



Original

## El fenotipo de las mucinas en el esófago de Barrett

Julio Torrado<sup>a</sup>, María Blanca Piazuelo<sup>b</sup>, Irune Ruiz<sup>c</sup>, María Isabel Izarzugaza<sup>d</sup>, María Constanza Camargo<sup>b</sup>, Alberto Delgado<sup>b</sup>, Afshin Abdirad<sup>e</sup> y Pelayo Correa<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Qepd, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Aránzazu, San Sebastián, España

<sup>b</sup> Departamento de Medicina, División de Gastroenterología, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, EE.UU

<sup>c</sup> Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Aránzazu, San Sebastián, España

<sup>d</sup> Departamento de Sanidad, Vitoria-Gasteiz, España

<sup>e</sup> Departamento de Patología, Universidad de Teherán, Teherán, Irán

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 1 de marzo de 2009

Aceptado el 5 de abril de 2009

On-line el 7 de marzo de 2010

#### Palabras clave:

Esófago de Barrett

Mucinas

MUC2

MUC5AC

MUC6

### RESUMEN

**Antecedentes:** El esófago de Barrett es una reconocida lesión precursora de adenocarcinoma esofágico. Aunque generalmente asociada al reflujo gastroesofágico, los mecanismos patogénicos de la enfermedad no son bien conocidos. El objetivo del presente estudio es explorar la historia natural e identificar marcadores de progreso del proceso precanceroso.

**Material y métodos:** Se utilizaron cortes histológicos de 67 especímenes de esófago correspondientes a 14 pacientes con esófago de Barrett, a los que se siguió entre 1 – 9 años. Se clasificaron las lesiones en: esófago de Barrett sin displasia, indefinido para displasia o con displasia. Se evaluó la expresión de diferentes mucinas en las células caliciformes y en las columnares usando técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica.

**Resultados:** En todos los casos se comprobó la presencia de metaplasia intestinal incompleta. Las células columnares dentro del epitelio metaplásico contenían mucinas neutras. A mayor severidad de la lesión se encontró significativamente menor expresión de sialomucinas en las células columnares ( $p$  de tendencia igual a 0,03). En sujetos con lesiones indefinidas para displasia se observó un mayor contenido de sulfomucinas en las células caliciformes ( $p=0,034$ ) y de MUC2 en las células columnares ( $p=0,029$ ) que en sujetos con esófago de Barrett sin displasia. Se observó expresión de la mucina intestinal MUC2 y de la mucina gástrica MUC5AC en todas las muestras. MUC6, una mucina de las glándulas profundas gástricas, se presentó ocasionalmente.

**Conclusión:** La evaluación de los perfiles de mucinas en el esófago de Barrett sugiere una transición gradual del fenotipo del epitelio metaplásico a medida que la lesión avanza en el tiempo.

© 2009 SEAP y SEC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Mucin phenotypes in Barrett's esophagus

### ABSTRACT

**Background:** Barrett's esophagus is a known precursor lesion of esophageal adenocarcinoma. Although it is generally associated with gastroesophageal reflux, the pathogenic mechanisms of the disease are not well understood. The aim of this study was to explore the natural history and to identify markers of progression of the precancerous process.

**Material and methods:** Histological sections of 67 esophageal specimens were used in this study. They were obtained from 14 subjects with Barrett's esophagus who were followed from 1 to 9 years. The lesions were histologically classified as: Barrett's esophagus without dysplasia, indefinite for dysplasia, or dysplasia. Expression of various mucins in goblet and columnar cells was assessed by histochemistry and immunohistochemistry.

**Results:** Incomplete intestinal metaplasia was observed in all the specimens. Columnar cells within the metaplastic epithelium expressed neutral mucins. Sialomucins were significantly less expressed in columnar cells as the lesions increased in severity ( $p$  trend=0.03). Subjects with indefinite dysplasia lesions had significantly higher expression of sulphomucins in goblet cells ( $p=0.034$ ) and of MUC2 in columnar cells ( $p=0.029$ ) than subjects with Barrett's esophagus without dysplasia. Expression of the intestinal mucin MUC2 and gastric mucin MUC5AC was observed in all specimens. MUC6, a mucin of the deep gastric glands, was occasionally expressed.

**Conclusion:** The evaluation of the mucin profiles in Barrett's esophagus suggests a gradual transition of the metaplastic epithelium phenotype as the lesion advances in time.

© 2009 SEAP y SEC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

#### Keywords:

Barrett's esophagus

Mucins

MUC2

MUC5AC

MUC6

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: pelayo.correa@vanderbilt.edu (P. Correa).

## Introducción

En 1950, Barrett publicó sus observaciones en un paciente con esofagitis crónica y presencia de epitelio columnar reemplazando el epitelio escamoso en la mucosa esofágica<sup>1</sup>. Este hallazgo fue confirmado en 1953 y atribuido al reflujo gastroesofágico crónico por Allison y Johnstone<sup>2</sup>, y posteriormente por muchos otros autores. En la década de los setenta se reconoció la asociación entre esófago de Barrett (EB) y adenocarcinoma esofágico<sup>3,4</sup>. Este tema ha adquirido considerable importancia, especialmente por el incremento de los diagnósticos de EB<sup>5,6</sup> y del adenocarcinoma del esófago distal, especialmente en poblaciones de Europa occidental y Norteamérica<sup>7,8</sup>.

Las causas y los mecanismos patogénicos de estos cambios observados en décadas recientes no son bien conocidos, y han dado lugar a interpretaciones controvertidas. Aunque la presencia congénita de islotes de epitelio glandular en el esófago es generalmente aceptada, especialmente en los tercios proximal y medio, existe consenso en considerar el EB como una lesión adquirida, generalmente ligada al reflujo gastroesofágico crónico<sup>9</sup>. Algunos investigadores han sugerido que el aumento de la incidencia de EB, y por ende del adenocarcinoma esofágico, es una consecuencia de la decreciente frecuencia de la infección gástrica por *Helicobacter pylori*, con el consiguiente aumento de la secreción ácido-péptica<sup>10,11</sup>.

La definición de EB ha ido cambiando a través del tiempo. La descripción inicial de Barrett se refería simplemente a la presencia de epitelio columnar en la mucosa esofágica. Paull et al<sup>12</sup> reconocieron la presencia de tres tipos histológicos de epitelio columnar proximal al esfínter esofágico inferior: a) el tipo gástrico fúndico, con presencia de glándulas con células parietales y principales; b) el tipo especializado (intestinal) con enterocitos con microvellosidades y células caliciformes y c) el tipo de unión (junctional), con glándulas típicas del cardias. El *American College of Gastroenterology* ha adoptado la idea de que la presencia de células caliciformes en el epitelio columnar metaplásico es un requisito indispensable para diagnosticar EB<sup>13</sup>. Sin embargo, no hay un acuerdo universal acerca de la inclusión de metaplasia intestinal como criterio indispensable para su diagnóstico. La *British Society of Gastroenterology* no exige la presencia de metaplasia intestinal como requisito para diagnosticar EB, el cual es definido como: «esófago en el que cualquier porción del epitelio escamoso normal ha sido reemplazado por epitelio columnar metaplásico, que es visible macroscópicamente»<sup>14</sup>. La exigencia de la presencia de células caliciformes para diagnosticar EB no concuerda con las descripciones originales de Barrett y otros autores; y ha sido propuesta con un criterio puramente pragmático para evitar clasificar a los pacientes como portadores de una lesión precancerosa que requeriría un seguimiento endoscópico prolongado. Las primeras definiciones reconocían la complejidad del proceso de transformación de un epitelio escamoso en glandular. Este trabajo trata de explorar dicho proceso, utilizando biopsias esofágicas de pacientes con diagnóstico de EB que fueron recogidas durante un seguimiento endoscópico en San Sebastián, España.

Histológicamente, las lesiones en el EB se clasifican como: negativas para displasia, indefinidas para displasia o positivas para displasia (que a su vez se clasifican en displasias de bajo o alto grado). En los Estados Unidos de América, el sistema más utilizado para la clasificación de displasia en el EB es el descrito en 1983 para la displasia en la enfermedad inflamatoria del colon<sup>15,16</sup>. Un sistema similar es la Clasificación Internacional de Padova para las displasias gástricas, propuesta en el año 2000<sup>17</sup>. En esta clasificación se incluyen los términos hiperproliferación foveolar y metaplasia intestinal hiperproliferativa dentro de la categoría «indefinida para displasia», y se acepta el término

neoplasia no invasiva» como sinónimo de displasia. Otro sistema similar utilizado en algunos países europeos es la clasificación de Viena para la neoplasia epitelial gastrointestinal<sup>18</sup>.

En un estudio anterior realizado en pacientes con adenocarcinoma esofágico diagnosticados en el Hospital Aránzazu en San Sebastián (España), se describió la metaplasia intestinal incompleta y, además, la presencia de elementos con características de mucosa gástrica en la mucosa esofágica<sup>19</sup>. La experiencia reflejada en la literatura médica indica que el proceso precanceroso es muy prolongado, durando en general más de una década<sup>19</sup>. Nuestra hipótesis postula que la transformación del epitelio glandular benigno en un tipo premaligno o maligno (displasia o carcinoma) es gradual y está representada por cambios en el fenotipo del epitelio glandular. Puesto que las mucinas representan el principal producto de las glándulas gastrointestinales, nos hemos concentrado en su estudio como posibles marcadores del progreso del proceso precanceroso.

## Material y métodos

### Tejidos e histoquímica

El material histopatológico utilizado para este artículo forma parte del material recogido por el Dr. Julio Torrado en el Hospital Aránzazu de San Sebastián, con la intención de documentar los cambios temporales y buscar marcadores de progreso del proceso precanceroso en el EB. El material evaluado consta de 67 especímenes (cortes histológicos de bloques de parafina de 65 biopsias esofágicas y dos resecciones quirúrgicas) provenientes de 14 pacientes con diagnóstico de EB y seguimiento endoscópico en distintas fechas entre 1988 y 2004. Además de las tinciones de hematoxilina-eosina (HE), se hizo énfasis en el estudio de las mucinas. Con HE se identificó la presencia de metaplasia intestinal completa (caracterizada por enterocitos con microvellosidades o borde en cepillo) e incompleta (células con vacuolas citoplasmáticas irregulares y de tamaño variable, sin evidencia de borde en cepillo). Se registró el porcentaje de metaplasia de tipo incompleto en el área total de metaplasia intestinal observada en cada espécimen. Para la evaluación de displasia, se utilizó la clasificación de Padova: a) ausencia de displasia; b) indefinido para displasia; c) displasia de bajo grado y e) displasia de alto grado<sup>17</sup>. Para el diagnóstico histológico, todos los especímenes con algún grado de displasia fueron evaluados inicialmente por tres patólogos (JT, IR y MBP), y posteriormente por otros dos patólogos (PC y AA). Los diagnósticos dudosos o discrepantes se resolvieron por consenso después de reevaluar las secciones histológicas.

Para la evaluación histoquímica de las mucinas se usó la tinción de ácido periódico de Schiff (*periodic acid Schiff* [PAS]) y azul Alcian, a pH 2,5<sup>20</sup>, que identifica las mucinas neutras gástricas de color rosa-magenta con el PAS y las mucinas intestinales ácidas con el azul Alcian. Para distinguir los dos tipos clásicos de mucinas ácidas usamos la coloración de azul Alcian y diamina con alto contenido de hierro (*high iron diamine* [HID])<sup>21</sup>, que tiñe las sialomucinas en azul y las sulfomucinas en marrón. Se evaluó de forma semicuantitativa la presencia de mucinas neutras, sialomucinas y sulfomucinas por separado en células caliciformes y columnares, y se registró como porcentaje de células positivas para cada marcador.

### Immunohistoquímica

Los cortes histológicos fueron procesados con anticuerpos monoclonales para detección de MUC2, MUC5AC y MUC6 (laboratorios Novocastra, Burlingame, CA, EE.UU.). Después de calentar las laminillas a 37 °C durante toda la noche, los tejidos se

desparafinaron con xilol y se rehidrataron en alcoholes de gradación decreciente (etanol 100 y 95%, dos y tres cambios, respectivamente, de 3 min cada uno). Se hizo un bloqueo de la peroxidasa endógena calentando las laminillas en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 min en un horno de microondas (30% de potencia). Las laminillas se colocaron por pares y todas las tinciones se hicieron usando capilaridad. Se hizo un pretratamiento con una solución de tripsina (1 mg en 150 ml Tris-HCl, 0,05 M, pH 7,6) durante 15 min a temperatura ambiente, luego se aplicó una técnica de recuperación de antígenos usando una solución tampón de citrato (0,01 M, pH 6,0) y calentamiento en un horno de microondas. Se utilizó la misma dilución 1:50 para los tres anticuerpos (MUC2, MUC5AC y MUC6). Los cortes histológicos fueron incubados con los anticuerpos primarios

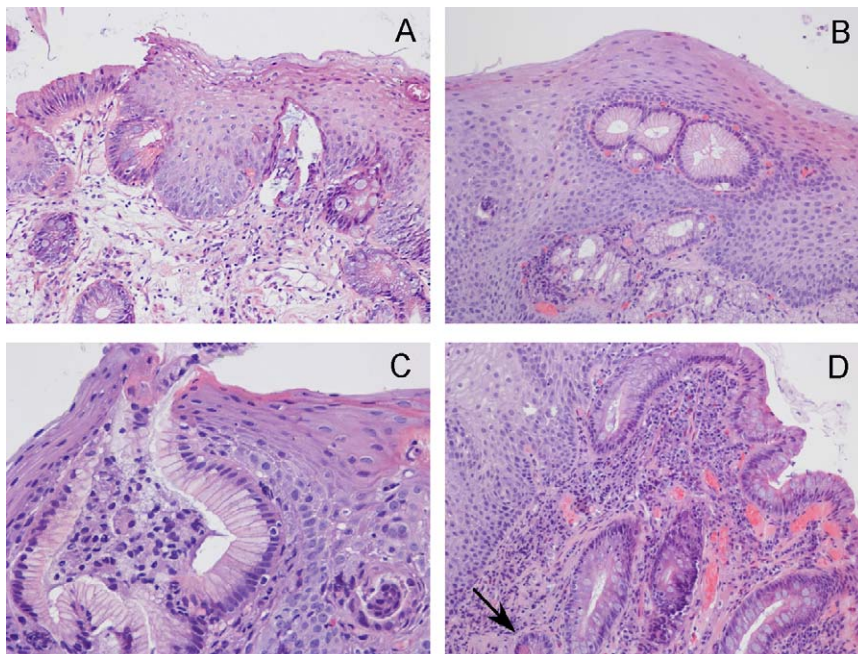
durante toda la noche a 41 °C en cámara húmeda. Después de lavar las laminillas, los tejidos se incubaron 30 min con los respectivos anticuerpos secundarios a temperatura ambiente, se lavaron nuevamente y se incubaron con el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa (Strept-ABComplex, Dako, Carpinteria, CA, USA) durante 30 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se utilizó diaminobencidina (SIGMA FAST DAB Peroxidase Substrate Tablet Set, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) como cromógeno y se utilizó hematoxilina como contratinción. Finalmente, los cortes se deshidrataron en alcoholes de gradación creciente, se lavaron en xilol y se montaron los cubreobjetos con medio adhesivo permanente. Simultáneamente se realizaron los respectivos controles negativos, omitiendo cada uno de los anticuerpos primarios.

**Tabla 1**

Características demográficas de los pacientes, diagnóstico y seguimiento

Paciente N.º	Edad	Sexo	N.º de endoscopias (biopsias)	Intervalo de seguimiento (años)	MI incompleta	MI completa	Displasia indefinida	Displasia de bajo grado	Displasia de alto grado	Adenocarcinoma	Progreso
1	70	M	2	2	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí
2	71	F	3	2	Sí	Sí	-	Sí	-	-	Sí
3	64	M	15	5	Sí	Sí	-	Sí	-	-	Sí
4	60	M	3	3	Sí	Sí	-	-	-	-	No
5	73	F	5	5	Sí	Sí	-	-	Sí	-	Sí
6	74	F	3	7	Sí	Sí	-	-	-	-	No
7	69	M	6	9	Sí	No	Sí	-	-	-	Sí
8	58	M	2	2	Sí	Sí	-	-	-	-	No
9	52	M	10	8	Sí	Sí	-	Sí	-	-	Sí
10	57	M	5	8	Sí	Sí	-	Sí	-	-	Sí
11	72	M	3	7	Sí	No	Sí	-	-	-	Sí
12	64	M	8	2	Sí	Sí	-	-	-	Sí	Sí
13	67	M	3	5	Sí	Sí	Sí	-	-	-	Sí
14	59	M	2	1	Sí	Sí	-	-	-	Sí	Sí

MI: metaplasia intestinal.



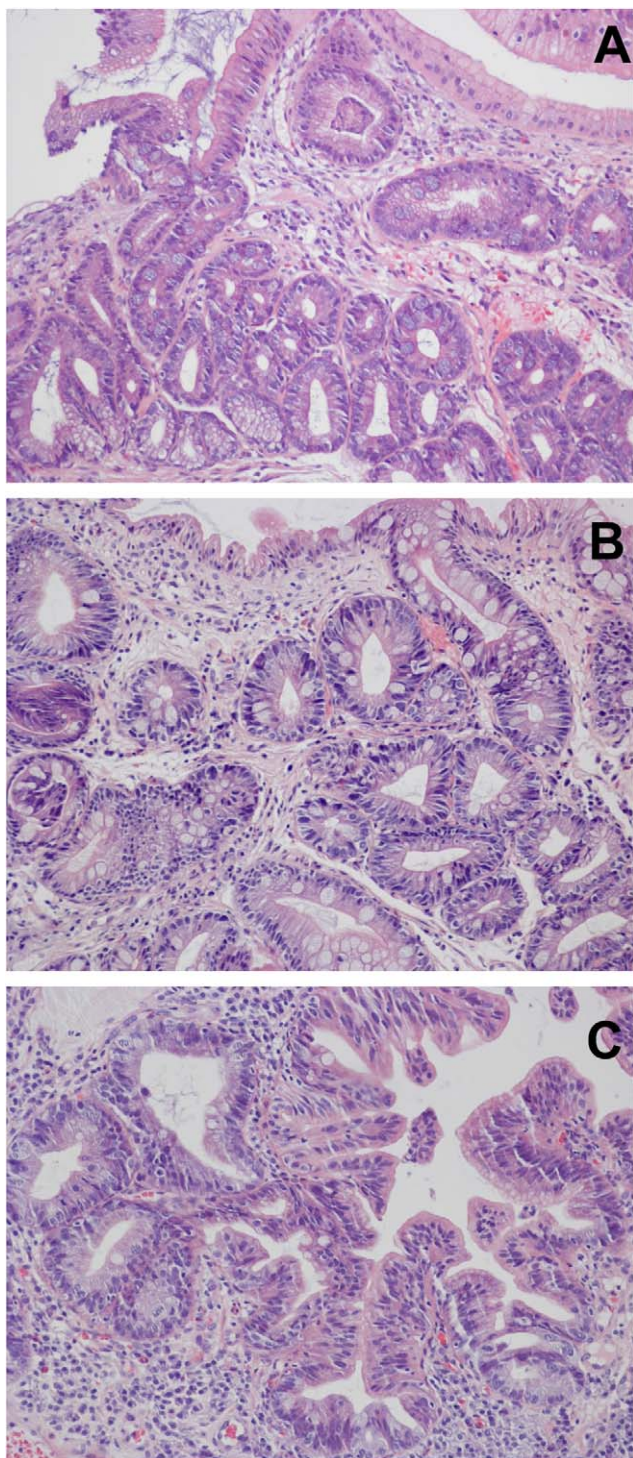
**Figura 1.** Especímenes de biopsias con esófago de Barrett. A y D) Se observa epitelio con metaplasia intestinal contigua al epitelio escamoso. En algunos especímenes se observaron áreas de metaplasia completa, incluyendo la presencia de células de Paneth (ver flecha en D). B y C) Presencia de epitelio columnar metaplásico sin evidencia de células caliciformes (HE; A, B y D) x20; C: x40).



La evaluación de la presencia de mucinas neutras y ácidas (sialomucinas y sulfomucinas) y de las tinciones de inmunohistoquímica (MUC2, MUC5AC y MUC6) fue hecha de forma indepen-

diente por tres patólogos (PC, MBP y AA). En cada espécimen se evaluó de una manera semicuantitativa el porcentaje de células calciformes y columnares positivas para cada marcador dentro del área de metaplasia.

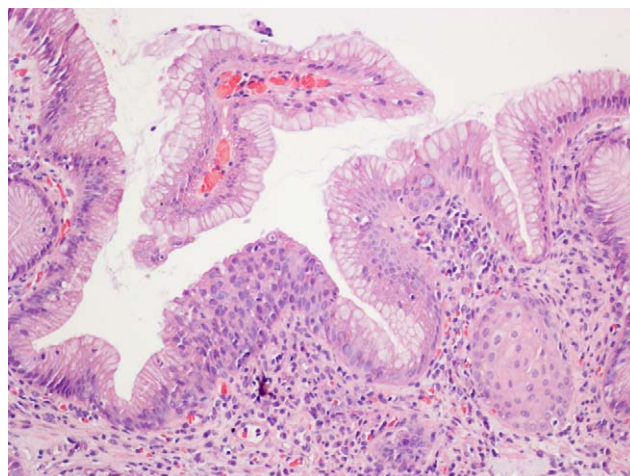
Para el análisis estadístico, los especímenes se agruparon en 3 categorías diagnósticas: BE (sin displasia), indefinidos para displasia y displasia. Para estimar las diferencias de las medias para cada marcador entre los grupos diagnósticos, y teniendo en cuenta la correlación de las muestras por individuo, se usaron modelos de regresión lineal. Los modelos fueron ajustados por las variables demográficas disponibles usando el programa estadístico Stata versión 9.2 (Stata Corporation, College Station, TX, USA). Para la presentación gráfica de los resultados, las medias y los errores estándar de las medias de los porcentajes de cada marcador fueron estimados usando el programa GraphPad Prism versión 5.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).



**Figura 2.** Displasia en esófago de Barrett. A) Indefinido para displasia. Se observa un foco de metaplasia intestinal con densa proliferación de glándulas agrupadas (patrón adenomatoso o *back-to-back*), con marcada disminución de estroma entre ellas. Los núcleos son redondos, pequeños y basales. B) Displasia de bajo grado. Proliferación de estructuras glandulares, ligeramente irregulares, con epitelio ligeramente pseudoestratificado y núcleos elongados e hiper cromáticos que mantienen la polaridad con respecto a la membrana basal. C) Displasia de alto grado. Estructuras glandulares complejas ramificadas con marcada estratificación del epitelio, el cual forma proyecciones papilares hacia el lumen glandular. (HE; A, B y C) x 20).

## Resultados

La tabla 1 incluye las características demográficas, el seguimiento y los diagnósticos histopatológicos de los 14 pacientes con seguimiento endoscópico y toma de biopsias en más de una ocasión. Además, se indica el intervalo en años entre la primera y la última biopsia, y se registra si hubo o no progreso en término de lesiones más avanzadas en las biopsias subsiguientes. En 11 de los 14 pacientes se observó un avance del proceso en el tiempo de seguimiento. Aunque en todos los pacientes se confirmó la presencia de metaplasia intestinal incompleta (que incluye los tipos II y III o colónica)<sup>22</sup>, en 12 de ellos se observaron islotes de metaplasia completa (tipo I o intestino delgado) en alguna de las biopsias. En algunos casos se observaron áreas con epitelio columnar sin células calciformes (fig. 1). El diagnóstico registrado en la tabla 1 para cada paciente se hizo basándose en la lesión más avanzada. En 4 pacientes una o más biopsias se interpretaron como indefinidas para displasia (fig. 2A), en otros 4 se diagnosticó displasia de bajo grado (fig. 2 B y C), en 1 displasia de alto grado (fig. 2D) y en 2 adenocarcinoma invasivo (resecado). Además, en algunos casos se observó la presencia de focos de epitelio con múltiples capas y características combinadas de epitelio escamoso y columnar (denominado *multilayered*), que es considerado por algunos autores como una fase de transición entre estos dos tipos de epitelio<sup>23,24</sup> (fig. 3).

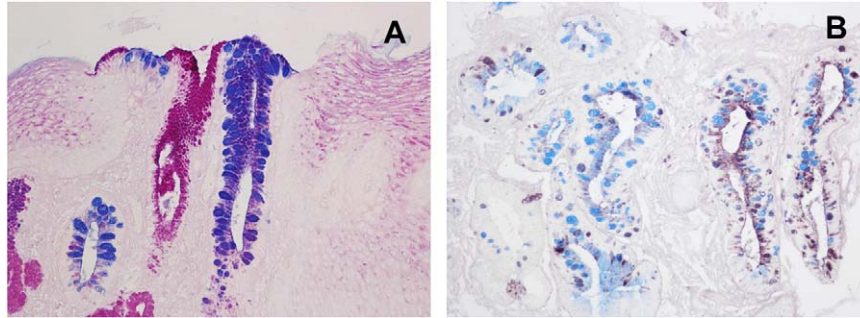


**Figura 3.** Espécimen de biopsia con esófago de Barrett. Se observa un foco (centro, izquierda) con epitelio de múltiples capas que presenta características de epitelio escamoso y columnar (denominado *multilayered*), considerado de transición entre ambos tipos. (HE x 20).

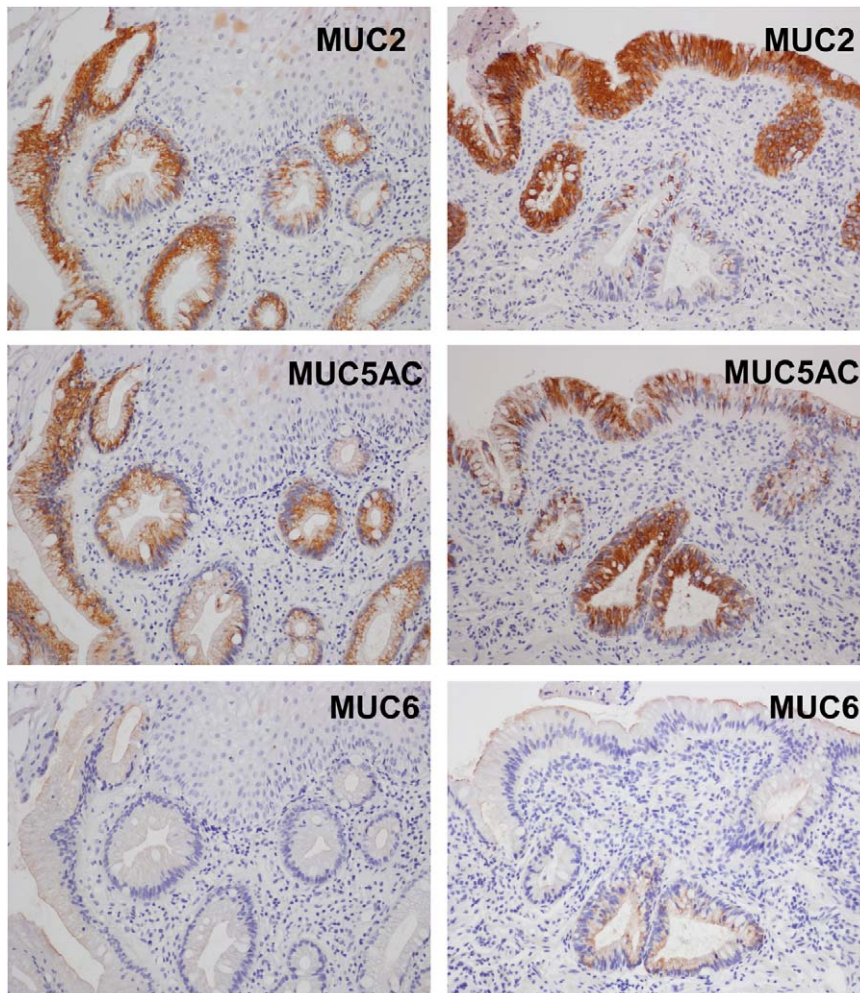


En la mayor parte de los casos se observaron marcadores de varios tipos de mucinas en células con características morfológicas de metaplasia incompleta. En 13 de los 14 pacientes, una o más biopsias presentaron expresión de mucinas neutras (PAS positivas) en las áreas metaplásicas, principalmente en las células columnares. Prácticamente, todas las células caliciformes (99,5%) y un porcentaje de células columnares (54,4%) revelaron la presencia de sialomucinas. En 11 de los pacientes se observó la presencia de sulfomucinas en las células caliciformes y/o

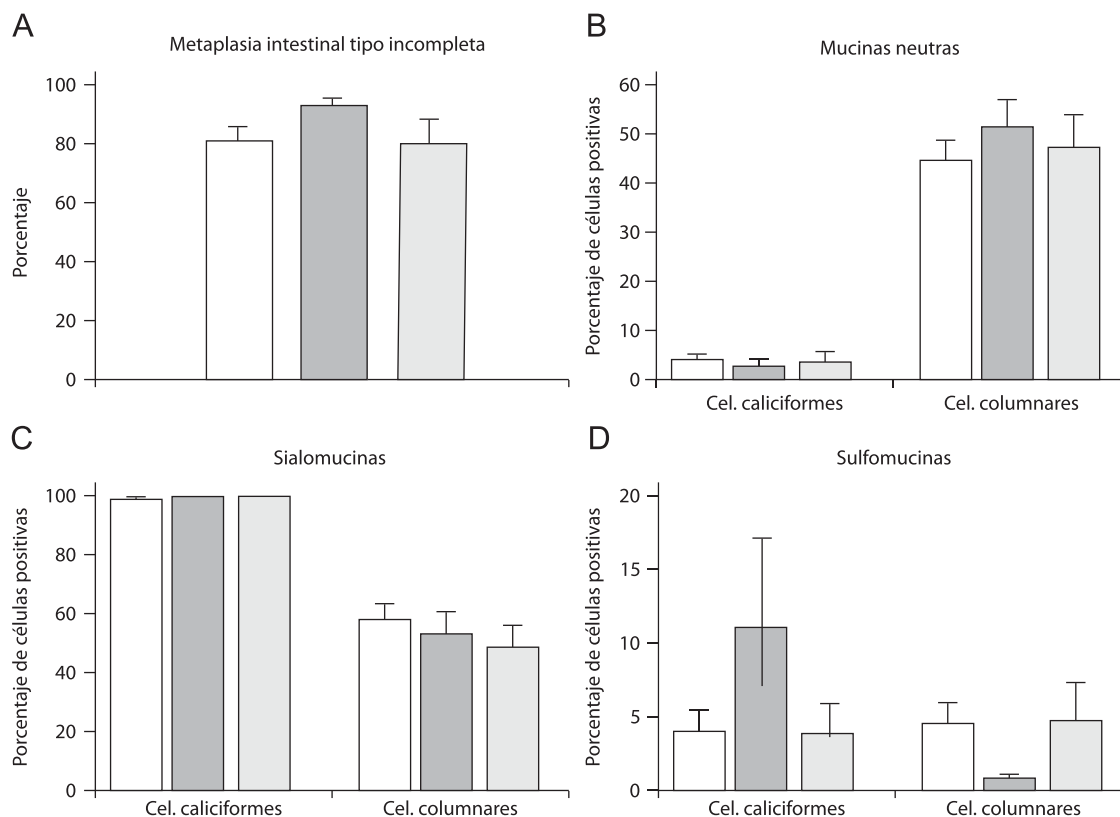
columnares en una o más de las biopsias (fig. 4). En todos los casos se observó expresión de MUC2 y MUC5AC; MUC6 fue expresada ocasionalmente (fig. 5). En las figuras 6 y 7 se resumen los hallazgos histopatológicos en las 65 biopsias estudiadas, agrupadas en 3 categorías diagnósticas: EB, indefinido para displasia y displasia (incluye bajo y alto grado). Se excluyeron de este análisis los 2 especímenes con adenocarcinoma. La figura 6 A refleja los porcentajes del área de tejido con metaplasia intestinal incompleta dentro del área metaplásica total. Las



**Figura 4.** Tinciones de histoquímica en esófago de Barrett. A. PAS-AB. Se observa un foco de metaplasia rodeado por epitelio escamoso. Algunas de las glándulas muestran la presencia de mucinas neutras, principalmente en células columnares (en color rosa-magenta) y otras la presencia de sialomucinas (azul). B. HID-AB. Metaplasia intestinal incompleta con presencia de sialomucinas en células caliciformes y columnares (en azul), y de sulfomucinas principalmente en células columnares (marrón). (A y B) x20).



**Figura 5.** Inmunohistoquímica para MUC2, MUC5AC y MUC6 en cortes histológicos secuenciales de 2 especímenes (izquierda y derecha) con esófago de Barrett. En todos los casos se observó presencia de MUC2 y MUC5AC, indicando diferenciación intestinal y gástrica, respectivamente. La expresión de MUC6 se observó en pocos casos, en pequeñas áreas, principalmente en epitelio de glándulas profundas. (x20).



**Figura 6.** Observaciones en biopsias con esófago de Barrett sin displasia (columnas blancas), indefinidas para displasia (gris oscuro) y displasia (gris claro). A) Porcentajes de metaplasia intestinal de tipo incompleta, evaluados con tinción de hematoxilina-eosina. B, C y D) Porcentajes de células caliciformes y columnares que expresan mucinas neutras, sialomucinas y sulfomucinas en las áreas de metaplasia y displasia, identificadas con tinciones de PAS-AB y HID-AB. Las columnas y barras expresan la media y error estándar de la media.

figuras 6 B, C y D y 7 muestran la expresión de mucinas neutras y ácidas y de MUC2, MUC5AC y MUC6, evaluada separadamente en células caliciformes y columnares en las áreas metaplásicas. Se observó que cuando la lesión era más grave había significativamente menor expresión de sialomucinas en las células columnares ( $p$  de tendencia igual a 0,03). La presencia de sulfomucinas en células caliciformes fue significativamente mayor en las lesiones indefinidas para displasia que en el EB ( $p=0,034$ ), pero no hubo diferencia significativa entre el EB y la displasia. El 94% de células caliciformes y el 30,1% de las células columnares presentaron inmunotinción para MUC2, marcador de mucinas de tipo intestinal. La expresión de MUC2 en las células columnares fue significativamente mayor en sujetos con lesiones indefinidas para displasia en aquellos con EB ( $p=0,029$ ). Sin embargo, no hubo diferencia en este marcador entre EB y displasia. El 40,2% de células caliciformes y el 67,3% de células columnares expresaron MUC5AC, indicando la presencia de mucinas gástricas. En 7 de los pacientes se encontró expresión de MUC6 en una o más de las biopsias, usualmente débil, en las glándulas submucosas y en pequeñas áreas de metaplasia intestinal. No hubo diferencias significativas en la expresión de MUC5AC o MUC6 entre los grupos diagnósticos. Todas las diferencias encontradas mantuvieron su significancia después de ajustar el análisis por edad y sexo.

**Discusión**

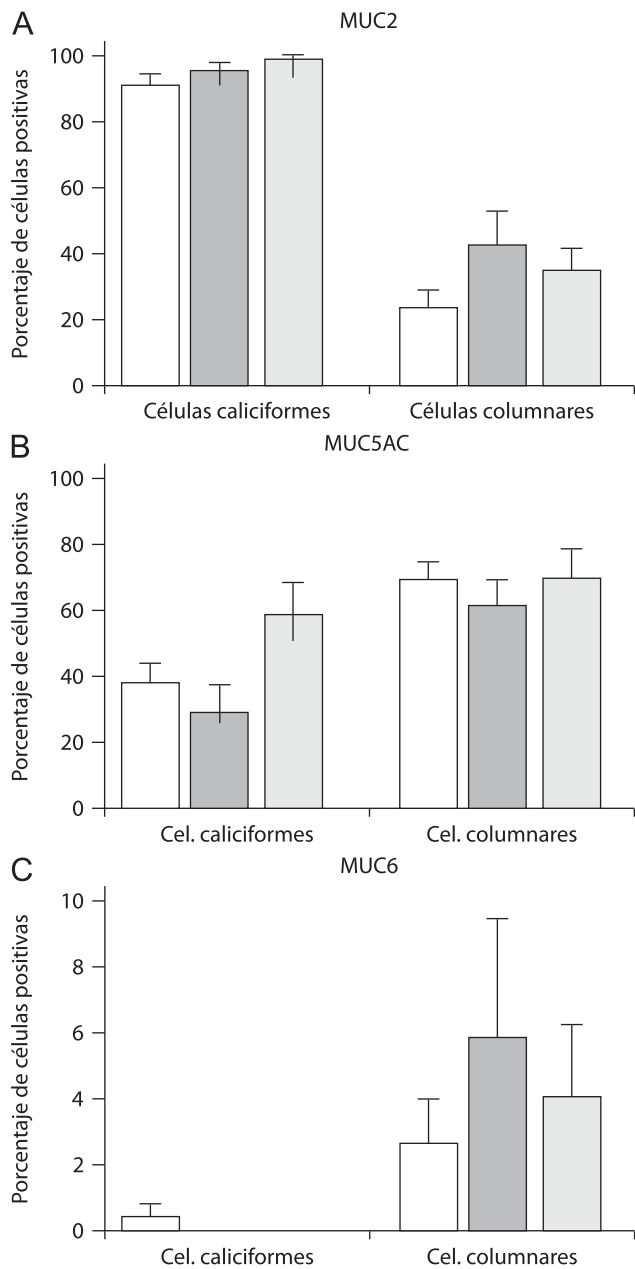
Nuestras observaciones sugieren que en el caso del adenocarcinoma del esófago inferior, el proceso preneoplásico es gradual, posiblemente originado en células de linaje gástrico con mucinas neutras. Observaciones anteriores en metaplasia intestinal

gástrica indican que la metaplasia completa expresa mucinas intestinales, positivas en la tinción de azul Alcian a pH 2,5 y a los anticuerpos contra MUC2, pero no con anticuerpos contra las mucinas gástricas MUC5AC y MUC6<sup>25</sup>. La presencia de islotes de metaplasia completa en nuestros casos de EB podría interpretarse como indicativo de la transformación gradual de metaplasia completa en metaplasia incompleta, tal como se ha descrito en la mucosa gástrica<sup>26</sup>. La presencia de células positivas para anticuerpos contra MUC2 y MUC5AC, en la presente serie, confirma observaciones anteriores que los consideran indicadores de metaplasia intestinal incompleta<sup>25</sup>.

En esta serie se encontró que la expresión de sialomucinas en las células columnares es menor a medida que el diagnóstico aumenta en gravedad (de EB a indefinido para displasia y a displasia). Además, en sujetos con lesiones indefinidas para displasia se observó un mayor contenido de sulfomucinas en células caliciformes y de MUC2 en células columnares que en sujetos con EB. Estas diferencias no se observaron entre EB y displasias. Estos hallazgos podrían interpretarse como indicativos de que el diagnóstico «indefinido para displasia» representa un estado transitorio de transformación celular con alteración en la composición de algunas mucinas, la cual cambia nuevamente en la fase de displasia.

El requerimiento obligado del *American College of Gastroenterology* de encontrar células caliciformes para diagnosticar EB parecería sugerir que las células columnares con mucinas ácidas (columnares azules) no serían precursoras del adenocarcinoma esofágico. En la presente serie se encontraron mucinas ácidas en aproximadamente el 55% de las células columnares, en presencia o no de displasia. Esto las caracterizaría como posibles precursoras del carcinoma esofágico.

Las sulfomucinas se consideran, en general, marcadores de metaplasia intestinal incompleta. Sin embargo, el epitelio de las



**Figura 7.** Expresión de MUC2, MUC5AC y MUC6 evaluada por inmunohistoquímica en biopsias con esófago de Barrett (columnas blancas), indefinidos para displasia (gris oscuro) y displasia (gris claro). Se evaluó por separado el porcentaje de células caliciformes y columnares positivas para cada marcador. Las columnas indican la media y el error estándar de la media.

glándulas submucosas del esófago también expresa normalmente sulfomucinas. El hecho de encontrar sulfomucinas en el epitelio del EB apoyaría en parte la hipótesis de que el EB es originado en el epitelio de los conductos de las glándulas submucosas esofágicas. Sin embargo, la presencia de células columnares de linaje gástrico favorece la hipótesis de transformación gradual del fenotipo glandular.

El consenso actual acepta que el reflujo gastroesofágico crónico conduce a la destrucción del epitelio escamoso, resistente al trauma de los alimentos sólidos, pero vulnerable a la secreción ácida gástrica. Dicho epitelio escamoso sería reemplazado por un epitelio glandular, más adaptado al microambiente ácido. Pero la persistencia del reflujo gástrico tendría como resultado un cambio gradual del fenotipo epitelial reflejado en la composición química de las

mucinas, primero neutras, luego siálicas y finalmente sulfatadas. La injuria crónica del reflujo se produciría de forma eventual como consecuencia de la transformación preneoplásica y luego neoplásica del epitelio del EB. No está claro el mecanismo por el cual el reflujo transforma la célula epitelial en célula neoplásica. La injuria repetida conduce a un exceso de replicación celular que podría inmortalizar anomalías adquiridas del ADN. El reflujo gástrico puede incluir secreción biliar, conocido estimulante de la replicación celular. También se ha postulado que el microambiente del EB puede producirse como resultado de la síntesis *in situ* de carcinógenos tales como los compuestos nitrosados<sup>27</sup>.

El diagnóstico histopatológico basado en la tinción de HE sigue siendo el más fiel marcador de displasia, no superado por los marcadores de mucinas. El proceso precursor del adenocarcinoma del esófago inferior es complejo, y en general tarda más de una década en llegar a la etapa de invasión neoplásica<sup>19</sup>. La exigencia de la presencia de células caliciformes para diagnosticar EB puede tener un valor práctico para evitar someter a los pacientes a un seguimiento endoscópico innecesario, pero no coincide con la dinámica del proceso precanceroso. El patólogo forma parte crucial del equipo médico que determina la conducta a seguir en pacientes con EB sometidos a biopsias esofágicas repetidas. El objetivo es evitar el desarrollo de un carcinoma invasivo, generalmente de muy mal pronóstico. Un informe completo de cada biopsia debe incluir detalles importantes tales como la presencia de metaplasia incompleta (células caliciformes sin borde en cepillo), que indicaría la necesidad de un seguimiento periódico con biopsias esofágicas y, especialmente, la presencia y el grado de displasia. Un diagnóstico de displasia de alto grado suele requerir intervención; en tal caso se recomienda que más de un patólogo realice una evaluación independiente de los cambios histopatológicos. La tinción de HE es suficiente. Hasta ahora no se han identificado marcadores moleculares o inmunohistoquímicos útiles para confirmar la presencia de displasia de alto grado o de carcinoma incipiente. Este es un tema de investigación que merece ser tenido en cuenta.

En conclusión, nuestros hallazgos sugieren la transformación gradual del fenotipo del epitelio metaplásico, seguido de una disminución en la expresión de sialomucinas, a medida que el proceso precanceroso avanza en gravedad. Este estudio exploratorio debe ser continuado con nuevos casos que serán incluidos en un nuevo análisis.

## Agradecimientos

Los autores agradecen la valiosa colaboración de María Asunción Iribarren y Carmen Neira en la organización y traslado del material de estudio. Este estudio recibió el apoyo financiero de la Fundación Vasca de Innovación e Investigación Sanitarias (BIOEF).

## Bibliografía

- Barrett NR. Chronic peptic ulcer of the oesophagus and 'oesophagitis'. *Br J Surg*. 1950;38:175-82.
- Allison PR, Johnstone AS. The oesophagus lined with gastric mucous membrane. *Thorax*. 1953;8:87-101.
- Haggitt RC, Tryzelaar J, Ellis FH, Colcher H. Adenocarcinoma complicating columnar epithelium-lined (Barrett's) esophagus. *Am J Clin Pathol*. 1978;70:1-5.
- Hawe A, Payne WS, Weiland LH, Fontana RS. Adenocarcinoma in the columnar epithelial lined lower (Barrett) oesophagus. *Thorax*. 1973;28:511-4.
- Corley DA, Kubo A, Levin TR, Block G, Habel L, Rumore G, et al. Race, ethnicity, sex and temporal differences in Barrett's oesophagus diagnosis: a large community-based study, 1994-2006. *Gut*. 2009;58:182-8.
- Post PN, Siersema PD, Van Dekken H. Rising incidence of clinically evident Barrett's oesophagus in The Netherlands: a nation-wide registry of pathology reports. *Scand J Gastroenterol*. 2007;42:17-22.

7. Brown LM, Devesa SS, Chow WH. Incidence of adenocarcinoma of the esophagus among white Americans by sex, stage, and age. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:1184-7.
8. Lepage C, Rachet B, Jooste V, Faivre J, Coleman MP. Continuing rapid increase in esophageal adenocarcinoma in England and Wales. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:2694-9.
9. Hornick JL, Odze RD. Neoplastic precursor lesions in Barrett's esophagus. *Gastroenterol Clin North Am.* 2007;36:775-96.
10. Blaser MJ. Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. *J Infect Dis.* 1999;179:1523-30.
11. de Martel C, Llosa AE, Farr SM, Friedman GD, Vogelstein JH, Orentreich N, et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of development of esophageal adenocarcinoma. *J Infect Dis.* 2005;191:761-7.
12. Paull A, Trier JS, Dalton MD, Camp RC, Loeb P, Goyal RK. The histologic spectrum of Barrett's esophagus. *N Engl J Med.* 1976;295:476-80.
13. Wang KK, Sampliner RE. Updated guidelines 2008 for the diagnosis, surveillance and therapy of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:788-97.
14. Playford RJ. New British Society of Gastroenterology (BSG) guidelines for the diagnosis and management of Barrett's oesophagus. *Gut.* 2006;55:442.
15. Odze RD, Goldblum JR. Low-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006;4:1419-20. author reply 20.
16. Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, Appelman HD, Fenoglio CM, Haggitt RC, et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol.* 1983;14:931-68.
17. Rugge M, Correa P, Dixon MF, Hattori T, Leandro G, Lewin K, et al. Gastric dysplasia: the Padova international classification. *Am J Surg Pathol.* 2000;24:167-76.
18. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut.* 2000;47:251-5.
19. Torrado J, Ruiz B, Garay J, Asenjo JL, Tovar JA, Cosme A, et al. Blood-group phenotypes, sulfomucins, and *Helicobacter pylori* in Barrett's esophagus. *Am J Surg Pathol.* 1997;21:1023-9.
20. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Laboratory methods in histotechnology. En: Fio A, editor. *Pathology.* Washington, DC: American Registry of Pathology; 1994.
21. Spicer SS. Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically. *J Histochem Cytochem.* 1965;13:211-34.
22. Filipe MI, Muñoz N, Matko I, Kato I, Pompe-Kirn V, Jutersek A, et al. Intestinal metaplasia types and the risk of gastric cancer: a cohort study in Slovenia. *Int J Cancer.* 1994;57:324-9.
23. Glickman JN, Chen YY, Wang HH, Antonioli DA, Odze RD. Phenotypic characteristics of a distinctive multilayered epithelium suggests that it is a precursor in the development of Barrett's esophagus. *Am J Surg Pathol.* 2001;25:569-78.
24. Odze RD. Update on the diagnosis and treatment of Barrett esophagus and related neoplastic precursor lesions. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:1577-85.
25. Piazuelo MB, Haque S, Delgado A, Du JX, Rodríguez F, Correa P. Phenotypic differences between esophageal and gastric intestinal metaplasia. *Mod Pathol.* 2004;17:62-74.
26. Torrado J, Ruiz B, Garay J, Cosme A, Arenas JI, Bravo JC, et al. Lewis, secretor, and ABO phenotypes, and sulfomucin expression in gastric intestinal metaplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997;6:287-9.
27. Clemons NJ, McColl KE, Fitzgerald RC. Nitric oxide and acid induce double-strand DNA breaks in Barrett's esophagus carcinogenesis via distinct mechanisms. *Gastroenterology.* 2007;133:1198-209.