

ÍNDICE

RESUMO/ABSTRACT.....	3
AGRADECIMENTOS.....	4
INTRODUÇÃO.....	5
METODOLOGIA.....	8
OS FATORES DE RISCO.....	8
OS FATORES INSTRÍNSECOS.....	8
A OBESIDADE.....	9
O ÁLCOOL.....	9
O TABACO.....	10
A INFEÇÃO POR <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	10
A DIETA.....	11
O <i>STATUS</i> SOCIOECONÓMICO.....	12
A TRANSFORMAÇÃO METAPLÁSICA.....	12
A ORIGEM DA METAPLASIA.....	13
AS VIAS MOLECULARES IMPLICADAS.....	15
O PAPEL DOS SAIS BILIARES.....	22
A TRANSFORMAÇÃO NEOPLÁSICA.....	24
O PAPEL DOS SAIS BILIARES E DA INFLAMAÇÃO.....	27

AS MUTAÇÕES GENÉTICAS E OUTROS MARCADORES.....	37
AS MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS.....	46
OS MICRORNAS.....	51
CONCLUSÃO.....	55
LISTA DE ACRÓNIMOS.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

RESUMO

O Esófago de Barrett (EB) consiste numa metaplasia, na qual o epitélio escamoso estratificado do esófago é substituído por epitélio colunar simples. Este constitui o principal fator de risco para o desenvolvimento de adenocarcinoma do esófago (ACE), uma neoplasia que tem vindo a crescer em incidência, em particular, nos países ocidentais. Este aumento tem originado uma onda de preocupação, por não se conseguir prever quais os doentes com EB que progredirão para ACE. A vigilância dos doentes com EB tem um custo-benefício desfavorável e baixa sensibilidade, e embora sejam realizadas endoscopias e biopsias de controlo a todos, a capacidade de se prever a evolução para ACE continua a ser deficitária e apenas uma pequena parte destes doentes evoluirá para neoplasia. Desta forma, muitos têm sido os investigadores que desenvolvem trabalho no sentido de validar biomarcadores que possam prever quais os doentes com maior risco de ACE, por forma a que estes sejam acompanhados com maior proximidade. A sua aplicação na prática clínica terá interesse se os mesmos permitirem a determinação de grupos de risco, se forem de fácil utilização, baixo custo e não invasivos. Este trabalho de revisão tem por objetivo apresentar uma versão atualizada e crítica acerca dos fatores de risco, mecanismos fisiopatológicos e marcadores moleculares subjacentes à transição EB-ACE.

Palavras-chave: Esófago de Barrett, Neoplasias do Esófago, Biomarcadores, Fatores de Risco, Metaplasia.

ABSTRACT

Barrett's esophagus (EB) is defined as a metaplasia, where esophageal squamous stratified epithelium is replaced by a simple columnar epithelium. It is the main risk factor for the development of esophageal adenocarcinoma (ACE), which incidence has

been rising, specially, in the western countries. This rise has led to a great concern because it cannot be predicted which EB patients will progress to ACE. The surveillance of EB patients has low cost-effectiveness and sensibility, since endoscopies and biopsies are performed on all of them, but only a small group will develop ACE. Hence, many investigators have studied biomarkers that would be able to predict whose patients are at higher risk of ACE, so only those would be followed closely. Their clinical use would be of great interest, not only because it could determine risk groups, but also because they are easy to use, low cost and non-invasive. Therefore, this review will present a critical and updated version about risk factors, physiopathological mechanisms and molecular markers involved in EB-ACE conversion.

Key-words: Barrett Esophagus, Esophageal Neoplasms, Biological Markers, Risk Factors, Metaplasia.

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de agradecer a todos aqueles que me possibilitaram a realização deste trabalho.

Um obrigado à Professora Anabela Mota Pinto e ao Dr. Rui Gradiz por terem aceite guiar-me nesta jornada e, sobretudo, pela sua dedicação e disponibilidade incansáveis.

Um obrigado ao Secretariado de Patologia Geral, em especial à D. Leonor Salguinho, pelo apoio logístico prestado.

E, por fim, um obrigado muito especial aos meus Pais, Mana e João Nuno, aqueles que estão sempre e, para sempre, presentes. A eles, dedico este trabalho.

INTRODUÇÃO

O Esófago de Barrett (EB) compreende uma substituição do epitélio pavimentoso simples do esófago por epitélio colunar especializado. Trata-se, portanto, de uma metaplasia (1).

Podem diferenciar-se três subtipos de EB consoante as particularidades do epitélio alterado. O subtipo intestinal é, sem dúvida, o mais frequente e conhecido, e compreende células colunares e células caliciformes que formam criptas e vilosidades, tal como ocorre na parede intestinal. Os outros subtipos são o fundico e o cárdico ou juncional. O fundico apresenta células do tipo parietal e zimogénico; o cárdico ou juncional tem essencialmente células mucosas (2, 3).

Apenas o tipo intestinal tem transformação maligna. Contudo, alguns estudos vêm demonstrando que existem tumores que não exibem o fenótipo intestinal e têm alterações que podem predispor ao processo carcinogénico. Aliás, as *Guidelines* para o Diagnóstico e Tratamento do EB, da *British Society of Gastroenterology*, referem não ser necessário a existência de células caliciformes para ser diagnosticado o EB (4, 5). O diagnóstico baseia-se então na existência de epitélio que sofreu metaplasia, e que seja visível endoscopicamente acima da junção gastro-esofágica. A metaplasia necessita de ser confirmada por patologistas através de biópsia (5).

O principal fator de risco de desenvolvimento do EB é a doença do refluxo gastro-esofágico (DRGE), não só por haver um contato prolongado da mucosa com o ácido do conteúdo gástrico, mas também por este, nas situações de refluxo biliar duodeno-gástrico, ter uma concentração elevada de sais biliares (2, 6). A exposição continuada do epitélio esofágico a agentes agressores desencadeia uma reação inflamatória que culmina numa esofagite. A essa esofagite seguem-se múltiplas

alterações que levarão à formação do EB, já que a metaplasia intestinal é uma resposta adaptativa à inflamação crônica e as células intestinais têm funções de proteção da mucosa (6, 7).

O que não se sabe ao certo é o porquê de apenas alguns indivíduos desenvolverem metaplasia (6). Os mecanismos fisiopatológicos que se seguem poderão culminar na formação de uma neoplasia, o Adenocarcinoma do Esôfago (ACE), e também aqui permanece a dúvida do porquê de apenas uma pequena percentagem de indivíduos com EB o desenvolver (8).

A verdadeira prevalência do EB na população mundial é difícil de estimar, já que uma grande parte dos indivíduos são assintomáticos ou não estão diagnosticados (2). O EB é o fator de risco *major* do ACE, sendo que os doentes com EB têm um risco 30 a 125 vezes maior ao da população em geral de desenvolvê-lo e uma taxa de progressão de cerca de 0,2 a 0,5% ao ano (1, 8). Embora seja uma neoplasia considerada rara, a sua incidência tem aumentado muito nas últimas décadas (9, 10), sobretudo nos países ocidentais. Por ser uma neoplasia com muito mau prognóstico, com uma sobrevivência aos 5 anos de cerca de 20% (11), é pertinente conhecer-se o seu processo de transformação e saber como o prevenir ou parar a sua evolução.

Para além da DRGE, já referida, existem outros fatores que aumentam o risco de desenvolver EB e ACE, nomeadamente: género masculino, raça caucasiana, idade, obesidade (em particular a obesidade abdominal) (12), hábito tabágico (11, 13-15) e dieta pobre em frutas e vegetais. Embora se saiba que estes fatores aumentam o risco de desenvolver EB e ACE, não se conhecem os mecanismos subjacentes a esta relação. Outro importante fator a referir é a infeção por *Helicobacter pylori*. Este parece ter uma ação contrária aos outros fatores referidos, já que muitos estudos revelaram que reduz o

risco de se desenvolver BE e ACE. Este fenómeno pode ser explicado pela produção de ácido gástrico ser reduzida aquando desta infeção, embora outros mecanismos também possam estar implicados (4).

A progressão neoplásica de EB até ACE faz-se de acordo com um processo fisiopatológico que ocorre em estadios diferenciados. Inicia-se com o aparecimento de metaplasia, seguindo-se displasia de baixo grau (DBG), displasia de alto grau (DAG) e, por fim, adenocarcinoma (6). Neste processo participam múltiplos mecanismos fisiopatológicos, moleculares e genéticos que devem ser discutidos e explorados, de forma a poderem ser aplicadas na prática clínica. Como referido acima, não se sabe exatamente quais os indivíduos com EB que progridem para neoplasia, pelo que a prática clínica passa pela prevenção através de rastreios endoscópicos regulares, com eventuais biopsias, a todos os que apresentam EB. Compreensivelmente, esta prática tem muitas limitações, pois apresenta uma relação custo-benefício baixa, não permite prever quais os doentes que progredirão para ACE, e a subjetividade dos patologistas complica a interpretação das biopsias (1, 16).

Assim, a pesquisa e utilização de marcadores moleculares sensíveis e específicos, que tenham aplicação clínica comprovada, seria de todo o interesse, já que estes não sendo invasivos e baratos, identificariam os indivíduos em maior risco de desenvolvimento do ACE.

Neste trabalho de revisão, propomo-nos apresentar uma revisão atualizada e crítica do que se tem publicado sobre os fatores de risco, mecanismos fisiopatológicos e marcadores moleculares subjacentes à transição do epitélio escamoso normal do esófago para EB e deste para o ACE.

METODOLOGIA

Este trabalho teve por base uma pesquisa bibliográfica realizada no dia 8 de Julho de 2014, tendo sido seguido o método “Pull” e consultadas as seguintes bases de dados: DynaMed, PubMed e Index Online.

Na DynaMed as palavras de pesquisa utilizadas foram “barrett’s esophagus”, sendo depois escolhidas as etiquetas “causes and risk factors” e “complications and associated conditions”. Desta pesquisa resultaram doze artigos relevantes para o tema.

Na PubMed foram utilizados termos MESH, e a equação de pesquisa utilizada foi “barrett esophagus AND esophageal neoplasms”. A esta equação foram aplicados filtros: restringiu-se a pesquisa aos últimos 5 anos e às línguas inglesa e portuguesa. No total foram encontrados 794 artigos, os quais foram depois seleccionados rigorosamente pelo título, resultando em 264. Por fim, foram lidos os abstracts e 163 destes foram escolhidos.

A base de dados Index Online também foi consultada, mas não se seleccionaram quaisquer artigos.

OS FATORES DE RISCO

A maior prevalência de ACE em países ocidentais fez pensar na existência de fatores de risco, intrínsecos e extrínsecos, que predispuessem ao seu desenvolvimento.

- **OS FATORES INTRÍNSECOS**

Os fatores intrínsecos e não modificáveis que parecem ter influência são a raça, o género e a idade. Já foi demonstrado que homens caucasianos acima dos 50 anos têm

um maior risco de formar EB e/ou ACE se apresentarem refluxo gastro-esofágico (4, 17). Quanto à idade como fator de risco individual, os estudos nesta área ainda são limitados, pelo que não se pode, para já, afirmar o seu papel como fator de risco (10, 18).

- **A OBESIDADE**

A obesidade parece ter uma relação estreita com os doentes que desenvolvem ACE (7, 17, 19), pois participa na inflamação e noutros fenómenos que a favorecem. Os estudos mostram, efetivamente, que há um maior risco de desenvolver ACE em pessoas com obesidade e refluxo do que em pessoas com refluxo não obesas ou sem refluxo e com obesidade (7, 20). Os primeiros estudos que tentavam estabelecer esta relação falharam, pelo fato de ter sido usado nessa avaliação o índice de massa corporal (IMC). Em estudos posteriores, verificou-se que a relação era muitíssimo mais estreita se usado o *ratio* cintura/anca, pois este traduz de forma mais correta a presença de obesidade abdominal (4, 7, 10, 18, 21). É esta que tem particular interesse nos fatores de risco de ACE. Os mecanismos que estabelecem esta relação são explanados no capítulo da transformação neoplásica. O fato de ser a obesidade central que implica maior risco de ACE, pode ajudar a explicar a maior prevalência deste nos homens, já que este tipo de obesidade é muito mais frequente neste género (7, 10, 18). Todavia, um estudo de coorte realizado por Steevens et al. verificou que a obesidade era um fator de risco para EB nas mulheres, mas não nos homens (13). Mas este estudo utilizou o IMC, pelo que não incorporou a obesidade visceral na sua análise.

- **O ÁLCOOL**

O consumo de álcool não parece aumentar o risco de ACE (7, 13, 15, 19, 22), ao contrário do que ocorre com o carcinoma espinho-celular do esófago. Embora alguns

estudos tenham mostrado relação, esses foram poucos e o seu resultado foi, maioritariamente, pouco significativo (18).

- **O TABACO**

O consumo de tabaco constitui mais um fator de risco para a transformação neoplásica do EB (7, 13, 17), embora não tão preponderante como para o carcinoma espinho-celular do esófago (10). Parece aumentar o risco em duas a quatro vezes, relativamente às pessoas que nunca fumaram (19, 22). Edelstein et al. concluiu que não havia, contudo, relação com a quantidade ou duração do tabagismo, e que a cessação não reduzia o risco (20, 22). Hardikar *et al.* mostrou o oposto. No seu grupo de estudo, havia um risco progressivamente maior quanto mais elevado o número de cigarros e a duração do tabagismo, mas também não encontrou decréscimo do risco com a cessação tabágica (15). Há ainda estudos conflituosos acerca do papel do tabaco na fisiopatologia do ACE, pois não há concordância acerca do momento em que ele se torna crucial no seu desenvolvimento. O mais aceite é que tenha uma ação nas fases iniciais, ainda na forma de EB (23).

- **A INFEÇÃO POR *HELICOBACTER PYLORI***

A infecção por *Helicobacter pylori* parece reduzir o risco de ACE (18, 19, 21). Embora os mecanismos desta relação ainda não estejam bem definidos, suspeita-se que a redução do ácido gástrico, que a gastrite atrófica resultante da infecção provoca, tenha um papel central (7). Esta bactéria destrói as células parietais e promove um acréscimo na produção de amónia (24). Os dois mecanismos contribuem para a redução do meio ácido do estômago, logo, para a redução do ácido que reflui para o esófago (21). Pelo contrário, Liu *et al.* não foi capaz de demonstrar este efeito protetor. Ele demonstrou que as lesões esofágicas aumentavam de gravidade nos ratos que tinham a infecção por *Helicobacter pylori* (25). O autor propôs uma explicação para o seu resultado: como a

taxa de infecção do próprio esófago nos ratos era elevada, Liu *et al.* sugeriu que a ação da bactéria no esófago fosse tão deletéria como no estômago, mas uma vez apenas existente no estômago, já tinha efeito protetor para o esófago.

- **A DIETA**

Uma dieta pobre em vegetais e fruta pode aumentar o risco de ACE (7, 17), mas é necessária a realização de estudos com grupos controlo para validar esta ideia (10). Um estudo sueco mostrou que as pessoas que ingeriam mais frutas e vegetais eram aquelas que tinham menor probabilidade de desenvolver ACE (18). Jiao *et al.* confirmou que a toma de vegetais, sobretudo os de folha verde escura, era benéfica e reduzia o risco de EB (26).

Ainda em relação à dieta, alguns micronutrientes podem constituir fatores de risco ou de proteção contra o ACE. A toma de cápsulas multivitamínicas pode reduzir o risco do seu aparecimento, por reduzir o risco de desenvolvimento de tetraploidia. O consumo de vitamina A, vitamina C, vitamina E, zinco, selénio, riboflavina, β -caroteno, ácido fólico e fibras, pode igualmente reduzir o seu risco (18). A vitamina C, a vitamina E, o β -caroteno e o selénio são conhecidos anti-oxidantes. Num estudo realizado por Ibiebele *et al.* concluiu-se que a toma destes proporcionava um menor risco de desenvolver ACE ou EB com displasia (27). Isto pode ser explicado porque estes micronutrientes vão neutralizar a ação oxidativa que se desenvolve no seio do EB. Sharp *et al.* mostrou que o consumo de ácido fólico reduzia o aparecimento de lesões esofágicas. Este fenómeno pode ser explicado pelo fato da falta do folato provocar o aparecimento de lesões no ADN (14). O mesmo estudo não evidenciou qualquer relação com a ingestão de riboflavina (14). Jiao *et al.* referiu que existia um efeito benéfico (redução do risco de EB) com o consumo de fibra (26). Contudo, a literatura existente acerca desta matéria é escassa e as conclusões muito díspares.

No mundo atual tem crescido o consumo de carne, sobretudo nos países desenvolvidos. Cada vez mais as carnes são processadas e contêm compostos nitrosados. Um estudo de coorte levado a cabo por Keszei *et al.* estudou a relação entre os compostos nitrosados e o ferro (proveniente do heme da mioglobina da carne) e o risco de ser desenvolvido EB. Não foi encontrada nenhuma relação (28). Também O'Doherty *et al.* verificou que não havia relação entre o risco de EB nem de ACE e o consumo de carne vermelha (29). Este autor referiu existir um risco aumentado de ACE nos doentes que consumiam maior quantidade de gorduras, sobretudo monossaturadas (29). Acerca do ferro, O'Doherty *et al.* noutro estudo, concluiu que o ferro tinha um efeito protetor nos doentes com EB, com exceção do ferro proveniente do heme, o que sugere que possa haver um risco aumentado de ACE pelo maior consumo de carne (30).

- **O STATUS SOCIOECONÓMICO**

Como parece haver uma relação direta entre cancro e uma dieta pobre e desequilibrada, ponderou-se relacionar o nível sócio-económico dos doentes com o risco de desenvolver um carcinoma a partir do EB. No entanto, não se verificou tal associação (18).

A TRANSFORMAÇÃO METAPLÁSICA

A origem do EB mantém-se ainda controversa, pois não há estudos conclusivos acerca da célula e processo que lhe dão origem (4). O conhecimento destes poderá ser imprescindível à descoberta do processo de transformação neoplásica que ocorre até ao ACE.

- **A ORIGEM DA METAPLASIA**

Existem duas possíveis teorias para o desenvolvimento do EB: a transdiferenciação e a diferenciação de células estaminais (31). Na primeira ocorre uma transformação da célula epitelial pavimentosa numa célula colunar; na segunda, células existentes no esôfago, com capacidade para se diferenciarem em qualquer outro tipo, isto é, pluripotentes, transformam-se na célula colunar (4, 8).

No processo de transdiferenciação há a transformação de um tipo de células noutra que estava presente durante a embriogénese do organismo. Muitos estudos já demonstraram, efetivamente, que vias moleculares presentes na origem do EB são vias que estão ativas na embriogénese intestinal (9). São exemplos destas a via da *bone morphogenic protein 4* (BMP4), *Sonic Hedgehog* (SHH), *Homeotic genes*, *Wingless-related integration site pathway* (Wnt), *Notch pathway* (Notch)(32, 33). No entanto, uma das grandes limitações desta hipótese é não conseguir explicar os processos de renovação e manutenção celulares.

Alguns argumentos importantes a favor da teoria das células estaminais são o fato de estas estarem implicadas na renovação de células em tecidos inflamados e lesados (9), e também o conhecimento de que alguns cancros se originam através da sua desregulação (*cancer stem cell hypothesis*) (34, 35). O recetor *leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5* (LgR5) é conhecido por ser um marcador de células estaminais, inclusive nas células intestinais (34). Alguns estudos analisaram a sua expressão no EB, bem como no ACE, por forma a tentar compreender o papel das células estaminais nesta sequência. von Rahden *et al.* demonstrou que havia uma expressão aumentada do recetor em amostras de doentes com EB, assim como um decréscimo à medida que havia a transformação em ACE. Estes resultados colocam o

LgR5 como um possível marcador dos doentes com risco de progressão neoplásica, pela sua expressão diferencial entre as duas entidades (34). Não se conhece, contudo, qual a expressão deste marcador no epitélio normal do esófago. Contrariamente, Becker *et al.* revelou um aumento da expressão de LgR5 à medida que ocorria a progressão de EB para ACE, e que este era um marcador de mau prognóstico por estar associado a menor sobrevida (35). Um outro marcador de células estaminais intestinais é o Musashi-1, uma proteína que se expressa na base das criptas das células colunares do intestino delgado, sendo marcador das suas células estaminais e que pode estar regulado positivamente na formação da metaplasia, podendo por isso e tornar-se num possível biomarcador (36, 37).

Na hipótese das células estaminais são colocadas quatro possíveis origens para a célula-mãe: células estaminais da membrana basal do epitélio pavimentoso simples do esófago, células estaminais da medula óssea, células estaminais da junção gastro-esofágica ou células estaminais das glândulas esofágicas submucosas (2, 9, 31, 33).

Já foi demonstrado que existem, na própria membrana basal do esófago, células pluripotentes que têm a capacidade de se diferenciar e colonizar o seu epitélio quando este é lesado (38). O gene *P63* apenas existe nos epitélios escamosos e também está presente nas células progenitoras do epitélio do esófago. No entanto, um estudo demonstrou que para que se formassem células colunares, ou seja, EB, as células do esófago deixavam de expressar o marcador *P63*, o que sugere que as células que originam o EB devem perder este marcador. Contudo, isto não confirma inequivocamente que são estas as células que originam o EB (9).

As células estaminais da medula óssea estão muitas vezes associadas à reparação de tecidos e à inflamação, e, portanto, podem estar implicadas na formação do EB, bem

como, na sua transformação neoplásica, como demonstrado num estudo realizado por Dvorak *et al.* Num outro estudo de Sarosi *et al.* em que se induziu esofagite e consequente metaplasia intestinal num rato fêmea, seguido da infusão de medula óssea de um dador macho, foram encontradas, por *fluorescence in-situ hybridization* (FISH), células com o cromossoma Y no esófago do rato fêmea. Apesar de não demonstrar que sejam estas as células de origem, aponta-nos com certeza para a existência destas células no processo de formação do EB (16).

Quante *et al.* demonstrou o envolvimento das células progenitoras da junção gastro-esofágica no desenvolvimento do EB. Nesta zona o epitélio escamoso altera-se para epitélio colunar simples. Sabendo que uma das moléculas que surge no esófago durante a promoção metaplásica é a interleucina 1 β (IL-1 β), foi induzida a sua expressão em células esofágicas e do pré-estômago (também constituído por epitélio escamoso estratificado) de rato. Ficou comprovado que a inflamação causada era suficiente para a transformação do epitélio através da migração de células estaminais (identificadas pela presença do LgR5) da junção gastro-esofágica. Também aqui (17) se corroborou o papel das células estaminais na posterior transformação neoplásica do EB, já que se sabe que os sais biliares são potentes indutores do processo inflamatório no esófago.

Coloca-se também a hipótese das células estaminais das glândulas submucosas do esófago serem a origem do EB. Estas, ao contactarem com o conteúdo do refluxo gastro-esofágico através dos ductos que as conectam à superfície, promovem a sua diferenciação em células colunares, de forma a colonizar e reepitelizar a zona lesada (6).

- **AS VIAS MOLECULARES IMPLICADAS**

Independentemente de qual a célula que lhe dá origem, para que se desenvolva o EB é necessária a ativação de vias moleculares de sinalização e de tradução de genes que

normalmente não se manifestam no epitélio normal do esófago. A **Figura 1** esquematiza as várias vias moleculares implicadas, as quais serão explicadas ao longo deste subcapítulo.

O fator de transcrição *Caudal-related homologue 2* (Cdx2) tem vindo a assumir grande importância na transição do epitélio escamoso do esófago para epitélio colunar intestinal (2). Este fator faz parte da família de genes *homeobox* implicados na diferenciação da endoderme no intestino primitivo (32, 39) e na manutenção do epitélio intestinal (40), sendo cruciais para o desenvolvimento de células da mucosa do intestino (41). O Cdx2 também está implicado na regulação de genes que orientam processos de proliferação, adesão e apoptose (40, 42). O fator Cdx1, da mesma família de genes, e com funções semelhantes às do Cdx2, é produzido e interage também na metaplasia intestinal do esófago (4).

Os sais biliares presentes no refluxo gastro-esofágico aumentam a expressão de Cdx2, crê-se que através de um processo de desmetilação da sua região promotora que, induz uma tradução aumentada de Cdx2 (32). Vaninetti *et al.* demonstrou que alguns sais biliares conseguem induzir a expressão de Cdx2, e que a concentração necessária para tal era reduzida se se adicionasse óxido nítrico (NO), mas que este sozinho não tinha esse poder. Isto é consistente com outros estudos que já mostraram que NO está aumentado no EB após a estimulação com sais biliares. Os mecanismos subjacentes não são conhecidos (40).

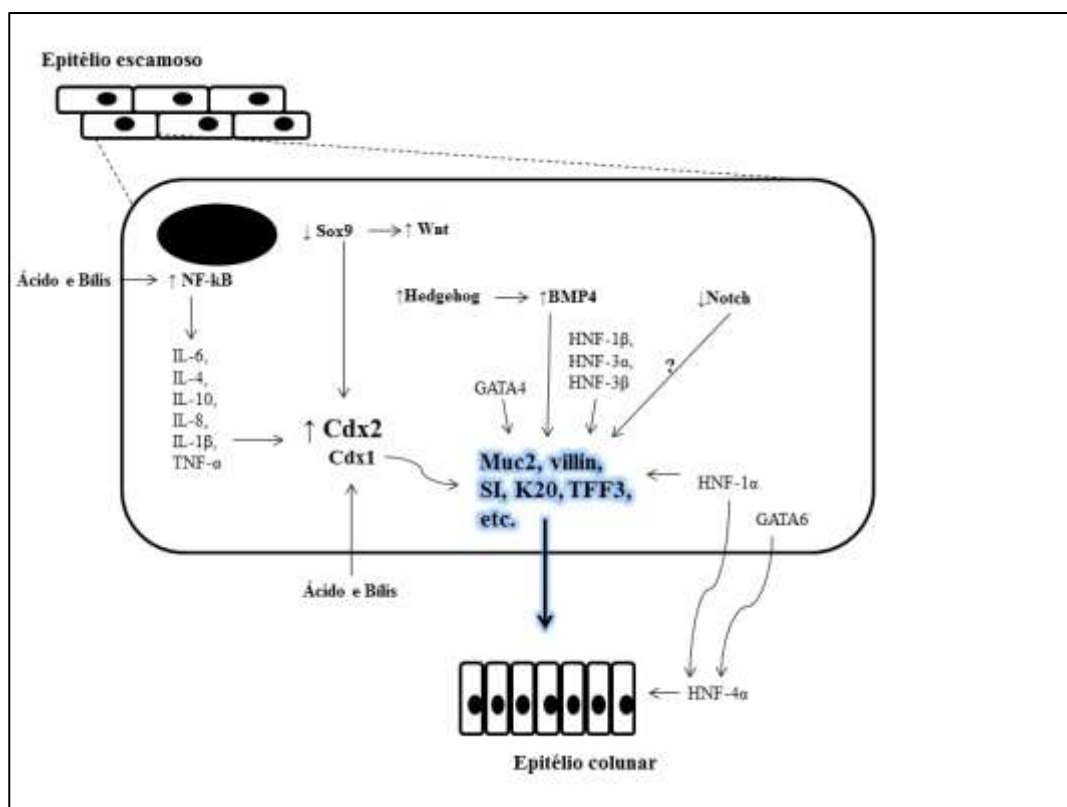


Figura 1 –Vias e moléculas implicadas no processo metaplásico do Esôfago de Barrett. BMP4 – *Bone morphogenic protein 4*; Cdx – *Caudal-related homologue*; GATA – *GATA binding protein*; HNF – *Hepatocyte nuclear factors*; K20 – *Cytokeratin 20*; IL – *Interleucina*; Muc2 – *Mucin 2*; Notch – *Notch pathway*; SI – *Sucrase isomaltase*; TFF3 – *Intestinal trefoil factor*; TNF- α – *Tumor necrosis factor α* ; Wnt – *Wingless-related integration site pathway*.

Estes fatores de transcrição intestinal (Cdx2 e Cdx1) não são expressos nas células do epitélio escamoso do esôfago (40), mas ocorrem no EB, tendo expressão crescente com o avanço da transformação (2). Aliás, o Cdx2 é expresso ainda antes da transformação metaplásica (9). No entanto, já foi demonstrado que o Cdx2 por si só, não é suficiente para induzir a referida transição, pelo que são necessárias interações com outros fatores de transcrição, vias, moléculas e genes para que se estabeleça uma

dinâmica conducente à expressão de genes de diferenciação intestinal (19). Destes, são exemplos *Mucin 2* (*Muc2*), *Villin*, *cytokeratin 20* (*K20*) (9, 32), *intestinal trefoil factor* (*TFF3*)(8) e *sucrase isomaltase* (*SI*) (9). Para que ocorra a ação do *Cdx2*, parece ter de existir previamente uma redução na metilação das regiões promotoras destes genes (8).

Um exemplo da necessidade de interação com outros fatores foi dado pelo estudo de Benoit *et al.*, no qual se verificou existir cooperação entre o *Cdx2* e os fatores de transcrição *GATA binding protein 4* (*GATA4*) e *hepatocyte nuclear factor 1 α* (*HNF-1 α*). A sua interação resultou na expressão dos seguintes genes: *SI*, *lactase-phlorizin hydrolase*, *liver fatty acid binding protein*, *adenosine deaminase* e *claudin-2*, tendo todos eles demonstrado estarem relacionados com a diferenciação de enterócitos e células caliciformes, o que sugere o seu envolvimento na fisiopatologia do EB (2, 43).

O *HNF-1 α* faz parte de uma família de fatores de transcrição chamados *hepatocyte nuclear factors* (*HNF*), que modulam vários genes e vias no pâncreas, fígado e intestino. Muitos dos *HNFs* (*HNF-1 α* , *HNF-1 β* , *HNF-3 α* e *HNF-3 β*) estão indiretamente implicados no EB ao regularem a diferenciação enterocítica das células através dos genes referidos previamente; o *HNF-4 α* , por exemplo, é fundamental na manutenção do epitélio intestinal e é, por sua vez, regulado pelo *HNF-1 α* e pelo *GATA binding protein 6* (*GATA6*) (8). Green *et al.* demonstrou que o *HNF-4 α* estava aumentado após a exposição de células esofágicas a ácido e sais biliares, componentes fundamentais do refluxo gastro-esofágico (44).

O epitélio normal do esófago não expressa *GATA4* e *GATA6*; estes fatores de transcrição só surgem no EB e estão, como já foi dito, igualmente implicados na manutenção e desenvolvimento intestinais, através da regulação dos mesmos genes de diferenciação (8). Estes, por sua vez, relacionam-se com múltiplas vias, tais como, as do

transforming growth factor beta (TGF β) e *bone morphogenic protein 4* (BMP4), que também já mostraram estar implicadas na formação de EB (8).

Outra interação do Cdx2 dá-se com o fator de transcrição intestinal Sox9. Este fator está, sobretudo, relacionado com as células de Paneth do intestino, tendo-se apontado que a sua ausência incapacita a sua formação (8). Sox9 faz parte da via molecular Wnt, uma via molecular de sinalização, regulando-a negativamente. Esta via está implicada em processos de embriogénese mas também carcinogénicos. Esta via pode estar envolvida no desenvolvimento da metaplasia intestinal do esófago e, como tal, crê-se que a inibição do estímulo de Sox9, possa reprimir o efeito do Cdx2 (8). Assim, se houver a inibição de Sox9, a via Wnt fica ativada e há um aumento na expressão de Cdx2. Contudo, Vaninetti *et al.* não confirmou esta relação (40). Por outro lado, Wang *et al.* concluiu que o papel do Sox9 no desenvolvimento do EB pode ser independente da via Wnt, bem como das referidas células de Paneth. Portanto, pouco se sabe sobre esta via e a sua relação com o EB e muitos dados são controversos, sendo necessários mais estudos para se compreender a sua ligação.

O gene *P63*, já referido acima, faz parte da família do *P53* e expressa-se, na camada basal do epitélio, e é responsável pela estratificação do epitélio escamoso. No EB, após exposição de células epiteliais esofágicas a ácido e sais biliares, este fator mostrou estar diminuído, ficando demonstrada a sua implicação na fisiopatologia do EB (4, 8).

Também se sabe que, conseqüentemente à exposição a sais biliares é ativada, nas células esofágicas, a via NF-kB (45). Green *et al.* mostrou que várias vias, incluindo NF-kB, eram ativadas após a exposição de células esofágicas a sais biliares, sobretudo se estes estivessem em ambiente ácido. Isto está em concordância com a hipótese de que

a combinação de sais biliares com ácido gástrico é essencial para o desenvolvimento de EB (44).

A via NF-kB é fulcral nos processos inflamatórios, e regula a expressão de múltiplas citocinas (9). Para além de serem produzidas várias citocinas pró-inflamatórias neste contexto, também o Cdx2 é expresso em maiores quantidades (8). Huo *et al.*, num trabalho onde estudou o efeito do refluxo gastro-esofágico em células escamosas do epitélio esofágico, verificou que o bloqueio da via NF-kB prevenia a ativação e expressão do fator Cdx2, pondo em evidência o papel destes dois componentes na inflamação e transformação do epitélio do esófago (9). Pensa-se que a ativação desta via seja também por desmetilação da região promotora de NF-kB (4).

Tal como mencionado mais acima, algumas vias envolvidas na embriogénese do intestino, vão estar envolvidos no desenvolvimento do EB e vão regular os genes da família Cdx. Uma delas é a via de sinalização molecular *Hedgehog*, a qual por sua vez, influencia a via da BMP4 e a produção de Cdx2 (8).

A BMP4 é expressa no EB, mas não no seu epitélio normal. Esta proteína é membro da família do TGF β , a qual através das vias de sinalização Smad e Map Kinase regulam mecanismos de diferenciação, migração e proliferação celular. A BMP4 parece também ser ativada pelos sais biliares, e ajudar o Cdx2 na diferenciação do epitélio colunar (8). A via *Hedgehog*, durante a embriogénese, ativa recetores como o *Patched*, na mesoderme, conduzindo à formação da proteína BMP4. Por sua vez, esta vai ser responsável pela manutenção do epitélio intestinal formado. Tal como nesta fase da vida, esta proteína vai manter estas funções no EB. Também foi comprovado que em células onde se induziu a expressão de BMP4, eram ativados genes de diferenciação

intestinais, bem como os genes da família Cdx que também participam nessa diferenciação (4).

A via molecular Notch participa na manutenção das células progenitoras das criptas intestinais e no desenvolvimento de células do seu epitélio. Sabe-se que a ativação e inibição desta via tem diferentes consequências: enquanto a sua ativação conduz ao desenvolvimento de enterócitos, a sua inibição leva à formação de células caliciformes e células de Paneth. Pensa-se que a inibição da via Notch possa contribuir para a transformação em EB, até porque a molécula Hes1, participante desta via, já se mostrou diminuída em células HET1A (células humanas de esófago normal imortalizadas). Menke *et al.* também verificou que esta via podia estar implicada nestes mecanismos, pois demonstrou que a via Notch era capaz de ativar a proliferação de células caliciformes num modelo animal exposto a refluxo gastro-esofágico (9).

A **Tabela 1** sumariza as funções de cada uma das moléculas, genes e vias de sinalização implicadas na transformação metaplásica do esófago, e que foram referidas ao longo deste capítulo.

Apesar do conhecimento destas vias, ainda pouco se sabe acerca das suas interações. A hipótese que mais se aceita é que após o contacto da mucosa com o ácido gástrico e os sais biliares, sejam produzidas citocinas pró-inflamatórias, através da via NF-kB. As moléculas inflamatórias vão, por sua vez, ativar os genes Cdx, quer por desmetilação das regiões promotoras, quer pelas variadas vias descritas acima (4).

Tabela 1 – Funções das moléculas, genes e vias de sinalização implicadas no processo metaplásico do Esófago de Barrett. BMP4 – *Bone morphogenic protein 4*; Cdx2 – *Caudal related homologue 2*; GATA – *GATA binding protein*; HNF – *Hepatocyte nuclear factors*; Notch – *Notch pathway*; SHH – *Sonic Hedgehog*.

Gene/Molécula/Via	Funções
Cdx2	Diferenciação da endoderme no intestino primitivo (embriogénese), desenvolvimento de células mucosas do intestino e manutenção do epitélio intestinal. Regulação de genes implicados na proliferação, adesão e apoptose celular.
GATA 4 e 6	Estimulação da expressão de genes de diferenciação intestinal e manutenção do epitélio intestinal.
HNF	Estimulação da expressão de genes de diferenciação intestinal e manutenção do epitélio intestinal.
NF-kB	Produção de citocinas pró-inflamatórias e desmetilação da região promotora de Cdx2.
Notch	Manutenção das células progenitoras das criptas intestinais. A sua ativação origina enterócitos e a sua inibição células caliciformes.
P63	Estratificação dos epitélios escamosos. A sua inibição coopera na transformação do epitélio escamoso em colunar simples.
SHH e BMP4	SHH ativa a produção de BMP4. BMP4 promove a expressão de genes de diferenciação intestinal e a manutenção do epitélio intestinal.
Sox9	Formação das células de Paneth do intestino. A sua repressão é um estímulo à expressão do gene Cdx2.

- **O PAPEL DOS SAIS BILIARES**

Tal como referido, os sais biliares são importantíssimos na formação do EB (2), mas também o são no ACE. Os ácidos biliares são esteroides sintetizados a partir de colesterol, no fígado, e que permitem a absorção de gorduras da dieta nos enterócitos, sob a forma de micelas (45). Eles são libertados para o duodeno na bÍlis sob a forma de sais biliares e, principalmente na posição supina, podem sofrer refluxo para o estômago. Se houver alguma disfunção no esvaziamento da vesícula biliar que conduza à elevação de colecistoquinina, uma hormona gastro-intestinal secretada pelas células I do

duodeno, que estimula a contração da vesícula biliar e do pâncreas, esta tem a capacidade de reduzir a pressão de encerramento do esfíncter esofágico inferior, o que facilita o refluxo e, possivelmente, EB (46). Juntamente com o ácido gástrico, os sais biliares vão agravar os seus efeitos sobre a mucosa esofágica. Os ácidos biliares mais comumente encontrados no refluxo são: ácido glicocólico, ácido taurocólico, ácido glicodeoxicólico, ácido glicochenodeoxicólico e ácido deoxicólico (ADC) (45).

Os ácidos biliares quando ionizados, ou melhor, em valores de pH alcalinos, são insolúveis, não sendo capazes de penetrar na mucosa e lesar as suas células. Pelo contrário, se o pH se encontrar entre 3 e 6, os ácidos biliares dissolvem-se, adquirindo tal capacidade. Na porção distal do esófago, quando existe refluxo gastro-esofágico, o meio fica a um pH mais baixo, estabelecendo-se como *cut-off* para diagnóstico, um pH inferior a 4. É aqui que estes se tornam perigosos para a mucosa e a lesam, tal como acontece no esófago com o refluxo gastro-esofágico. Já com valores de pH ainda mais baixos, como os que ocorrem no estômago, eles voltam a precipitar e a serem estáveis (2).

Também a frequência e ritmo com que o refluxo contacta com a mucosa esofágica contribuem para a sua fisiopatologia. Fitzgerald *et al.*, usando amostras de biópsia colhidas por endoscopia, verificou que a exposição em pulsos, isto é, uma hora com pH 3.5 seguido de regresso à neutralidade, era capaz de estimular a proliferação celular. Caso esta exposição fosse contínua, ou seja, persistentemente com um pH de 3.5, sem atingir um pH neutro, havia a expressão de marcadores de diferenciação intestinal (*Villin*), mas não aumento da divisão celular (2).

Apesar dos tratamentos de supressão do ácido gástrico, particularmente, com o uso de inibidores da bomba de prótons (IBP), a incidência do ACE continua a aumentar. Isto

veio realçar a suspeita de que o conteúdo duodenal tem um papel importante na sua fisiopatologia (47). Cheng *et al.* investigou o efeito do refluxo contendo apenas ácido gástrico em ratos. Foi utilizado como comparação ao esófago humano o pré-estômago dos ratos, também este com epitélio escamoso estratificado. Sem a presença dos sais biliares, apenas houve a formação de esofagite e metaplasia sem displasia, não se tendo encontrado quaisquer amostras com displasia ou carcinoma (47). Isto põe em evidência que os sais biliares podem, também no homem, ser os principais promotores das alterações que conduzem à neoplasia. Esta teoria explica o porquê de os tratamentos com IBP não terem impacto na incidência do ACE (48).

Também Burnat *et al.* considerou que deveriam ser os sais biliares os responsáveis pela progressão carcinogénica do EB. Para tal, usou células OE-19, células derivadas de adenocarcinoma esofágico humano, tendo também demonstrado que o ADC era capaz de regular positivamente o NF- κ B, e este, por conseguinte, de ativar o Cdx-2 e a enzima cicloxigenase 2 (COX-2). O Cdx-2 já referido acima é, então, responsável por intervir na transformação metaplásica; o segundo será abordado em maior pormenor no capítulo referente à transformação neoplásica, por ter maior importância na carcinogénese (49). Aliás, parte do stresse oxidativo que ocorre na fisiopatologia do EB, não só pela ativação da COX-2, mas também do NO e outros, é imputável aos sais biliares. Estes vão, mais uma vez, ser cruciais na transformação maligna do EB (6, 16, 50), como veremos no capítulo referente ao ACE.

A TRANSFORMAÇÃO NEOPLÁSICA

Como mencionado, o EB consiste numa lesão pré-maligna. A inflamação repetida e prolongada a que o seu epitélio está exposto leva ao desencadeamento de

fenómenos, genéticos e epigenéticos, que conferem progressivamente um fenótipo de malignidade às suas células (2, 3). São estas alterações que conduzem ao desenvolvimento de displasia e, mais tarde, ao carcinoma. Para que tal ocorra, sucedem-se várias etapas: em primeiro lugar forma-se DBG, seguindo-se DAG e, finalmente, ACE. A displasia consiste numa desorganização celular, na qual ocorrem as já mencionadas alterações genéticas e epigenéticas, especialmente em regiões responsáveis pelos mecanismos de morte e proliferação celulares (17). Contudo, ainda pouco se conhece acerca destes fenómenos e é sabido que quanto maior o grau da displasia, maior o risco de desenvolvimento de carcinoma. Embora apenas 0,2 a 0,5% dos pacientes com EB progridam para ACE, por ano, caso haja uma DAG o risco sobe para os 10% (1). O tempo de progressão de DBG para DAG, bem como desta para ACE, é muito inconstante. Alguns doentes podem demorar décadas até desenvolverem ACE, ou até podem mesmo regredir. Outros, porém, evoluem muito rapidamente (18, 51).

Atualmente, segundo a *British Society of Gastroenterology*, os doentes com refluxo gastro-esofágico com sintomas crónicos e fatores de risco para desenvolver ACE (pelo menos três dos seguintes: idade superior a 50 anos, raça caucasiana, género masculino, obesidade, ou história familiar), devem ter um acompanhamento médico rigoroso (5). Desta vigilância fazem parte a realização de endoscopia, cuja frequência depende dos achados da endoscopia diagnóstica. Se o doente apresentar EB com comprimento inferior a 3 centímetros (esófago de Barrett curto), sem que se constate haver displasia ou metaplasia do tipo intestinal, deve realizar uma endoscopia para confirmar o diagnóstico e ser dispensado da vigilância; se tiver um comprimento inferior a 3 cm, mas com metaplasia do tipo intestinal, deve realizar endoscopia a cada 3-5 anos; se o seu comprimento for superior ou igual a 3 cm (esófago de Barrett longo),

as endoscopias devem ser efetuadas a cada 2-3 anos (5). Embora o risco de malignização seja idêntico em ambos, os segundos tendem a ter maiores complicações, por evidenciarem sujeição mais extensa ao refluxo (2). As endoscopias de seguimento consistem na observação da mucosa do esófago e a realização de colheita de biopsias da circunferência distal do esófago. Estas geralmente são feitas a cada dois centímetros em mucosa aparentemente normal e, adicionalmente, em áreas visualmente alteradas. Estas amostras são, posteriormente, enviadas à Anatomia Patológica que descreve se existe alguma anormalidade. As peças que sejam classificadas como tendo displasia devem ser estudadas por um segundo patologista, de maneira a reduzir o grau de incerteza acerca do resultado (5, 17). Atualmente, o único marcador de previsão de progressão neoplásica aceite para o EB é a presença de displasia (52). No entanto, este seguimento tem um custo-efetividade baixo, pois a maioria dos doentes com refluxo e/ou EB não desenvolvem cancro. Nem mesmo a severidade da sintomatologia ajuda nesta distinção, já que 50% dos doentes que desenvolvem ACE não referem sintomas de refluxo gastroesofágico (53). Outras desvantagens deste processo são o fato de poderem surgir complicações posteriores à endoscopia e biopsia, e o fato de os patologistas serem muito discordantes em relação aos graus da displasia (1, 2, 17). Para além disto, os doentes que são diagnosticados com DAG devem ser acompanhados por uma equipa multidisciplinar e, perante a incapacidade de sabermos quais deles progredirão para ACE, deve ser-lhes dada a possibilidade de realizarem a remoção da área displásica, quer por esofagectomia, quer por tratamento ablativo endoscópico (17), o que perante a ausência de alterações, pode não ser bem aceite pelos pacientes.

Assim, é urgente o conhecimento dos processos envolvidos na fisiopatologia da progressão para o ACE, de forma a poderem ser desenvolvidos métodos mais precisos, seguros e eficazes de vigilância destes doentes.

- **O PAPEL DOS SAIS BILIARES E DA INFLAMAÇÃO**

A progressão neoplásica tem como pedra basilar o aparecimento de instabilidade genética. Esta é induzida pelo conteúdo ácido e biliar do refluxo gastro-esofágico, bem como pela inflamação induzida por este processo (6).

Como mencionado anteriormente, Cheng *et al.*, e outros investigadores, foram capazes de verificar que apenas com a presença de ácido gástrico, sem a presença de sais biliares, não havia aquisição de displasia nem de ACE (45, 47). Os sais biliares são, ao que parece, os maiores responsáveis pela indução de mutações e instabilidade genética, colaborando no desenvolvimento do ACE a partir do EB. Todavia, Dvorak *et al.* demonstrou que uma exposição isolada a sais biliares, também não era suficiente para induzir lesões genéticas (45). Contrariamente a este fato, Burnat *et al.* concluiu que, mesmo a um pH neutro, os sais biliares podiam contribuir para a promoção da carcinogénese, o que sugere, que mesmo após a inibição da produção de ácido gástrico continua a haver a possibilidade do EB sofrer transformação neoplásica. Assim, embora não haja consenso sobre este ponto, há concordância sobre o fato de que, não só os sais biliares são fulcrais na formação da metaplasia, como também o são na carcinogénese do EB (38).

Nem todos os ácidos biliares têm a mesma capacidade de participar nos processos que conduzem à neoplasia. Embora os referidos no capítulo anterior tenham um papel importante na evolução da metaplasia (6), o ADC parece ter maior aptidão para estimular vias implicadas na carcinogénese (49).

Há muito que se sabe que a inflamação crónica se relaciona com o cancro. Não só a própria inflamação induz alterações genéticas que promovem a carcinogénese (via extrínseca inflamatória), como algumas alterações genéticas, em células locais,

produzem moléculas que formam um microambiente inflamatório (via intrínseca inflamatória) (9, 54). No caso do refluxo gastro-esofágico, o seu conteúdo lesa o epitélio do esófago, o que estimula a infiltração de células inflamatórias no local. Neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células dendríticas invadem a zona e criam um microambiente inflamatório propício à carcinogénese. Este infiltrado vai ser responsável pela produção de citocinas e de outras moléculas da inflamação que conduzirão a uma maior destruição celular e a alterações genéticas do epitélio esofágico (55).

Uma das vias moleculares que está envolvida na carcinogénese do EB é a via constituída pelo *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) e pela interleucina 6 (IL-6). A **Figura 2** esquematiza a via IL-6/STAT3 e os genes consequentemente ativados.

Zhang *et al.* verificou que em células de EB transformadas, a molécula STAT3 se apresentava com expressão aumentada e fosforilada, isto é, ativada. Também demonstrou que a molécula *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1* (Mcl-1) estava simultaneamente amplificada (54). Esta molécula pertence à família da proteína *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) e, como tal, sendo moléculas com função anti-apoptótica, contribuem para o desenvolvimento de resistência à apoptose. Sabe-se também que Mcl-1 é um alvo molecular de STAT3 (50). A via que relaciona a inflamação com estas moléculas e com a carcinogénese é a seguinte: após a estimulação da via NF- κ B pelo refluxo gastro-esofágico, a citocina pró-inflamatória IL-6 é produzida e, posteriormente, liga-se a um complexo formado pelo seu recetor IL-6R α mais a glicoproteína 130; isto conduz à fosforilação deste complexo, o que ativa proteínas do tipo *Janus Kinase* (JAKs); por conseguinte, estas vão ativar a molécula STAT3 por fosforilação, cuja função será translocar-se até ao núcleo e ativar a transcrição do gene de Mcl-1. Este é um dos possíveis mecanismos que liga a

inflamação e a resistência à apoptose celular. Zhang *et al.* ainda conseguiu provar que se se inibisse esta via, a expressão de Mcl-1 reduzia, evidenciando, novamente, esta estreita relação (54). Goldman *et al.* também mostrou a interação da via IL-6 – STAT3 com Mcl-1, pois tanto STAT3 como esta última molécula mostraram-se simultaneamente ativadas após a exposição de células esofágicas a ácido e sais biliares (50)

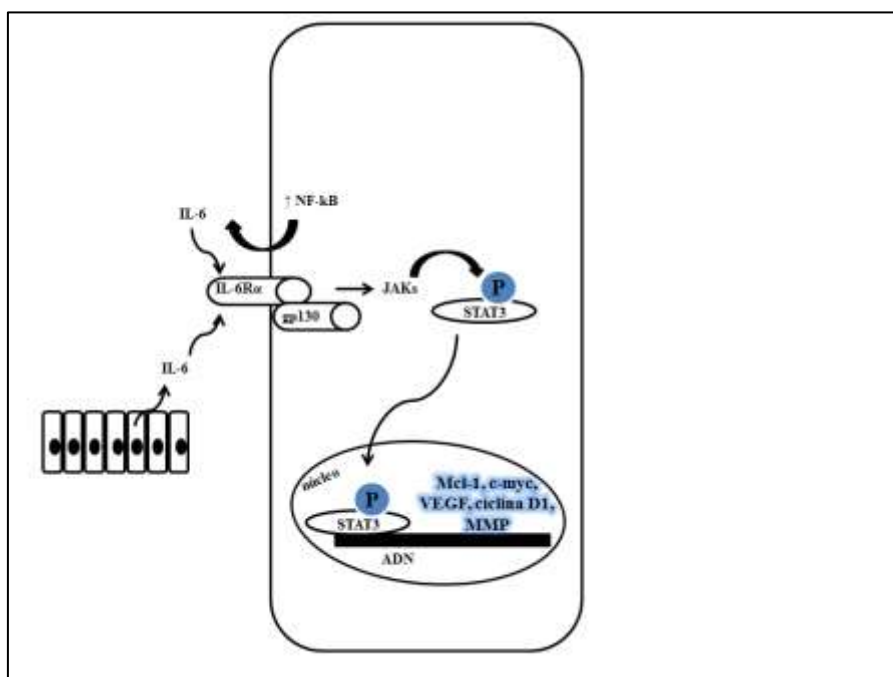


Figura 2 – A via IL-6/STAT3 nas células do Esôfago de Barrett. c-myc – proto-oncogene *C-MYC*; IL-6 – Interleucina 6; IL-6Rα – Recetor de IL-6; gp130 – Glicoproteína 130; JAK – *Janus Kinase*; MMP – Metaloproteinases; STAT3 - *signal transducer and activator of transcription 3*; Mcl-1 - *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1*; VEGF – *Vascular endothelial growth factor*.

Dvorak *et al.* demonstrou ainda que as células intestinais do EB produzem quantidades desmedidas de IL-6 e dos seus recetores, pelo que se pode concluir que há, concomitantemente à sua produção parácrina, uma produção autócrina deste fator. Como se sabe, as células carcinogénicas produzem substâncias para a sua própria

sobrevivência e, desta forma, este é um mecanismo que coopera na transformação neoplásica do EB (56).

Não só o STAT3 regula o processo de apoptose, como também colabora na regulação de outros processos que caracterizam o processo carcinogénico, como a replicação celular, a produção de sinais de sobrevivência celular, a angiogénese, entre outros. Para tal, ativa a expressão de proteínas como a survivina (para resistência à apoptose), proteína do proto-oncogene *C-MYC* (para crescimento celular), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (para angiogénese) e ciclina D1 (para crescimento celular) (56). Ainda regula metaloproteinases (MMP) que têm a função de degradar a matriz extracelular, sendo moléculas essenciais na invasão e migração de células neoplásicas. MMP-1, MMP-2 e MMP-7 são expressas no tecido displásico do EB e MMP-2 e MMP-9 já se demonstrou serem reguladas pela molécula STAT3 (9).

Uma outra via bastante importante é a via NF-kB, que, tal como já foi referido, desempenha um papel crucial na transformação do epitélio escamoso do esófago em epitélio colunar. Muitos autores já demonstraram que esta via está presente no EB e que se torna gradualmente mais ativa à medida que a displasia se agrava (9). Ela é ativada pela exposição aos ácidos biliares, em especial ao ADC (45). Goldman *et al.* revelou que esta via estava aumentada em células HETA1R quando expostas a um pH ácido (5.5) e ácidos biliares (50), sendo responsável pela estimulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, que vão ter um papel semelhante ao de IL-6, ou seja, regular genes capazes de alterar processos de sobrevivência e morte celulares (56). Assim, além de NF-kB ter importância no desenvolvimento da metaplasia, também vai ter um papel crucial no desenvolvimento do ACE (57).

Um fenômeno interessante que surge no decorrer das transformações celulares é que, enquanto numa simples esofagite predominam as citocinas Th1, no EB são as Th2 que prevalecem. Parece haver uma transição da via imunológica Th1 para Th2 (57). Dvorak *et al.* estudou as várias citocinas aumentadas em tecidos com metaplasia e verificou que era a IL-6 (uma citocina Th2) a citocina que mais frequentemente se elevava, realçando, mais uma vez, o importante papel desta citocina na ligação da inflamação com a carcinogénese (56). IL-4, *Tumor necrosis factor α* (TNF- α) (57), IL-10, IL-8 e IL-1 β (55) são, conjuntamente, citocinas Th2, que se apresentam aumentadas de forma crescente na passagem do EB ao ACE (55). A transição entre os dois tipos de células CD4+ pode ajudar a explicar a formação do ACE, pois já se demonstrou que tais citocinas ativam vias celulares capazes de alterar a transcrição de genes cruciais com potencial carcinogénico (58).

As citocinas pró-inflamatórias podem originar mutações genéticas através da ativação da enzima *activation-induced cytidine deaminase* (AID) (59). Esta é expressa em vários tipos de células em resposta às citocinas sintetizadas no meio. Posteriormente, ao estar sobreexpressa, vai ser capaz de produzir mutações no ADN das células locais. Morita *et al.* concluíram que esta enzima se encontrava aumentada nas células colunares do EB, mas que nas células do seu epitélio escamoso não. Este estudo leva-nos a pensar que a AID pode ter efetivamente um papel na progressão EB-ACE, uma vez que se sabe ter funções mutagénicas que estão presentes nesta sequência (60). Contudo, apesar do estudo ter tentado relacionar a expressão de AID com as mutações em *P53* e *P16*, mutações preponderantes no ACE, a evidência encontrada não foi suficiente para tal. Contudo, Morita *et al.* ainda demonstrou que a ativação de AID era feita via NF-kB, que, como já foi referido, é, efetivamente, ativada pelos sais biliares do refluxo gastro-esofágico (60).

As células T desempenham um papel fulcral no desencadeamento do processo inflamatório. Isto foi estudado por Souza *et al.* Este autor verificou que estas células já se encontravam presentes antes de todas as outras células inflamatórias e que, precediam os danos celulares. Assim, concluiu-se que os linfócitos T têm, realmente, uma importância central no desencadear da inflamação e lesão que se encontram no EB (58). Souza *et al.* ainda foi capaz de demonstrar que eram os sais biliares que lesavam diretamente as células esofágicas mas era o ácido clorídrico o responsável por ativar a expressão de citocinas inflamatórias, como IL-8 e IL-1 β (58).

Além das citocinas, também são produzidas outras moléculas que têm, conjuntamente, capacidade de lesar as células do esófago. São elas as espécies reativas de oxigénio (ROS), prostaglandinas e NO que também vão contribuir para as alterações genéticas encontradas. Todas estas moléculas têm a capacidade de estimular os mecanismos que caracterizam o processo de transformação neoplásica (55). Um esquema acerca da ação destas moléculas na célula do EB está representado na **Figura 3**.

As ROS também contribuem para a ativação da via NF-kB e vice-versa (55, 56). O anião superóxido, o peróxido de hidrogénio, o radical hidroxilo e o peroxinitrito, são ROS produzidas neste microambiente. São capazes de lesar as membranas fosfolipídicas das células, as proteínas e o ADN nuclear (61). Desta maneira, são potentes indutores do processo carcinogénico (55, 58, 62). A enzima NADPH oxidase é responsável pela geração de superóxido. Fang *et al.* demonstrou que a sua isoforma NOX-5 se encontrava sobreexpressa em células de ACE e EB com DAG, em comparação com as células do epitélio esofágico normal e do EB sem displasia (61). Assim, estas são outras moléculas contribuintes para a transição EB-ACE e que poderão servir de biomarcadores desta transformação.

O NO é outra substância capaz de produzir lesão no ADN. As mutações por ele causadas são denominadas *double strand breaks* e promovem instabilidade genética que contribui para o processo carcinogénico (6, 33). Existem duas vias pelas quais o NO se origina no EB (4). Uma é pela ativação da forma induzível da sintetase do óxido nítrico (iNOS), que já se demonstrou estar regulada positivamente no EB e ACE, e que aumenta progressivamente à medida que a severidade da displasia aumenta (33, 58). A segunda via é pela redução dos nitritos existentes na saliva, pelas bactérias da cavidade oral, e que ao chegarem ao estômago são reduzidos pelo ácido gástrico em NO (4).

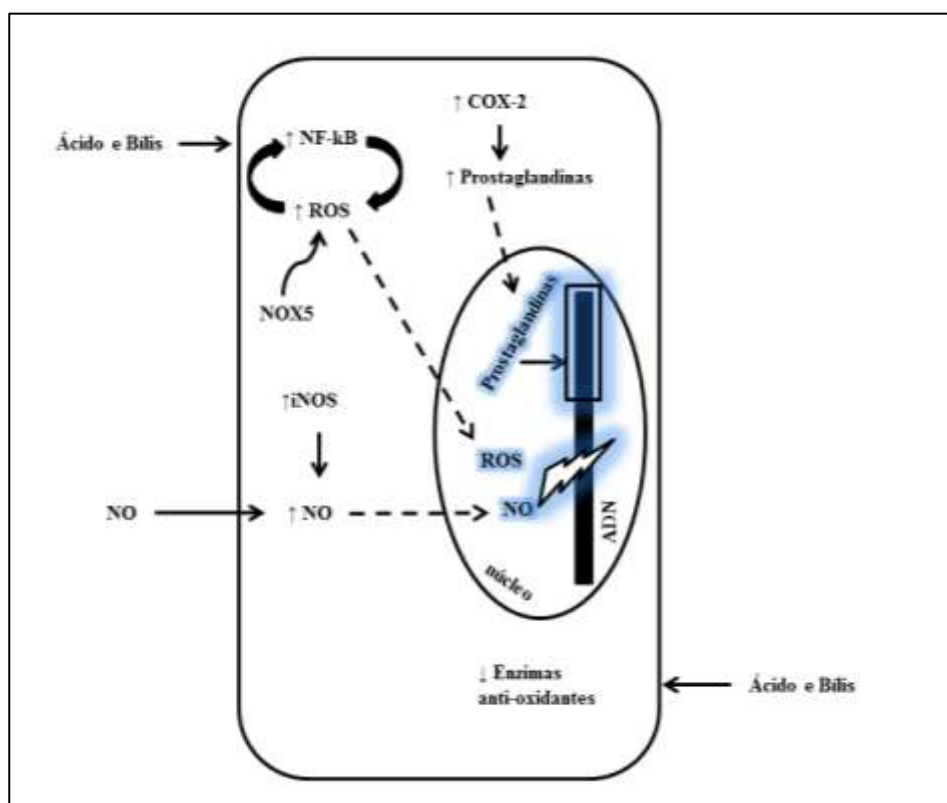


Figura 3 – A contribuição das ROS, NO, prostaglandinas e COX-2 na transformação neoplásica do Esófago de Barrett. COX-2 – Cicloxigenase-2; iNOS – Forma induzível da sintetase do óxido nítrico; NO – Óxido nítrico; NOX-5 – Isoforma de NADPH; ROS – Espécies reativas de oxigénio.

De modo oposto ao aumento de fatores oxidantes, as enzimas anti-oxidantes estão reduzidas no EB e no ACE (55). É o caso da superóxido dismutase e catalase (50). Também as enzimas MUTYH e OGG-1, que colaboram na remoção de mutações do ADN provocadas pelo stresse oxidativo, vão, concomitantemente, estar suprimidas pela ação dos sais biliares (49). Esta classe enzimática, ao estar em menor atividade, vai instalar um ambiente propício a mutações genéticas e transformação neoplásica (50).

A enzima COX-2, já mencionada no capítulo anterior, é responsável pela síntese de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico e pode igualmente estar implicada nestes processos. Ela é libertada em resposta aos ácidos biliares e mediadores inflamatórios. A sua ativação é dependente do NF-kB (49) que tem capacidade de se ligar à região promotora da COX-2 e ativar a sua produção, bem como a de prostaglandinas (55, 62). Embora esteja presente na esofagite, verifica-se que tem uma expressão progressivamente aumentada ao longo da sequência EB-ACE (18, 57, 63). Quando aumentada, a produção de prostaglandinas também aumenta, e esta está associada a um decréscimo de apoptose celular, aumento de proliferação, alteração da adesão celular e aumento da angiogénese. Para tal, algumas prostaglandinas conseguem ativar a metilação das regiões promotoras de genes implicados nestes processos (62). A COX-2 também pode induzir resistência à apoptose através da ativação da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (63). Os efeitos referidos parecem ser predominantemente mediados pela ligação da prostaglandina E2 aos seus recetores EP1, EP2, EP3 e EP4. Jiménez *et al.* verificou que, numa amostra de biópsias esofágicas que continham todos os fenótipos celulares da sequência EB - ACE, a COX-2 e os recetores EP2 e EP4 se mostravam aumentados gradualmente, enquanto a EP3 diminuía. Outros estudos também já tinham demonstrado que o ADC podia induzir a expressão dos recetores EP1, EP2 e EP4 em células esofágicas (64). Majka *et al.* demonstrou ainda que,

juntamente com COX-2, as citocinas IL-2 β e TNF- α tinham expressão aumentada (63). Isto significa, que há mecanismos sinérgicos envolvidos no processo meta e neoplásico.

Outra importante relação da COX-2 com o processo neoplásico é a possibilidade de ser regulada positivamente pela proteína heparanase. Esta tem funções de degradação da matriz extracelular tendo assim capacidade de ajudar à invasão e migração de células, processos característicos das células neoplásicas. Sonoda *et al.* estudou setenta e oito amostras de EB com o objetivo de determinar a expressão da heparanase e COX-2 no EB e na sua sequência até ACE, e também para compreender melhor a sua interação. Verificou que a expressão das duas moléculas se encontrava aumentada, sobretudo na presença de displasia. No entanto, não conseguiu determinar qual a relação entre as duas (65).

O uso de anti-inflamatórios não esteróides (AINE) com o objetivo de inibir a ação de COX-2 já foi estudado múltiplas vezes. Contudo, continua a ser controverso o seu uso nos pacientes com refluxo gastro-esofágico, já que alguns estudos mostraram haver benefício com o seu uso mas outros não (18, 63). Quando se procede a um tratamento de erradicação da zona metaplásica, por esofagectomia ou ablação endoscópica, tende a haver um decréscimo do valor de COX-2, pelo que se pode ponderar o seu uso como marcador de recidiva, e até de ACE, após ablação da região alterada (63).

Continua-se, todavia, sem conhecer em que parte da sequência EB – ACE estes mecanismos ocorrem e como é que todos eles se interligam.

A inflamação crónica e o stresse oxidativo formados por todas estas vias não só produzem mutações genéticas, como também o encurtamento dos telómeros. Este encurtamento relaciona-se com o risco de progressão do EB para o ACE, na medida em

que provoca instabilidade cromossômica e facilita o aparecimento de células com mutações e instabilidade genética (4, 7). O tabaco e a obesidade, que são fatores de risco do EB, também são conhecidos por reduzirem o tamanho dos telômeros, pelo que também estes podem colaborar neste processo (1). A enzima telomerase, que é responsável por manter o tamanho dos telômeros e, portanto, impedir a senescência celular, está aumentada nas células do ACE e diminuída nas células do EB sem displasia (21). Este fato, em conjugação com o anterior, pode indicar que as células do EB, quando sujeitas à ação dos agentes inflamatórios e oxidantes, desenvolvem redução dos telômeros e são originadas mutações genéticas. Estas mutações orientam, então, o processo displásico que conduzirá à formação de células neoplásicas. Estas últimas, para sobreviverem indefinidamente, têm que produzir altas quantidades de telomerase. Assim, o tamanho dos telômeros e os níveis de telomerase poderão ser mais um marcador de risco de progressão neoplásica do EB.

Já muitos autores relataram a forte relação existente entre a obesidade e o ACE. A obesidade, sendo um estado inflamatório crônico, contribui para a progressão neoplásica do EB. O aumento de pressão intra-abdominal que a obesidade provoca, em especial a visceral/central, promove o refluxo gastro-esofágico (6, 24). Contudo, são mecanismos moleculares que se pensam estar mais relacionados com o risco de progressão neoplásica. Um desses mecanismos prende-se com o fato de, no tecido adiposo, serem produzidas adipocitocinas que estão implicadas nos mecanismos inflamatórios. É o caso da leptina que tem valores tanto maiores quanto maior a quantidade de tecido adiposo. A leptina é capaz de ativar os recetores que fosforilam as proteínas STAT, e outras, que estão implicadas na regulação de processos de apoptose, multiplicação celular e angiogénese (6, 58). O tecido adiposo é também mais uma fonte de IL-6, cuja via já foi mencionada acima. O TNF- α é igualmente produzido pelo tecido adiposo central e

apresenta-se aumentado de forma crescente desde o EB até ao ACE. Outro possível mecanismo é através da elevação dos níveis de insulina e do fator de crescimento insulina-*like* (IGF) que os doentes obesos costumam apresentar. Ambos têm funções de promover o crescimento celular (6, 24). A ação dos IGF pode ainda ser modulada por outras moléculas como o fator de crescimento epitelial, a via *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) e as proteínas *Rat sarcoma* (RAS) (66). Desta forma, são necessários mais estudos para que se possa perceber a ação de todos estes fatores conjuntamente.

- **AS MUTAÇÕES GENÉTICAS E OUTROS MARCADORES**

Como já foi mencionado, a sequência progressiva desde EB até ACE implica a aquisição de inúmeras alterações genéticas e epigenéticas que conduzirão ao desenvolvimento de um fenótipo neoplásico. Para tal falam-se em dois possíveis modelos de evolução clonal/carcinogénese: no primeiro, e mais antigo, ocorre uma mutação numa única célula, a célula progenitora, que terá vantagem em relação a todas as outras para proliferar e desenvolver progressivamente mutações vantajosas, até culminar na célula neoplásica; na segunda, mais recente, a neoplasia origina-se a partir de várias células progenitoras, e não apenas de uma, havendo portanto maior heterogeneidade de clones (4, 18). O primeiro modelo foi proposto por Maley *et al.* e o segundo por Leedham *et al.* (67).

Quer seja pelo primeiro ou pelo segundo modelo, as alterações genéticas que mais se associam à progressão neoplásica do EB são a perda ou ganho de partes de cromossomas ou a perda de heterozigotia (LOH) (6). Mutações pontuais e modificações no padrão de metilação dos genes constituem outros mecanismos implicados. As principais alterações genéticas envolvidas na sequência EB-ACE referidas ao longo deste capítulo estão resumidas na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Alterações genéticas na transição Esófago de Barrett - Adenocarcinoma do Esófago. ACE – Adenocarcinoma do Esófago; AMACR – *Alfa-methylacyl coenzyme A racemase*; EB – Esófago de Barrett; EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*; FHIT – *Fragile histidine triad*; HIF-1 α – *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*; LOH – Perda de Heterozigotia; MGMT – *O⁶methyl-guanine metyltransferase*; MMR – *Mismatch Repair System*; NER – *Nucleotide excision repair*; TOPOII α – Isoforma α da topoisomerase II.

Gene	Tipo de Alteração	Fase	Resultado
P53	Mais frequentemente LOH; mutações pontuais e hipermetilação	Avançada	Passagem do <i>check-point</i> G1-S do ciclo celular e resistência à apoptose
P16	Mais frequentemente LOH e hipermetilação; mutações pontuais	Inicial (EB sem displasia)	Passagem do <i>check-point</i> G1-S do ciclo celular
APC	Mais frequentemente por LOH e hipermetilação	–	Alteração na ploidia de ADN e processos de adesão celular
Ciclina D1	Polimorfismo G/A870 aumenta o risco de EB	–	Passagem do <i>check-point</i> G1-S do ciclo celular
MMR e MGMT	Silenciamento através de instabilidade de microssatélites, HIF-1 α e citocinas pró-inflamatórias	–	Ausência de correção de mutações genéticas
NER	Polimorfismos <i>XPA 5' UTR G</i> , <i>RAD23B Ala249Val</i> e <i>ERCC1 3' UTR</i> aumentam o risco de ACE	–	Ausência de correção de mutações genéticas
KRAS	–	Avançada (EB com displasia e ACE)	Passagem do <i>check-point</i> G1-S do ciclo celular, resistência à apoptose e angiogénese
EGFR	Amplificação	Inicial (EB sem displasia)	Migração celular, resistência à apoptose e diferenciação celular reduzida
HER-2	Amplificação	Inicial	Migração celular, resistência à apoptose e diferenciação

			celular reduzida
TOPOIIα	Amplificação	–	<i>Double strand breaks</i>
E-caderina e β-catenina	Hipermetilação	–	Invasão e migração celular
Aneuploidia e Tetraploidia	–	Avançada	Instabilidade genética
FHIT	LOH	Inicial	–
AMACR	–	Células com DBG	β -oxidação de ácidos gordos

As mutações que mais frequentemente se encontram nas células do EB são alterações genéticas e epigenéticas das regiões cromossómicas 9p e 17p, que correspondem aos locais onde se encontram os genes supressores tumorais *P16* e *P53*, respetivamente (4, 68). Estes podem estar mutados por LOH, mutações pontuais ou padrões de metilação alterados (67). A importância destes fenómenos prende-se com o fato de se desencadear instabilidade genética. Esta parece ser um dos passos mais fundamentais no processo carcinogénico (7, 68). Contudo, não são suficientes para o desenvolvimento do cancro, pelo que é necessária a aquisição de outras modificações que serão discutidas neste capítulo (1). Isto significa, que a aquisição das mutações iniciais, que confere às células a vantagem de se proliferarem descontroladamente, é depois acompanhada por uma panóplia de alterações que cooperam no processo carcinogénico (4). Estas tendem a aumentar em quantidade e gravidade com o desenvolver da displasia e da neoplasia (6).

As alterações no gene *P16* parecem ser as mais precoces nas células do EB, conferindo-lhes uma inigualável vantagem clonal (7, 9). A aquisição precoce de mutações neste gene ajuda à expansão do EB pelas paredes do esófago e permite a acumulação de mutações em outros genes (21). *P16* é um gene supressor tumoral que

tem um papel importante na regulação do ciclo celular uma vez que ativa a produção de moléculas que regulam a proteína Rb. Por sua vez, esta permite a paragem do ciclo celular no período G1 e não permite a sua progressão para a fase S se a célula tiver alguma anomalia (9). A hipermetilação e LOH deste gene estão presentes na maioria dos ACE (61), mas também surgem nas células do EB sem displasia, pelo que é questionável o valor preditivo deste biomarcador (1, 9).

A *P53* é uma proteína cujo gene é um gene supressor tumoral. Ao detetar anomalias genéticas que não possam ser reparadas, induz a apoptose celular. Também regula a molécula Rb, pelo que se houver um decréscimo na expressão de *P53*, as células ultrapassam o *check-point* referido e multiplicam-se indefinidamente (9). Esta mutação, ao contrário das do gene *P16* que ocorrem na fase inicial do EB, surge em fases mais avançadas, conferindo à célula maior capacidade de acumular outras mutações essenciais ao processo carcinogénico (21). Goldman *et al.*, no estudo já mencionado, descreveu uma redução nos níveis da proteína P53 e que esta se podia relacionar com a ativação da via IL-6 – STAT3, pois o gene *P53* reprime esta via molecular (50). Este é provavelmente o marcador que mais foi estudado e que maior força tem em predizer o risco de ACE (16). A LOH deste gene é um bom preditor do risco de desenvolver ACE, visto Reid *et al.* ter demonstrado que esta alteração conferia um risco de desenvolver ACE 16 vezes superior ao normal (1). É na verdade, o marcador que confere maior risco para progressão e o que já se encontra em fases de estudo mais avançadas, para posterior adoção na prática clínica (10).

O gene *APC* é um gene supressor tumoral que pode estar alterado nas células do EB (10). O seu silenciamento ocorre sobretudo por mecanismos de LOH da região 5q e hipermetilação da sua região promotora (18). A inativação do *APC* pode, por si só, causar alterações na ploidia e adesão celulares (3, 59).

O *Mismatch Repair System* (MMR) e a *O⁶methyl-guanine methyltransferase* (MGMT) são conjuntos de enzimas responsáveis pela correção de certas alterações genéticas. Embora mutações inativadoras do primeiro sejam raras no ACE, a MGMT parece estar desativada com frequência (4). A inativação de MMR também se pode dar pela via molecular do *Hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF-1 α), que é ativada pelas citocinas pró-inflamatórias, ou pelo stresse oxidativo. O seu silenciamento está estreitamente relacionado com a instabilidade de microssatélites que estão presentes em vários carcinomas gastrointestinais (59). Também a via reparadora *Nucleotide Excision Repair* (NER) pode sofrer mutações. Alguns tipos de polimorfismos parecem estar também associados a maior risco de desenvolvimento de ACE. É o caso dos alelos *XPA 5' UTR G* (alelo do gene que codifica a proteína *DNA repair protein complementing XP-A cells*), *RAD23B Ala249Val* (alelo de um gene que codifica a proteína *UV excision repair protein RAD23 homolog B*) e *ERCC1 3' UTR* (alelo do gene que codifica a proteína *excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 1*) (59).

Outro possível marcador é o oncogene *KRAS* que regula a passagem da fase G1 para a S, pelo que a sua desativação conduz a uma proliferação desmedida. Também pode ocorrer resistência à apoptose, bem como estimulação da angiogénese, tudo processos que favorecem o aparecimento de neoplasia. Embora as alterações da via Ras possam ser detetadas no EB sem displasia, isto é bastante raro. Esta via sofre alteração sobretudo quando existe displasia ou ACE (9).

A ativação da via Ras pode ser explicada, não só por alteração do seu gene, como também consequente à regulação pela via em que TGF- α ativa o recetor *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), já que um dos alvos desta via são as proteínas RAS. Esta via constitui, nas células com alterações neoplásicas, um estímulo ao crescimento

auto-suficiente (18), à migração celular, à resistência à apoptose e à diferenciação reduzida (69). TGF- α e EGFR parecem estar também aumentados logo nas fases iniciais do EB, mesmo sem a existência de displasia (9, 21). No entanto, a sua ativação prevalece nos tecidos com displasia e ACE (70). O EGFR parece ainda ter um valor prognóstico, demonstrado por Pretto *et al.*, cujo estudo verificou haver níveis de EGFR diminuídos nos pacientes apenas com refluxo, mas a sua expressão aumentava à medida que a doença era mais severa (69).

Outros recetores de tirosina cinase, como o EGFR, também já se mostraram aumentados no ACE, como é o caso de FGFR, Met, ErbB2 e ErbB3 (4, 18, 70). O fator de crescimento TGF- β 1 ativador deste tipo de recetores também se mostra alterado no ACE, sobretudo por metilação do seu gene (67). Rees *et al.* foi capaz de demonstrar que, enquanto nas fases iniciais da carcinogénese do EB o TGF- β 1 tinha expressão diminuída, o que conferia às células uma proliferação desregulada, nas fases mais avançadas esta proteína já se encontrava bastante ativada, sobretudo nas margens do tumor, como fator promotor da invasão tecidular (4).

O recetor ErbB2, ou HER-2, é muito estudado e conhecido em outros cancros, sendo o da mama o mais preponderante. Schoppmann *et al.* e Fassan *et al.* verificaram haver amplificação do gene HER-2 em fases iniciais da sequência EB-ACE (71, 72). Contudo, outros estudos a seu respeito não estão em conformidade com estes (21). O gene *TOPOII α* coexiste na mesma região cromossómica que HER-2, a região 17q. Este gene codifica a isoforma α da enzima topoisomerase II, cuja função é desencadear uma lesão *double strand break* no ADN (21). A hipótese colocada para o aumento deste gene é ele ser expresso concomitantemente com o do HER-2. Rossi *et al.* demonstrou que nas biópsias de EB com displasia e ACE, a amplificação de *TOPOII α* era muito rara na ausência da amplificação do HER-2. Também concluiu que a presença de aneuploidia

no cromossoma 17 era muito frequente nos pacientes com ACE (73). Estas conclusões apoiam a teoria destes dois genes serem co-amplificados sinergicamente na progressão EB-ACE.

A ciclina D1, outra proteína que regula o ciclo celular, pode também servir como biomarcador. Esta já se mostrou aumentada no EB, cujo aumento se relacionou com um risco de ACE superior ao da população geral (1). Um estudo realizado por Bani-Hani *et al.* demonstrou que os pacientes com EB que mostravam positividade para a ciclina D1 tinham um risco 6 a 7 vezes superior de desenvolver ACE (10). Arber *et al.* também relatou uma expressão de ciclina D1 46% superior nas amostras de EB e 64% nas de ACE (18). Assim, parece haver uma expressão maior à medida que a transformação neoplásica ocorre. Além da sua positividade, diferentes isoformas podem implicar maior risco de ACE. Casso *et al.* evidenciou que um polimorfismo do gene da ciclina D1, G/A870, estava mais associado ao desenvolvimento de EB (9).

Para que ocorra a invasão de outros tecidos pelo tumor, são necessárias proteínas capazes de alterar a adesão célula a célula. As caderinas são moléculas cruciais na adesão celular e parecem estar silenciadas na carcinogénese do EB. O seu silenciamento compromete a ligação das células entre si, favorecendo a invasão e migração celular. A sua repressão pode dar-se por hipermetilação. A E-caderina e a β -catenina já se mostraram diminuídas progressivamente ao longo da sequência EB-ACE (4, 21).

A ploidia parece ser outro fator preditor da progressão EB – ACE. A aneuploidia e a tetraploidia dizem respeito à alteração numérica de cromossomas. A primeira define um número anormal de cromossomas para a espécie em questão, e a segunda define que cada cromossoma tem quatro cópias (10). Quer a aneuploidia quer a tetraploidia aumentam o risco de desenvolver ACE (7, 16) e são eventos tardios (67) da

carcinogénese. Constituem bons marcadores de progressão neoplásica, mas as dificuldades técnicas do método de deteção têm restringido a sua utilização na prática clínica (10).

Muitos outros genes têm sido explorados. Por exemplo, o gene supressor tumoral *fragile histidine triad (FHIT)* é perdido por LOH com elevada frequência ainda na fase metaplásica, tal como foi demonstrado por Akagi *et al.* (74). *C-MYC* é um oncogene que também está altamente ativado nas biópsias de ACE (67).

A *Alfa-methylacyl coenzyme A racemase (AMACR)* é um possível marcador das lesões com DBG (21). Esta enzima catalisa a reação de β -oxidação de cadeias de ácidos gordos. É já um conhecido marcador do carcinoma da próstata e pensa-se poder vir a sê-lo no ACE. Kastelein *et al.* executou um estudo de coorte prospetivo que incluiu 720 pessoas com EB, as quais foram acompanhadas por uma média de 6,6 anos. Após a recolha de biópsias e o estudo da expressão de AMACR, verificou que todos os tipos de tecidos expressavam a enzima, mesmo sem a existência de displasia. No entanto, a sua expressão elevava-se à medida que a doença era mais grave, pelo que a AMACR pode não ser capaz de diagnosticar quando usada individualmente, mas tem valor prognóstico (75). Esta enzima relaciona-se com a carcinogénese do EB, na medida em que esta enzima tem vindo a ser correlacionada com dietas ricas em ácidos gordos (75). Tal como referido, o ACE tem uma frequência muito superior nos países ocidentais, ditos desenvolvidos, nos quais as pessoas têm dietas ricas em gorduras e são muito sedentárias. Assim, para além de AMACR poder vir a ser um biomarcador dos doentes que progredirão para neoplasia a partir de EB, também apoia a teoria de que a obesidade é um importante fator de risco para esta.

Apesar de cada possível biomarcador poder estimar a probabilidade de um doente vir a ter ACE, é a combinação de vários que tem maior interesse (61, 76). Bird-Lieberman *et al.* realizou um estudo que incorporava 7 biomarcadores (ploidia de ADN, P53, ciclina A, DBG, *Aspergillus Oruzae Lectin* (AOL), *carbohydrate antigen 19.9*, CD15 e *wheat germ agglutinin*) para avaliar, de entre uma base de dados com 9329 doentes com EB, quais os que progrediam para ACE. Como nem todos os marcadores identificavam corretamente os progressivos, o conjunto foi reduzido para 3 biomarcadores: ploidia de ADN, DBG e AOL (76), o qual se veio a mostrar positivamente regulado nos doentes que desenvolviam ACE, em relação aos que permaneciam com EB, identificando a maioria dos EB que progrediam para ACE, assumindo-se assim como biomarcador promissor para uso futuro. (1, 70). O papel da ploidia de ADN e da DBG já foi mencionado anteriormente. Quanto à lectina AOL, esta parece contribuir para a progressão neoplásica por facilitar a formação de metástases. A AOL liga-se a grupos fucosil α 1-6 e α -1-4, o que altera a interação destes com a E-selectina do endotélio (76). A vantagem que a sua expressão confere é facilitar a migração de células neoplásicas através do endotélio vascular e levar ao desenvolvimento de metástases.

A diversidade clonal existente entre as células do EB pode também constituir um bom biomarcador de progressão. Merlo *et al.* e Maley *et al.* conseguiram demonstrar, usando várias fontes de diversidade clonal como microssatélites, quantidade de ADN, mutações pontuais e hipermetilação de promotores, que quanto maior era esta diversidade, isto é, quanto mais alterações moleculares se encontravam nas células, maior era o risco de progressão para ACE (77).

Outro alvo de mutações encontrado em tumores é o ADN mitocondrial (1). As mitocôndrias, além de serem a sede da fosforilação oxidativa que fornece energia às

células, são também um lugar onde decorrem processos de apoptose (78, 79). Por ter um papel tão importante na morte celular, a alteração do ADN mitocondrial pode conduzir a defeitos nessa sua ação e cooperar na formação de uma neoplasia. Também se sabe que com a geração de hipoxia e com um sistema de reparação insuficiente, o que é comum nos tumores, podem ser originadas ROS que lesam o ADN mitocondrial (78, 79). As ROS também têm, no caso do EB, origem na inflamação e destruição celular causada pelos sais biliares. Lee *et al.* demonstrou que os níveis de ROS nas células do EB eram muito superiores às das células escamosas, e que existia uma maior taxa de mutações no ADN mitocondrial nas primeiras em relação às segundas, concentrando-se essas mutações maioritariamente em regiões reguladoras (79). Wang *et al.* encontrou níveis mais elevados de ADN mitocondrial alterado em células de EB com displasia, o que poderá vir a justificar a sua utilização como marcador de progressão para ACE. Também se concluiu que as células com displasia tinham uma resistência superior à hipoxia que as células metaplásicas, pois mantinham o seu potencial de membrana mitocondrial elevado mesmo quando os níveis de oxigénio reduziam (78). Estas são possíveis adaptações celulares essenciais às células para se manterem vivas e acumularem mutações.

- **AS MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS**

Tão importantes como mutações genéticas são as alterações epigenéticas que podem ativar ou silenciar genes implicados nos processos carcinogénicos (4, 59). A **Tabela 3** sumariza os principais genes hiper e hipometilados da sequência EB-ACE.

Uma modificação epigenéticas significa que há uma mudança na expressão de um gene sem que a sua sequência de bases tenha sido alterada (1). Pensa-se que na transformação de EB para ACE ocorram múltiplas modificações epigenéticas (7, 80,

81), as quais podem vir a ser marcadores úteis de risco. Neste processo a mais importante e mais estudada alteração é a metilação (1, 3). Esta ocorre maioritariamente na base orgânica azotada citosina de regiões designadas ilhas CpG, que surgem sobretudo em áreas reguladoras de genes (3).

Tabela 3 – Principais alterações no padrão de metilação de genes no processo de transformação neoplásica do Esófago de Barrett. CXCL – *Chemokine (C-X-C motif) ligand*; DMBT1 – *Deleted in malignant brain tumors 1*; GATA6 – *GATA binding protein 6*; MGMT – *O⁶methyl-guanine methyltransferase*; MMR – *Mismatch Repair System*; SST – Somatostatina.

Gene	Função
Genes Hipermetilados – Genes Supressores Tumorais	
<i>P16</i>	Regulação do <i>check-point</i> G1-S do ciclo celular
<i>APC</i>	Adesão celular
pRb	Regulação do <i>check-point</i> G1-S do ciclo celular
REPRIMO	Regulação do <i>check-point</i> G2 do ciclo celular
MGMT e MMR	Reparação de mutações genéticas
GST e GPX	Enzimas anti-oxidantes
<i>SOCS-1 e 3</i>	Regulação negativa de citocinas e via STAT
<i>CDH1 e CDH13</i>	Adesão celular
<i>PKP1</i>	Adesão celular
<i>AKAP12</i>	Sinalização, adesão, multiplicação e diferenciação celular
<i>DAPK1</i>	Apoptose
<i>NELL1</i>	Regulação do crescimento celular
<i>SFRP1</i>	Inibição da via Wnt
<i>SST</i>	Regulação a nível gástrico da secreção endócrina e exócrina, modulação da atividade motora e inibição a produção de

	ácido clorídrico
<i>TAC1</i>	Anti-apoptose
<i>TIMP3</i>	Inibição da angiogénese, crescimento celular e invasão tecidual
Genes Hipometilados – Oncogenes	
<i>CXCL1</i>	
<i>CXCL3</i>	
<i>GATA6</i>	Proliferação celular
<i>DMBT1</i>	

Kaz *et al.* demonstrou existir um padrão de metilação desigual entre o epitélio normal do esófago e o EB. Encontrou também diferenças entre este último e os tecidos que apresentavam DAG e ACE. Nesta progressão, o autor verificou que existia um grau de hipermetilação cada vez mais acentuado. O seu estudo apoia a teoria da evolução clonal a partir de várias células progenitoras, pois evidencia uma heterogeneidade de padrões de metilação entre as várias células do mesmo tecido (68).

O gene *PI6*, cuja função já foi explorada, é encontrado frequentemente hipermetilado nas fases iniciais da sequência EB-ACE, e essa hipermetilação aumenta ao longo desta (1, 61, 80). Trata-se de um dos marcadores mais promissores (10). A metilação da sua região promotora resulta na inativação da sua função, o que leva a célula a multiplicar-se descontroladamente. Como este fenómeno ocorre ainda nas células do EB, mesmo sem displasia, este poderá ser um marcador com maior interesse diagnóstico do que como preditor de progressão neoplásica.

Quase todos os genes hipermetilados são genes supressores tumorais que regulam o ciclo celular (3). Além do *PI6*, outros como os genes *APC*, da proteína pRb e *REPRIMO* também estão hipermetilados no decorrer na transformação neoplásica do

EB (59). O valor plasmático do gene *APC* já se mostrou estar relacionado com menor sobrevida dos doentes com ACE (80, 81). O gene supressor tumoral REPRIMO, que é regulado pelo *P53*, está gradualmente mais metilado desde o EB à DAG e desta ao ACE (80, 81).

Uma particularidade interessante da epigenética é que o padrão de metilação e a sua gravidade variam consoante o tecido que se estuda. Por exemplo, o gene *APC* quando metilado no tecido esofágico não é normal, mas já no estômago ele ocorre com frequência, não sendo patológica (3).

As enzimas que são responsáveis pela reparação de regiões de ADN lesadas podem igualmente ser inativadas pela metilação dos seus genes (70). A metilação da região promotora do gene de *MGMT* ocorre precocemente no EB e a do de *MMR* é menos frequente (3, 59).

Outros genes, embora menos estudados, também podem servir como biomarcadores. É o caso dos genes: da glutationa-S-transferase (*GST*) e da glutationa peroxidase (*GPX*) que têm função anti-oxidante, inibindo o efeito oxidante e lesivo das ROS (3, 59, 80); *SOCS-1* e *3* que regulam negativamente a ação das citocinas e a ativação da via *STAT* (3, 59, 80); *CDH1* (59, 80) e *CDH13* (68, 80) que codificam formas da E-caderina responsáveis pela adesão célula a célula, e cujo silenciamento conduz à migração celular; *PKPI*, que permite a interação e adesão celular nos tecidos escamosos (82); *AKAP12* que é um gene supressor tumoral que controla a sinalização, adesão, multiplicação e diferenciação celular (3, 80); *DAPK1* que regula a morte celular e que ao estar inativado também proporciona uma maior invasão tumoral (3, 59, 80); *NELL1* que, sendo uma proteína cinase, regula o crescimento celular, sendo que a sua hipermetilação também está associada a menor sobrevida dos doentes com ACE (3, 80);

SFRP1 cuja proteína inibe a via carcinogénica Wnt (3, 68, 80); somatostatina (*SST*) que tem múltiplas funções no sistema gastrointestinal, como por exemplo, regular a secreção endócrina e exócrina, modular a atividade motora e inibir a produção de ácido gástrico (3, 80); *TAC1* cuja proteína parece ter efeitos anti-apoptóticos e multiplicativos (3, 80); *TIMP3* que inibe a angiogénese, o crescimento celular e a invasão tecidual e tem ação pró-apoptótica (3, 68, 80); e outros como os genes que codificam as proteínas *eye absent homolog 4* (68, 80), *alternate reading frame* (80), *runt-related transcription factor 3* (67, 80, 81), *hyperpigmentation, progressive, 1* (67, 80, 81), *telomerase reverse transcriptase* (80), *estrogen receptor 1* (68), *myoblast determination protein 1* (68). Todos estes genes parecem estar hipermetilados no EB-ACE, mas novos e mais rigorosos estudos têm que ser realizados para se provar o seu verdadeiro valor como preditores de risco (80, 81).

Um estudo realizado por Alvi *et al.* utilizou um conjunto de 4 genes metilados para prever o risco dos doentes desenvolverem ACE. Os genes foram o *Solute carrier family 22 member 18*, *Polymeric immunoglobulin receptor*, *Gap junction gamma-2* e *Ras and Rab interactor 2*. O conjunto mostrou ser gradualmente hipermetilado na progressão de EB até ACE e foi possível categorizar o risco em três grupos: pacientes com menos de 2 dos genes metilados eram considerados de baixo risco; 2 genes metilados eram considerados de risco intermédio e mais de 2 destes genes metilados faziam parte do grupo de alto risco (70), demonstrando a utilidade que os marcadores moleculares podem ter na identificação de pessoas em risco e no seu acompanhamento diferenciado.

Todavia, há genes que na sequência carcinogénica EB-ACE se apresentam hipometilados. Wu *et al.* demonstrou que a hipometilação, e não a hipermetilação, era o mecanismo epigenético preponderante nas fases iniciais da progressão neoplásica do EB (83), ocorrendo particularmente na transição metaplásica. A hipermetilação só surge nas

fases mais avançadas (3). Os genes hipometilados são menos estudados que os anteriores, mas não menos importantes. Correspondem, sobretudo, a genes que auxiliam na promoção do crescimento e multiplicação celulares (80, 83), ou seja, oncogenes, mas que também promovem a instabilidade genética (81, 83). Exemplos destes genes são: *chemokine (C-X-C motif) ligand 1* (CXCL1), *chemokine (C-X-C motif) ligand 3* (CXCL3), GATA6 e *deleted in malignant brain tumors 1* (DMBT1) (80). Alvarez *et al.* também descobriu que a hipometilação ocorria ainda nas primeiras células do EB formadas, isto é, numa fase inicial da sequência EB-ACE. Este autor também encontrou genes com padrão de metilação alterado fora das ilhas CpG, evidenciando possíveis novos marcadores de risco que até ainda não tinham sido explorados (81).

- **OS MICRORNAS**

Os MicroRNAs (miRNA) são moléculas não codificantes de ARN, constituídas por cerca de 18 a 24 nucleótidos (84, 85), que têm a função de regular negativamente a expressão de genes através da sua ligação ao ARN mensageiro deles resultante (86, 87). Estas moléculas já foram estudadas e a sua desregulação imputada a múltiplos cancros, por exercerem a sua ação em genes que têm as mais variadas funções celulares, de entre elas a sinalização, proliferação, apoptose e angiogénese (84, 85). Alguns deles vão atuar como supressores tumorais e outros como oncogenes, e a maior parte deles, nos tecidos tumorais, estão regulados negativamente (84, 85, 87). Assim, se alguns dos miRNA estiverem alterados, podem ter capacidade de se tornarem marcadores de diagnóstico, prognóstico, e de risco de desenvolvimento de carcinomas (88). Os miRNA que mais frequentemente se encontram alterados na progressão neoplásica do esófago de Barrett estão sintetizados na **Tabela 4**.

Feber *et al.* estudaram e mostraram pela primeira vez que existia um padrão distinto de expressão de miRNA no EB e no ACE, relativamente ao epitélio normal do esófago

(89). Entretanto, já muitos foram os autores que exploraram esta relação. Alguns marcadores já estão bem consolidados, embora ainda não em fase de uso clínico, enquanto outros ainda se encontram em exploração. Um estudo realizado por Yang *et al.* foi o mais promissor ao comparar a expressão de miRNA na DAG e no ACE com a sua expressão na DBG e no epitélio esofágico normal. Na sua análise foram utilizados 11 miRNA, e o autor concluiu que as principais alterações dos miRNA na sequência EB-ACE se dão, essencialmente, no momento de formação da DBG (86).

Um desses miRNA é o miRNA-21, que parece estar regulado positivamente no EB e ACE, comparativamente ao esôfago normal (84, 90). Funciona como oncogene (87) e as suas funções, quando ativado, são as de regular genes implicados na sobrevivência e multiplicação celulares, resistência à apoptose, migração e invasão celulares (84). Um dos genes que é inibido aquando da expressão elevada de miRNA-21 é o gene supressor tumoral, designado PTEN, que codifica a proteína *Phosphatase and tensin homolog* (87). O miRNA-21 vai igualmente inibir o gene da *Programmed Cell Death protein 4* (*PDCD4*) conferindo à célula um fenótipo resistente à apoptose (87, 90). Aliás, Fassan *et al.* demonstrou que o gene *PDCD4* perdia expressão, sobretudo, nas células com DAG e ACE, sugerindo que este, em vez do miRNA-21, pode ser um marcador de progressão (90). Todavia, em relação ao miRNA-21, embora pareça promissor em alguns estudos, Luzna *et al.* não verificou nenhuma disparidade significativa entre a sua expressão no EB e no epitélio escamoso do esôfago (91).

O miRNA-194 também parece encontrar-se elevado nas células do EB e ACE, sendo a sua expressão induzida pelo fator HNF-1 α que, como já referido, é produzido no EB. Além deste miRNA ter um papel na progressão metastática do ACE, também atua na fase metaplásica do EB, pois já se demonstrou que participa na diferenciação de células colunares intestinais (84, 87).

O miRNA-196a está também sobreexpresso no EB e ACE. Este tem como alvo o gene *Annexin A1* (*ANXA1*), inativando-o. O *ANXA1* é um gene com ação apoptótica, pelo que a sua inibição conduz à sobrevivência indefinida das células (89).

Streppel *et al.* encontrou 4 miRNA alterados no ACE em relação ao epitélio escamoso do esófago, mas foi o miRNA-223 que mais se realçou. Verificou-se que já se encontrava aumentado no fenótipo não displásico do EB e que não existiam diferenças em relação aos que desenvolviam ACE, pelo que pode ser uma forma de diagnosticar EB em relação ao epitélio escamoso, mas não à progressão para ACE (85).

O mesmo estudo conseguiu identificar dois genes-alvo da ação deste miRNA: *SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 1* (*SMARCD1*) e *Poly (ADP-ribose) polymerase 1* (*PARP1*), cuja inibição provocada pelo miRNA-223 conduz à desativação do *P53* e à incapacidade para reparar o ADN lesado, respetivamente. (85).

Como já referido, alguns miRNAs podem ter ação de genes supressores tumorais, como é o caso dos miRNA-143, 145 e 215. Todavia, estes, ao contrário dos anteriormente mencionados, vão estar silenciados no ACE. Os miRNA-143 e 145 são, fisiologicamente, indutores do processo apoptótico. O miRNA-143 inibe o oncogene *KRAS*, cuja falta de regulação no ACE pode desencadear a progressão neoplásica. Ainda regula a via do recetor *fas cell surface death receptor* (*FAS*), um recetor que faz parte da família dos TNF, e que estimula a apoptose. O miRNA-145 é regulado pelo *P53* e também induz a apoptose quando há lesão genética na célula. O miRNA-215 também é regulado pelo *P53*, permitindo a estagnação da célula no ciclo celular quando há danos celulares. A sua inativação, como ocorre no EB e no ACE, vai fazer com que as células se multipliquem indefinidamente (84, 87).

O miRNA-375, que já se mostrou reduzido nas células do ACE, já foi estudado como fator de prognóstico. Nguyen *et al.* concluiu que a redução dos níveis de miRNA-375, conjuntamente com um elevado nível de citocinas pró-inflamatórias, estava relacionada com uma menor sobrevida dos doentes (88).

Tabela 4 – **miRNA** alterados na progressão neoplásica do Esófago de Barrett.

ANXA1 – Annexin A1; FAS – Fas cell surface death receptor; miRNA – MicroRNAs; *PARP1* – Poly (ADP-ribose) polymerase 1; *PDCD4* – Programmed Cell Death protein 4; *PTEN* – Phosphatase and tensin homolog ; *SMARCD1* – SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 1.

	MiRNA	Genes em que atua	Resultado
Expressão aumentada	miRNA-21	<i>PTEN</i> e <i>PDCD4</i>	Multiplicação celular, resistência à apoptose, migração e invasão celular
	miRNA-194	–	Progressão metastática e menor diferenciação celular
	miRNA-196	<i>ANXA1</i>	Fenótipo anti-apoptótico
	miRNA-223	<i>SMARCD1</i> e <i>PARP1</i>	Inibição da ação de <i>P53</i>
Expressão diminuída	miRNA-143	<i>KRAS</i> e FAS	Fenótipo anti-apoptótico
	miRNA-145	–	Fenótipo anti-apoptótico
	miRNA-215	–	Multiplicação celular
	miRNA-375	–	Multiplicação celular
	miRNA-31	–	–

Leidner *et al.* quis apenas evidenciar miRNAs que distinguíssem o EB dos tecidos com DAG e ACE. Apenas dois cumpriam tal requisito: miRNA-31 e 375. Os dois mostravam redução da sua expressão nas células com DAG ou ACE. A explicação para

que o miRNA-31 seja perdido, é por este se situar na mesma região cromossômica do gene *P16* (9q), que tal como referido, é frequentemente sujeito a LOH. Quanto ao miRNA-375, com capacidade para suprimir o crescimento das células neoplásicas quando em valores normais, apenas estava reduzido nas células com ACE, confirmando os estudos já referidos de Nguyen. Estes dois miRNAs podem vir a constituir-se como biomarcadores de progressão neoplásica, já que apenas se modificam na transição de células não neoplásicas para células pré-neoplásicas e neoplásicas (92).

Tal como Streppel *et al.*, também Garman *et al.* só encontrou miRNA distintivos de EB relativamente ao epitélio escamoso, mas não de EB em relação ao ACE (93). Assim, a maior parte dos miRNAs altera-se na fase da transformação metaplásica (92), o que pode implicar que em vez de poderem ser usados como biomarcadores preditores dos doentes que progridem para neoplasia, devam ser usados como marcador de diagnóstico de EB, menos invasivo que a endoscopia e a biopsia.

CONCLUSÃO

A incidência do ACE tem vindo a sofrer um aumento dramático, em especial nos países ocidentais. O fator de risco *major* para o seu desenvolvimento é o EB, que requer múltiplas alterações moleculares para que se desenvolva ACE. O problema atual é a não existência de métodos que prevejam com eficácia quais os doentes que virão a desenvolver esta neoplasia. A deteção de biomarcadores seria uma forma simples, barata e eficaz de resolver o problema, mas para os identificar e validar têm que se conhecer os seus processos fisiopatológicos.

A identificação de fatores clínicos de risco para ACE é importante, na medida em que podem permitir distinguir e seguir com maior proximidade os indivíduos com

maior risco, e detetar mais precocemente os possíveis casos de cancro. A obesidade, em especial a central, o tabagismo e uma dieta rica em gorduras e pobre em legumes e fruta, parecem ser fatores extrínsecos que aumentam o risco de ACE. A raça caucasiana, o género masculino e a idade avançada, são, por sua vez, fatores intrínsecos e não modificáveis, que também conferem risco acrescido. O consumo de álcool e o nível sócio-económico não parecem conferir aumento de risco, e a infeção por *Helicobacter pylori* parece reduzi-lo.

Por outro lado, para ocorrer uma transformação do epitélio escamoso do esófago em colunar, é necessário haver uma transdiferenciação ou uma diferenciação de células estaminais, que podem ter diversas origens. O fator de transcrição Cdx-2 parece ser o mais importante na formação da metaplasia, mas outras moléculas têm que ser ativadas conjuntamente. Fatores de “intestinalização” como o MUC2, *villin*, *sucrase isomaltase*, entre outros, têm que ser expressos, e é o Cdx-2 que o permite, pela metilação das regiões promotoras destes genes. Muitos outros fatores atuam sinergicamente com o Cdx-2, para que se dê a transformação metaplásica: GATA-4 e HNF-1- α cooperam na expressão de fatores de transcrição intestinais; GATA-6 e outros membros da família HNF interagem com o Cdx-2; verifica-se uma repressão do gene P63; o fator NF-kB ativa a produção de citocinas pró-inflamatórias; a via de sinalização *Hedgehog* ativa o BMP4, que permite a manutenção do epitélio intestinal e a inibição da via *Notch*, para que se formem enterócitos e células caliciformes.

São os sais biliares que iniciam e promovem todos estes processos e a lesão do epitélio esofágico quando presentes em meio ácido.

Na transformação neoplásica do EB, a inflamação parece ter um papel preponderante, por vários mecanismos que induzem instabilidade genética e

encurtamento de telómeros. Este é um fenómeno crucial no desenvolvimento da neoplasia. A via IL-6/STAT3 ativada neste contexto, por produção parácrina e autócrina de IL-6 das células de EB transformadas, vai permitir a fuga das células à apoptose por aumentar a expressão da Mcl-1. Também ativa outras moléculas e genes como a survivina, VEGF, *C-MYC* e ciclina D1 e MMP, que regulam processos implicados na carcinogénese. A ativação de AID pelas citocinas inflamatórias também ajuda nesta transformação, por induzir mutações genéticas nas células. ROS, NO e prostaglandinas são também cruciais, bem como a redução de enzimas anti-oxidantes. Uma das fontes de produção de ROS, muito lesivas ao ADN, é a ativação do NF-kB. A NOX-5, isoforma de uma enzima que produz ROS, parece estar mais associada ao desenvolvimento de ACE e à displasia do que as outras isoformas. A produção de NO, que induz instabilidade genética por formação de *double strand breaks*, é mediada por várias sintetases (NOS), como por exemplo a *cytokine-inducible* (iNOS), ou pela redução de nitritos da cavidade oral. A enzima COX-2 está também envolvida no processo carcinogénico do EB. Ela produz prostaglandinas que induzem vias implicadas na carcinogénese, através da sua interação com os recetores EP1, EP2 e EP4, ou pode, diretamente, ativar a proteína Bcl-2, que conduz à resistência à apoptose.

As mutações genéticas encontradas nas células de EB com displasia e ACE podem constituir futuros biomarcadores. É o caso da LOH, mutações pontuais ou metilação alterada dos genes *P53* e *P16*, os mais frequentes no ACE. Enquanto o *P16* está alterado logo nas fases iniciais deste processo e confere uma vantagem proliferativa e de aquisição de mutações nas células, as mutações no *P53* surgem mais tardiamente. Na verdade, a LOH de *P53* é o marcador mais bem estudado e que parece conferir maior risco de desenvolvimento do ACE. Mutações nos genes de *APC*, *MGMT*, *MMR*, *NER*, *KRAS*, *EGFR*, *TOPOII α* , ciclina D1, E-caderina e β -catetina, podem igualmente

ser estudados para serem considerados biomarcadores. No entanto, ainda têm que ser realizados mais estudos para se perceber exatamente em que fase e como se formam estas mutações. Alterações na ploidia do ADN e a quantificação da diversidade clonal nos tecidos do EB são também outros possíveis biomarcadores, estando estes numa fase mais bem estudada que os anteriores. Contudo, o seu uso prático é dispendioso e exigente. Alterações epigenéticas e na expressão de miRNA também são frequentes nas células do EB e ACE, podendo estes vir também a ser biomarcadores, tal como as mutações. Nas fases iniciais da sequência EB-ACE a hipometilação genética predomina, sendo depois substituída pela hipermetilação no avançar do processo.

Apesar de todo este conhecimento, ainda muitos estudos são necessários para eleger o melhor marcador. Múltiplas técnicas de biologia molecular têm sido usadas e inúmeros estudos têm sido realizados, mas nenhum marcador tem, ainda, uso prático. Segundo a *Early Detection Research Network*, entidade norte-americana que se ocupa do desenvolvimento, avaliação e validação de biomarcadores para deteção precoce e avaliação do risco de cancro, praticamente todos os biomarcadores estudados para o ACE, estão na fase 3 e 4, isto é, em estudos retrospectivos e prospetivos, respetivamente. Ainda nenhum se encontra na fase 5, na qual se vai verificar o efeito da utilização do marcador na taxa de mortalidade e o seu custo-benefício (1, 70). Para que sejam aceites, esses biomarcadores terão que comprovadamente ser melhores do que os atuais métodos de diagnóstico e prognóstico utilizados.

O objetivo final pretendido, é que, no futuro, se consigam associar conjuntos de biomarcadores que predigam, com algum grau de certeza, quais os doentes em risco de desenvolver ACE

LISTA DE ACRÓNIMOS

ACE	Adenocarcinoma do Esófago
ADC	Acid deoxicólico
AID	<i>Activation-induced cytidine deaminase</i>
AINE	Anti-inflamatórios não esteroides
AMACR	<i>Alfa-methylacyl coenzyme A racemase</i>
ANXA1	<i>Annexin A1 gene</i>
AOL	<i>Aspergillus oryzae lectin</i>
ATC	Ácido taurocólico
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2 protein</i>
BMP4	<i>Bone morphogenic protein 4</i>
Cdx2	<i>Caudal-related homologue 2</i>
CXCL1	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
CXCL3	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 3 (CXCL3)</i>
COX-2	Cicloxygenase-2
DAG	Displasia de alto grau
DBG	Displasia de baixo grau
DMBT1	<i>Deleted in malignant brain tumors 1</i>
DRGE	Doença do Refluxo Gastro-esofágico
EB	Esófago de Barrett
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
FAS	<i>Fas cell surface death receptor</i>
FISH	<i>Fluorescence in-situ hybridization</i>
FHIT	<i>Fragile histidine triad</i>
GATA	<i>GATA binding protein</i>

GPX	Glutathione peroxidase
GST	Glutathione-S-transferase
HIF-1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
HNF	<i>Hepatocyte nuclear factor</i>
IBP	Inibidores da bomba de protões
IGF	Fatores de crescimento insulina- <i>like</i>
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
JAK	<i>Janus Kinase</i>
iNOS	Forma induzível da sintetase do óxido nítrico
K20	<i>Cytokeratin 20</i>
LgR5	<i>Leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5</i>
LOH	Perda de heterozigotia
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Mcl-1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1</i>
MGMT	<i>O⁶methyl-guanine methyltransferase</i>
miRNA	MicroRNAs
MMP	Metaloproteinases
MMR	<i>Mismatch Repair System</i>
Muc2	<i>Mucin 2</i>
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
NO	Óxido nítrico
Notch	<i>Notch pathway</i>
PARP1	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase 1</i>
PDCD4	<i>Programmed cell death 4</i>

RAS	<i>Rat sarcoma</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SHH	<i>Sonic Hedgehod</i>
SI	<i>Sucrase isomaltase</i>
SMARCD1	<i>SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 1</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TFF3	<i>Intestinal trefoil factor</i>
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
VEGF	<i>Vascular endotelial growth factor</i>
Wnt	<i>Wingless-related integration site pathway</i>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Timmer MR, Sun G, Gorospe EC, Leggett CL, Lutzke L, Krishnadath KK, et al. Predictive biomarkers for Barrett's esophagus: so near and yet so far. *Dis Esophagus*. 2013;26(6):574-81.
2. Oh DS, Demeester SR. Pathophysiology and treatment of Barrett's esophagus. *World J Gastroenterol*. 2010;16(30):3762-72.
3. Agarwal A, Polineni R, Hussein Z, Vigoda I, Bhagat TD, Bhattacharyya S, et al. Role of epigenetic alterations in the pathogenesis of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;5(5):382-96.

4. di Pietro M, Fitzgerald RC. Barrett's oesophagus: an ideal model to study cancer genetics. *Hum Genet.* 2009;126(2):233-46.
5. Fitzgerald RC, di Pietro M, Ragnath K, Ang Y, Kang JY, Watson P, et al. British Society of Gastroenterology guidelines on the diagnosis and management of Barrett's oesophagus. *Gut.* 2014;63(1):7-42.
6. Conteduca V, Sansonno D, Ingravallo G, Marangi S, Russi S, Lauletta G, et al. Barrett's esophagus and esophageal cancer: an overview. *Int J Oncol.* 2012;41(2):414-24.
7. Reid BJ, Li X, Galipeau PC, Vaughan TL. Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: time for a new synthesis. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(2):87-101.
8. Chen H, Fang Y, Tevebaugh W, Orlando RC, Shaheen NJ, Chen X. Molecular mechanisms of Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci.* 2011;56(12):3405-20.
9. Wang DH, Souza RF. Biology of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2011;21(1):25-38.
10. Prasad GA, Bansal A, Sharma P, Wang KK. Predictors of progression in Barrett's esophagus: current knowledge and future directions. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(7):1490-502.

11. Russo A, Bronte G, Cabibi D, Bazan V, Cicero G, Bertani A, et al. The molecular changes driving the carcinogenesis in Barrett's esophagus: which came first, the chicken or the egg? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;86(3):278-89.
12. Kubo A, Cook MB, Shaheen NJ, Vaughan TL, Whiteman DC, Murray L, et al. Sex-specific associations between body mass index, waist circumference and the risk of Barrett's oesophagus: a pooled analysis from the international BEACON consortium. *Gut*. 2013;62(12):1684-91.
13. Steevens J, Schouten LJ, Driessen AL, Huysentruyt CJ, Keulemans YC, Goldbohm RA, et al. A prospective cohort study on overweight, smoking, alcohol consumption, and risk of Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20(2):345-58.
14. Sharp L, Carsin AE, Cantwell MM, Anderson LA, Murray LJ. Intakes of dietary folate and other B vitamins are associated with risks of esophageal adenocarcinoma, Barrett's esophagus, and reflux esophagitis. *J Nutr*. 2013;143(12):1966-73.
15. Hardikar S, Onstad L, Blount PL, Odze RD, Reid BJ, Vaughan TL. The role of tobacco, alcohol, and obesity in neoplastic progression to esophageal adenocarcinoma: a prospective study of Barrett's esophagus. *PLoS One*. 2013;8(1):e52192.
16. Chandra S, Gorospe EC, Leggett CL, Wang KK. Barrett's esophagus in 2012: updates in pathogenesis, treatment, and surveillance. *Curr Gastroenterol Rep*. 2013;15(5):322.

17. Jankowski Janusz BH, Wang Ken, Delaney Brendan. Diagnosis and management of Barrett's oesophagus. *BMJ*2010. p. c4551.
18. Wiseman EF, Ang YS. Risk factors for neoplastic progression in Barrett's esophagus. *World J Gastroenterol.* 2011;17(32):3672-83.
19. Lepage C, Drouillard A, Jouve JL, Faivre J. Epidemiology and risk factors for oesophageal adenocarcinoma. *Dig Liver Dis.* 2013;45(8):625-9.
20. Edelstein ZR, Bronner MP, Rosen SN, Vaughan TL. Risk factors for Barrett's esophagus among patients with gastroesophageal reflux disease: A community clinic-based case-control study. *Am J Gastroenterol.*; 2009. p. 834-42.
21. Villanacci V, Bassotti G, Salemm M, Rossi E. Influence of genetics on tumoral pathologies: the example of the adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus. *Rev Esp Enferm Dig.* 2012;104(11):592-602.
22. Coleman HG, Bhat S, Johnston BT, McManus D, Gavin AT, Murray LJ. Tobacco smoking increases the risk of high-grade dysplasia and cancer among patients with Barrett's esophagus. *Gastroenterology.* 2012;142(2):233-40.
23. Cook MB, Shaheen NJ, Anderson LA, Giffen C, Chow WH, Vaughan TL, et al. Cigarette smoking increases risk of Barrett's esophagus: an analysis of the Barrett's and Esophageal Adenocarcinoma Consortium. *Gastroenterology.* 2012;142(4):744-53.
24. Shaheen NJ, E RJ. Barrett's oesophagus. *The Lancet*; 2009. p. 850-9.

25. Liu FX, Wang WH, Wang J, Li J, Gao PP. Effect of *Helicobacter pylori* infection on Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma formation in a rat model of chronic gastroesophageal reflux. *Helicobacter*. 2011;16(1):66-77.
26. Jiao L, Kramer JR, Rugge M, Parente P, Verstovsek G, Alsarraj A, et al. Dietary intake of vegetables, folate, and antioxidants and the risk of Barrett's esophagus. *Cancer Causes Control*. 2013;24(5):1005-14.
27. Ibiebele TI, Hughes MC, Nagle CM, Bain CJ, Whiteman DC, Webb PM. Dietary antioxidants and risk of Barrett's esophagus and adenocarcinoma of the esophagus in an Australian population. *Int J Cancer*. 2013;133(1):214-24.
28. Keszei AP, Schouten LJ, Driessen AL, Huysentruyt CJ, Keulemans YC, van den Brandt PA. Meat consumption and the risk of Barrett's esophagus in a large Dutch cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22(6):1162-6.
29. O'Doherty MG, Cantwell MM, Murray LJ, Anderson LA, Abnet CC. Dietary fat and meat intakes and risk of reflux esophagitis, Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2011;129(6):1493-502.
30. O'Doherty MG, Abnet CC, Murray LJ, Woodside JV, Anderson LA, Brockman JD, et al. Iron intake and markers of iron status and risk of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Cancer Causes Control*. 2010;21(12):2269-79.

31. Quante M, Bhagat G, Abrams JA, Marache F, Good P, Lee MD, et al. Bile acid and inflammation activate gastric cardia stem cells in a mouse model of Barrett-like metaplasia. *Cancer Cell*. 2012;21(1):36-51.
32. Collepriest BJ, Farrant JM, Slack JM, Tosh D. The role of Cdx2 in Barrett's metaplasia. *Biochem Soc Trans*. 2010;38(2):364-9.
33. Dvorak K, Goldman A, Kong J, Lynch JP, Hutchinson L, Houghton JM, et al. Molecular mechanisms of Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1232:381-91.
34. von Rahden BH, Kircher S, Lazariotou M, Reiber C, Stuermer L, Otto C, et al. Lgr5 expression and cancer stem cell hypothesis: clue to define the true origin of esophageal adenocarcinomas with and without Barrett's esophagus? *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30:23.
35. Becker L, Huang Q, Mashimo H. Lgr5, an intestinal stem cell marker, is abnormally expressed in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Dis Esophagus*. 2010;23(2):168-74.
36. Bobryshev YV, Freeman AK, Botelho NK, Tran D, Levert-Mignon AJ, Lord RV. Expression of the putative stem cell marker Musashi-1 in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Dis Esophagus*. 2010;23(7):580-9.
37. Vega KJ, May R, Sureban SM, Lightfoot SA, Qu D, Reed A, et al. Identification of the putative intestinal stem cell marker doublecortin and CaM kinase-like-1 in

Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27(4):773-80.

38. Peters JH, Avisar N. The molecular pathogenesis of Barrett's esophagus: common signaling pathways in embryogenesis metaplasia and neoplasia. *J Gastrointest Surg.* 2010;14 Suppl 1:S81-7.

39. di Pietro M, Lao-Sirieix P, Boyle S, Cassidy A, Castillo D, Saadi A, et al. Evidence for a functional role of epigenetically regulated midcluster HOXB genes in the development of Barrett esophagus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(23):9077-82.

40. Vaninetti N, Williams L, Geldenhuys L, Porter GA, Guernsey DL, Casson AG. Regulation of CDX2 expression in esophageal adenocarcinoma. *Mol Carcinog.* 2009;48(10):965-74.

41. Makita K, Kitazawa R, Semba S, Fujiishi K, Nakagawa M, Haraguchi R, et al. Cdx2 expression and its promoter methylation during metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in Barrett's esophagus. *World J Gastroenterol.* 2013;19(4):536-41.

42. Matsuzaki J, Suzuki H, Tsugawa H, Watanabe M, Hossain S, Arai E, et al. Bile acids increase levels of microRNAs 221 and 222, leading to degradation of CDX2 during esophageal carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2013;145(6):1300-11.

43. Benoit YD, Parré F, Francoeur C, Jean D, Treamblay E, Boudreau F, et al. Cooperation between HNF-1 α , Cdx2, and GATA-4 in initiating an enterocytic

differentiation program in a normal human intestinal epithelial progenitor cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010. p. 504-17.

44. Green NH, Nicholls Z, Heath PR, Cooper-Knock J, Corfe BM, MacNeil S, et al. Pulsatile exposure to simulated reflux leads to changes in gene expression in a 3D model of oesophageal mucosa. *Int J Exp Pathol*. 2014;95(3):216-28.

45. Cronin J, Williams L, McAdam E, Eltahir Z, Griffiths P, Baxter J, et al. The role of secondary bile acids in neoplastic development in the oesophagus. *Biochem Soc Trans*. 2010;38(2):337-42.

46. Nassr AO, Gilani SN, Atie M, Abdelhafiz T, Connolly V, Hickey N, et al. Does impaired gallbladder function contribute to the development of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma? *J Gastrointest Surg*. 2011;15(6):908-14.

47. Cheng P, Li JS, Zhang LF, Chen YZ, Gong J. Exposure to gastric juice may not cause adenocarcinogenesis of the esophagus. *World J Gastroenterol*. 2013;19(15):2419-24.

48. Wang JS, Varro A, Lightdale CJ, Lertkowitz N, Slack KN, Fingerhood ML, et al. Elevated serum gastrin is associated with a history of advanced neoplasia in Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(5):1039-45.

49. Burnat G, Majka J, Konturek PC. Bile acids are multifunctional modulators of the Barrett's carcinogenesis. *J Physiol Pharmacol*. 2010;61(2):185-92.

50. Goldman A, Chen HD, Roesly HB, Hill KA, Tome ME, Dvorak B, et al. Characterization of squamous esophageal cells resistant to bile acids at acidic pH: implication for Barrett's esophagus pathogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300(2):G292-302.
51. Milind R, Attwood SE. Natural history of Barrett's esophagus. *World J Gastroenterol.* 2012;18(27):3483-91.
52. Kastelein F, Biermann K, Steyerberg EW, Verheij J, Kalisvaart M, Looijenga LH, et al. Aberrant p53 protein expression is associated with an increased risk of neoplastic progression in patients with Barrett's oesophagus. *Gut.* 2013;62(12):1676-83.
53. Reid BJ. Early events during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Cancer Biomark.* 2010;9(1-6):307-24.
54. Zhang HY, Zhang Q, Zhang X, Yu C, Huo X, Cheng E, et al. Cancer-related inflammation and Barrett's carcinogenesis: interleukin-6 and STAT3 mediate apoptotic resistance in transformed Barrett's cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300(3):G454-60.
55. Abdel-Latif MM, Duggan S, Reynolds JV, Kelleher D. Inflammation and esophageal carcinogenesis. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(4):396-404.
56. Dvorak K, Dvorak B. Role of interleukin-6 in Barrett's esophagus pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2013;19(15):2307-12.

57. Collepriest BJ, Ward SG, Tosh D. How does inflammation cause Barrett's metaplasia? *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(6):721-6.
58. Kavanagh ME, O'Sullivan KE, O'Hanlon C, O'Sullivan JN, Lysaght J, Reynolds JV. The esophagitis to adenocarcinoma sequence; the role of inflammation. *Cancer Lett.* 2014;345(2):182-9.
59. Poehlmann A, Kuester D, Malfertheiner P, Guenther T, Roessner A. Inflammation and Barrett's carcinogenesis. *Pathol Res Pract.* 2012;208(5):269-80.
60. Morita S, Matsumoto Y, Okuyama S, Ono K, Kitamura Y, Tomori A, et al. Bile acid-induced expression of activation-induced cytidine deaminase during the development of Barrett's oesophageal adenocarcinoma. *Carcinogenesis.* 2011;32(11):1706-12.
61. Fang D, Das KM, Cao W, Malhotra U, Triadafilopoulos G, Najarian RM, et al. Barrett's esophagus: progression to adenocarcinoma and markers. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1232:210-29.
62. Zhou X, Li D, Resnick MB, Wands J, Cao W. NADPH oxidase NOX5-S and nuclear factor kappaB1 mediate acid-induced microsomal prostaglandin E synthase-1 expression in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells. *Mol Pharmacol.* 2013;83(5):978-90.
63. Majka J, Rembiesz K, Migaczewski M, Budzynski A, Ptak-Belowska A, Pabianczyk R, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is the key event in pathophysiology of

Barrett's esophagus. Lesson from experimental animal model and human subjects. *J Physiol Pharmacol*. 2010;61(4):409-18.

64. Jimenez P, Piazuolo E, Cebrian C, Ortego J, Strunk M, Garcia-Gonzalez MA, et al. Prostaglandin EP2 receptor expression is increased in Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;31(3):440-51.

65. Sonoda R, Naomoto Y, Shirakawa Y, Fujiwara Y, Yamatsuji T, Noma K, et al. Preferential up-regulation of heparanase and cyclooxygenase-2 in carcinogenesis of Barrett's oesophagus and intestinal-type gastric carcinoma. *Histopathology*. 2010;57(1):90-100.

66. Feng W, Zhou Z, Peters JH, Khoury T, Zhai Q, Wei Q, et al. Expression of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 in human esophageal adenocarcinoma and its precursor lesions. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(8):1024-31.

67. Graham TA, McDonald SA. Genetic diversity during the development of Barrett's oesophagus-associated adenocarcinoma: how, when and why? *Biochem Soc Trans*. 2010;38(2):374-9.

68. Kaz AM, Wong CJ, Luo Y, Virgin JB, Washington MK, Willis JE, et al. DNA methylation profiling in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma reveals unique methylation signatures and molecular subclasses. *Epigenetics*. 2011;6(12):1403-12.

69. Pretto G, Gurski RR, Binato M, Navarini D, Aguiar WW, Meurer L. Increase of epidermal growth factor receptor expression in progression of GERD, Barrett, and adenocarcinoma of esophagus. *Dig Dis Sci*. 2013;58(1):115-22.
70. Fels Elliott DR, Fitzgerald RC. Molecular markers for Barrett's esophagus and its progression to cancer. *Curr Opin Gastroenterol*. 2013;29(4):437-45.
71. Fassan M, Mastracci L, Grillo F, Zagonel V, Bruno S, Battaglia G, et al. Early HER2 dysregulation in gastric and oesophageal carcinogenesis. *Histopathology*. 2012;61(5):769-76.
72. Schoppmann SF, Jesch B, Friedrich J, Wrba F, Schultheis A, Pluschnig U, et al. Expression of Her-2 in carcinomas of the esophagus. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(12):1868-73.
73. Rossi E, Villanacci V, Bassotti G, Donato F, Festa A, Cengia G, et al. TOPOIIalpha and HER-2/neu overexpression/amplification in Barrett's oesophagus, dysplasia and adenocarcinoma. *Histopathology*. 2010;57(1):81-9.
74. Akagi T, Ito T, Kato M, Jin Z, Cheng Y, Kan T, et al. Chromosomal abnormalities and novel disease-related regions in progression from Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2009;125(10):2349-59.
75. Kastelein F, Biermann K, Steyerberg EW, Verheij J, Kalisvaart M, Looijenga LH, et al. Value of alpha-methylacyl-CoA racemase immunochemistry for predicting neoplastic progression in Barrett's oesophagus. *Histopathology*. 2013;63(5):630-9.

76. Bird-Lieberman EL, Dunn JM, Coleman HG, Lao-Sirieix P, Oukrif D, Moore CE, et al. Population-based study reveals new risk-stratification biomarker panel for Barrett's esophagus. *Gastroenterology*. 2012;143(4):927-35.e3.
77. Merlo LM, Shah NA, Li X, Blount PL, Vaughan TL, Reid BJ, et al. A comprehensive survey of clonal diversity measures in Barrett's esophagus as biomarkers of progression to esophageal adenocarcinoma. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3(11):1388-97.
78. Wang J, Shi X, Johnson RH, Kelbauskas L, Zhang W, Meldrum DR. Single-cell analysis reveals early manifestation of cancerous phenotype in pre-malignant esophageal cells. *PLoS One*. 2013;8(10):e75365.
79. Lee S, Han MJ, Lee KS, Back SC, Hwang D, Kim HY, et al. Frequent occurrence of mitochondrial DNA mutations in Barrett's metaplasia without the presence of dysplasia. *PLoS One*. 2012;7(5):e37571.
80. Kaz AM, Grady WM. Epigenetic biomarkers in esophageal cancer. *Cancer Lett*. 2014;342(2):193-9.
81. Alvarez H, Opalinska J, Zhou L, Sohal D, Fazzari MJ, Yu Y, et al. Widespread hypomethylation occurs early and synergizes with gene amplification during esophageal carcinogenesis. *PLoS Genet*. 2011;7(3):e1001356.

82. Kaz AM, Luo Y, Dzieciatkowski S, Chak A, Willis JE, Upton MP, et al. Aberrantly methylated PKP1 in the progression of Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(4):384-93.
83. Wu W, Bhagat TD, Yang X, Song JH, Cheng Y, Agarwal R, et al. Hypomethylation of noncoding DNA regions and overexpression of the long noncoding RNA, AFAP1-AS1, in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 2013;144(5):956-66.e4.
84. Smith CM, Watson DI, Michael MZ, Hussey DJ. MicroRNAs, development of Barrett's esophagus, and progression to esophageal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2010;16(5):531-7.
85. Streppel MM, Pai S, Campbell NR, Hu C, Yabuuchi S, Canto MI, et al. MicroRNA 223 is upregulated in the multistep progression of Barrett's esophagus and modulates sensitivity to chemotherapy by targeting PARP1. *Clin Cancer Res*. 2013;19(15):4067-78.
86. Yang H, Gu J, Wang KK, Zhang W, Xing J, Chen Z, et al. MicroRNA expression signatures in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15(18):5744-52.
87. Wijnhoven BP, Hussey DJ, Watson DI, Tsykin A, Smith CM, Michael MZ. MicroRNA profiling of Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *Br J Surg*. 2010;97(6):853-61.

88. Nguyen GH, Schetter AJ, Chou DB, Bowman ED, Zhao R, Hawkes JE, et al. Inflammatory and microRNA gene expression as prognostic classifier of Barrett's-associated esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2010;16(23):5824-34.
89. Kan T, Meltzer SJ. MicroRNAs in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(6):727-32.
90. Fassan M, Pizzi M, Battaglia G, Giacomelli L, Parente P, Bocus P, et al. Programmed cell death 4 (PDCD4) expression during multistep Barrett's carcinogenesis. *J Clin Pathol.* 2010;63(8):692-6.
91. Luzna P, Gregar J, Uberall I, Radova L, Prochazka V, Ehrmann J, Jr. Changes of microRNAs-192, 196a and 203 correlate with Barrett's esophagus diagnosis and its progression compared to normal healthy individuals. *Diagn Pathol.* 2011;6:114.
92. Leidner RS, Ravi L, Leahy P, Chen Y, Bednarchik B, Streppel M, et al. The microRNAs, MiR-31 and MiR-375, as candidate markers in Barrett's esophageal carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer.* 2012;51(5):473-9.
93. Garman KS, Owzar K, Hauser ER, Westfall K, Anderson BR, Souza RF, et al. MicroRNA expression differentiates squamous epithelium from Barrett's esophagus and esophageal cancer. *Dig Dis Sci.* 2013;58(11):3178-88.