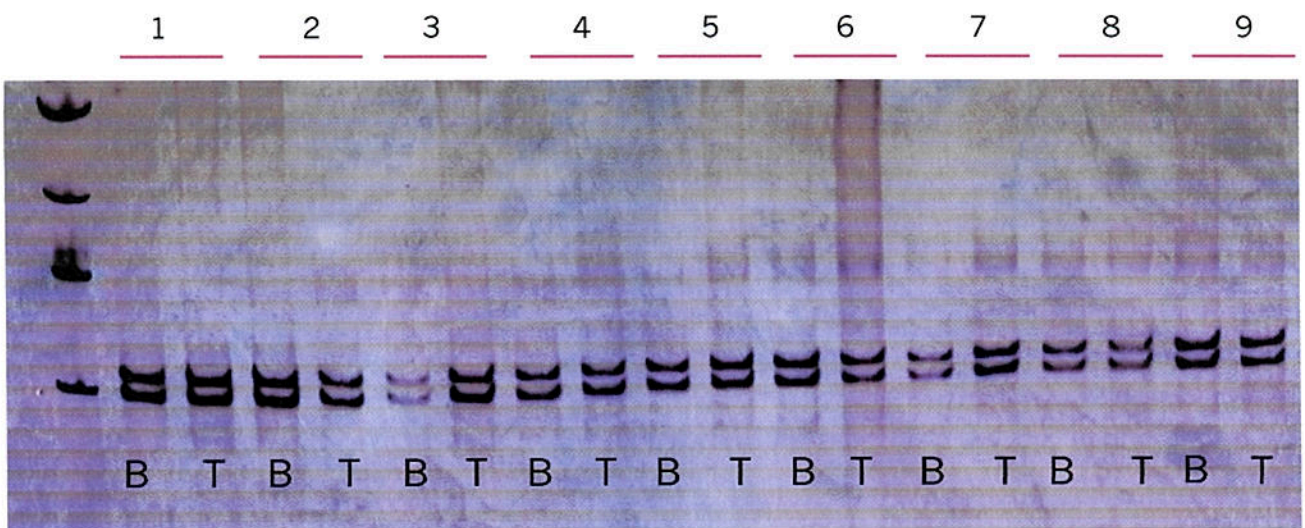


FIGURA 10 - PADRÃO NORMAL ÉXON 8

# ANEXOS



Anexo 1. TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA EM PACIENTES.

Gostaríamos de explicar para você alguns aspectos do trabalho de pesquisa que estamos fazendo e então perguntar-lhe se nos ajudará com a sua participação.

Um dos objetivos deste trabalho é detectar alterações no esôfago que apresentam riscos para desenvolver câncer. Através da Endoscopia Digestiva será colhido um pequeno fragmento do revestimento do esôfago, chamado de biópsia, que é indolor e tem a finalidade de detectar a presença de alterações de risco como por exemplo o Esôfago de Barrett.

Os procedimentos realizados na pesquisa constam de uma entrevista que colherá dados referentes as suas condições de saúde. Será borrifado um anestésico local na garganta, dando a sensação que a saliva está mais espessa e a garganta “adormecida”. Este efeito dura cerca de 1 hora após o exame. Após será ministrada pela veia uma medicação sedativa (chamada Dormonid – midazolam), que fará com que o Sr (a) durma durante o período do exame. Será realizada a endoscopia digestiva com biópsias da mucosa esofágica, sendo colhidos 6 a 8 (seis a oito) fragmentos da mucosa do esôfago. A colheita destes fragmentos faz parte da rotina de investigação das doenças do esôfago e levará cerca 3 a 5 minutos no procedimento. A endoscopia digestiva será sempre realizada quando o paciente apresentar condições clínicas adequadas, em sala com profissionais (médico e de enfermagem) treinados. Em relação ao risco de complicações da biópsia neste estudo é semelhante ao observado em uma endoscopia de rotina, onde há colheita de material, podendo haver um pequeno sangramento no local, ainda que remoto. Por outro lado, as biópsias citadas complementam a endoscopia e podem trazer informações muito importantes ao diagnóstico e ao tratamento. Também será colhido 10 ml de sangue para a identificação de possíveis alterações que podem influir no diagnóstico da doença pesquisada.

O material coletado será utilizado única e exclusivamente para fins do projeto de pesquisa, sendo garantido o sigilo das informações obtidas. O resultado será dado ao paciente ou ao familiar responsável (no caso de menores de idade).

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento que estarei envolvido, dos desconfortos ou riscos previstos, tanto como dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que novas informações obtidas durante o estudo, me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a estas informações. O profissional \_\_\_\_\_, certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

\_\_\_\_\_  
(PACIENTE)

\_\_\_\_\_  
(INVESTIGADOR).

**ANEXO 2. FICHA DE COLETA DE DADOS**

NOME: \_\_\_\_\_

REGISTRO: \_\_\_\_\_

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_ FONE: \_\_\_\_\_

IDADE : \_\_\_\_\_

SEXO:

- (1) MASCULINO
- (2) FEMININO

ASPECTO ENDOSCÓPICO:

- (1) ILHOTAS
- (2) PROJEÇÕES DIGITIFORMES
- (3) ILHOTAS + PROJEÇÕES DIGITIFORMES
- (4) IRREGULARIDADE DA LINHA Z
- (5) EROSÕES OU ULCERAÇÕES
- (6) OUTROS ACHADOS – (DESCREVER): \_\_\_\_\_

DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO:

- (1) ESOFAGITE CRÔNICA
- (2) ESÓFAGO DE BARRETT
- (3) METAPLASIA INTESTINAL DA CÁRDIA
- (4) ADENOCARCINOMA DE ESÓFAGO
- (5) OUTRO (DESCREVER): \_\_\_\_\_

ANÁLISE MOLECULAR:

I-SANGUE

- (1) BANDA 1 A (SIMPLES)
- (2) BANDA 1 B (SIMPLES)
- (3) BANDA 1 C (DUPLA)
- (4) BANDA 2 A (SIMPLES)
- (5) BANDA 2 B (SIMPLES)
- (6) BANDA 2 C (DUPLA)
- (7) BANDAS MÚLTIPLAS

II- TECIDO

- (1) BANDA 1 A (SIMPLES)
- (2) BANDA 1 B (SIMPLES)
- (3) BANDA 1 C (DUPLA)
- (4) BANDA 2 A (SIMPLES)
- (5) BANDA 2 B (SIMPLES)
- (6) BANDA 2 C (DUPLA)
- (7) BANDAS MÚLTIPLAS