

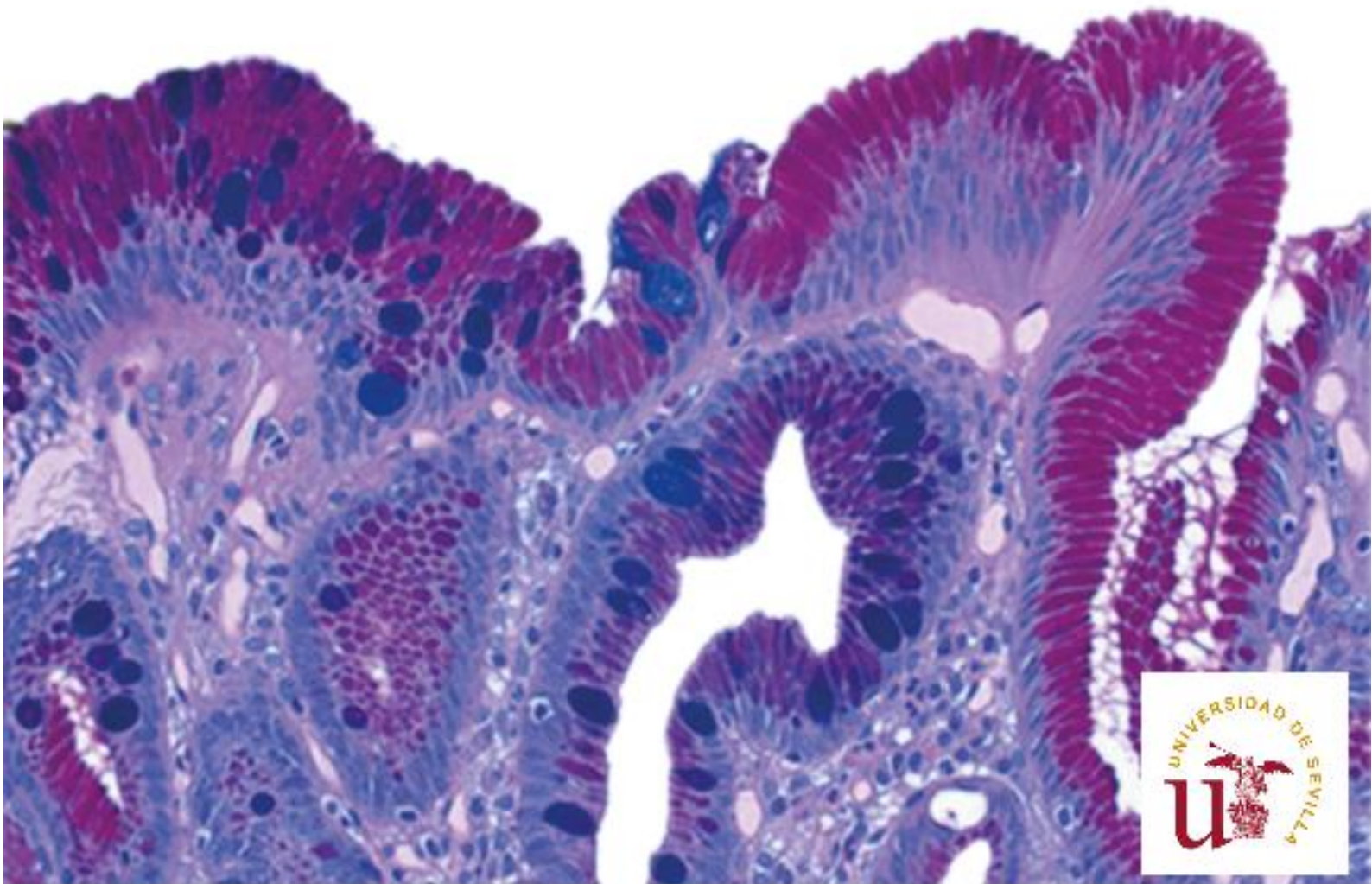
TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE PREVALENCIA, INCIDENCIA,  
SUPERVIVENCIA Y FACTORES DE RIESGO  
ASOCIADOS AL ESÓFAGO DE BARRETT  
Y ADENOCARCINOMA ESOFÁGICO.

UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES  
TWIST, P504S Y CD133 EN LA VALORACIÓN  
DE LA PROGRESIÓN DEL ESÓFAGO DE BARRETT

QUETZALIHUITL ARROYO MARTÍNEZ

SEVILLA, 2016



# FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



**ESTUDIO DE PREVALENCIA, INCIDENCIA, SUPERVIVENCIA Y  
FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL ESÓFAGO DE BARRETT  
Y ADENOCARCINOMA ESOFÁGICO. UTILIDAD DE LOS  
BIOMARCADORES TWIST, P504S Y CD133 EN LA  
VALORACIÓN DE LA PROGRESIÓN DEL ESÓFAGO DE  
BARRETT.**

*Tesis doctoral presentada por*

**QUETZALIHUITL ARROYO MARTÍNEZ**

*Para optar al grado de Doctor*

2016

**D. MANUEL RODRÍGUEZ TÉLLEZ**, profesor asociado de Medicina de la Universidad de Sevilla y Facultativo Especialista de Área de la Unidad de Gestión Clínica de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla y **D. ANTONIO AZNAR MARTIN**, profesor titular del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICAN QUE: **D. QUETZALIHUITL ARROYO MARTÍNEZ**, Licenciado en Medicina, ha realizado bajo su conjunta dirección y en la Unidad de Gestión Clínica de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Virgen Macarena y Área el trabajo titulado <<**Estudio de prevalencia, incidencia, supervivencia y factores de riesgo asociados al Esófago de Barrett. Utilidad de los biomarcadores TWIST, p504s y CD 133 en la valoración de la progresión del Esófago de Barrett**>> reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Sevilla a 13 de enero del 2016

Vº Bº de los Directores

El Doctorando

**D. Manuel Rodríguez Téllez**

**D. Quetzalihuitl Arroyo Martínez**

**D. Antonio Aznar Martín**

**D. JOSÉ VILLAR ORTIZ**, profesor del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina y Tutor del Programa de Doctorado en Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA QUE: El trabajo titulado <<Estudio de prevalencia, incidencia, supervivencia y factores de riesgo asociados al Esófago de Barrett. Utilidad de los biomarcadores TWIST, p504s y CD 133 en la valoración de la progresión del Esófago de Barrett>>, presentado por **D. QUETZALIHUITL ARROYO MARTÍNEZ**, para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo la conjunta dirección de **D. MANUEL RODRÍGUEZ TÉLLEZ** y **D. ANTONIO AZNAR MARTIN** en la Unidad de Gestión Clínica de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla y Área.

Sevilla a 13 de enero del 2016

Tutor del Programa de Doctorado

Fdo.: **D. José Villar Ortiz**

*Una vez vivían en la antigua ciudad de Afkar dos hombres cultos  
que odiaban y despreciaban cada uno el conocimiento del otro.  
Ya que uno negaba la existencia de los dioses y el otro era creyente.  
Un día los dos se encontraban en el mercado, y con sus seguidores,  
empezaron a disputar y a discutir sobre la existencia o la no existencia de los dioses.  
Y después de horas de controversia, se marcharon.  
Esa noche, el ateo fue al templo y se postró ante el altar y rezó a los dioses  
por el perdón de su pasado caprichoso.  
Y a la misma hora, el hombre culto, que creía en los dioses, quemó sus libros sagrados.  
Ya que se había convertido en ateo.*

***El loco***

*Gibram Jalil Gibram*

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es el resultado de una ardua labor en la que han participado una gran cantidad de personas, todas ellas dedicando su tiempo y atención de una forma por demás excepcional y desinteresada.

Antes que nada agradecer a dos personas que, aunque ya disfrutando de esa justa jubilación, lograron sentar las bases de la endoscopia en España en general y en Sevilla en particular, el Dr. Francisco Pellicer Bautista y el Dr. Manuel Gómez Parra, éste último, dedicando horas extra a la confección de una base de datos que, hasta la fecha, sigue siendo el pilar de muchos estudios científicos.

A los Dres. Paul Desmond y Andrew Taylor, del St. Vincent Hospital en Melbourne, Australia, por darme la oportunidad de tener una visión más amplia de las enfermedades esofágicas y dar pie a esas dudas que el presente trabajo intenta contestar.

A los Dres. Antonio García Escudero y Javier Brugal Medina, por su excepcional ayuda y quienes, aún a costa de su tiempo libre, han logrado y no sin salvar grandes obstáculos, recuperar, procesar y analizar unas ingentes cantidades de información, consiguiendo no sólo ampliar el conocimiento en el esófago de Barrett sino, además, generando líneas de investigación que puedan resultar en un futuro mejor entendimiento de esta patología. A todos esos patólogos, técnicos, enfermeras, auxiliares y demás personal por su ayuda directa e indirecta, en la realización de éste trabajo.

A la UGC Intercentros de Aparato Digestivo del HU Virgen Macarena, por darme todas las herramientas, tanto humanas como financieras, para la consecución de éste estudio.

A la UGC Intercentros de Cirugía del Hospital Virgen del Rocío, mi nueva casa, y muy en especial al Prof. Javier Padillo Ruiz, por ser un continuo estímulo a la superación profesional y académica. También a la Dra. Carmen Bernal, por su tenacidad e insistencia en transmitirnos la importancia del trabajo académico como parte integral de la formación de cualquier profesional de la salud.

A mi familia que, aunque lejos en la distancia, me han apoyado incondicionalmente en cada una de las decisiones importantes de mi vida. A mi pareja, Shaila, por no sucumbir a los deseos de medicarme con todos esos potingues que los psiquiatras tienen como herramientas de trabajo, al verme agobiado intentando no sucumbir ante tantos frentes abiertos.

Dejo para el final mi más grande agradecimiento para esa persona que creyó en mí por sobre todas las cosas, incluso, en ocasiones, con más fe en mí y en mi trabajo que yo mismo; por motivarme a librar obstáculos, a tener paciencia y tenacidad, a no dejar trabajos inconclusos, por transmitirme que, cuanto mayor es la dificultad, mayor gloria hay en superarla, a ti Manolo, mi más profundo agradecimiento.



# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	11
1. RESUMEN .....	14
1.1 Estudio de prevalencia, incidencia, supervivencia y factores de riesgo asociados al Esófago de Barrett.....	14
1.2 Uso de los biomarcadores TWIST, p504s y CD 133 en la valoración de la progresión del Esófago de Barrett.....	20
2. INTRODUCCIÓN.....	25
2.1 Antecedentes históricos sobre el Esófago de Barrett. ....	26
2.2 Incidencia del Esófago de Barrett y del Adenocarcinoma Esofágico.....	34
2.3 Factores de riesgo en el desarrollo del Adenocarcinoma esofágico sobre Esófago de Barrett.....	37
2.3.1 Factores innatos.....	37
2.3.2 Factores Gastrointestinales. ....	39
2.3.3 Otros factores de riesgo modificables. ....	50
2.4 Aspectos histopatológicos del Esófago de Barrett. ....	56
2.4.1 Negativo para Displasia.....	56
2.4.2 Positivo para displasia, de bajo y alto grado. ....	58
2.4.3 Problemas actuales en la interpretación de las lesiones en el EB. ....	65
2.4.4 Inmunohistoquímica en el Esófago de Barrett. ....	75
2.4.4.2 Papel de la Inmunohistoquímica en el Esófago de Barrett.....	103
2.5 Screening y vigilancia endoscópica del Esófago de Barrett.....	117
2.6 Tratamiento del esófago de Barrett. ....	123
2.6.1 Esófago de Barrett sin displasia. ....	123
2.6.2 Esófago de Barrett con displasia de bajo grado. ....	124
2.6.3 Esófago de Barrett indefinido para displasia. ....	126
2.6.4 Esófago de Barrett con displasia de alto grado/carcinoma in situ. ....	127
3. HIPÓTESIS.....	131
3.1 Hipótesis nula (H0).....	132



3.2	Hipótesis alternativa (H1) .....	132
4.	OBJETIVOS.....	133
4.1.	Objetivos sobre el comportamiento del Esófago de Barrett y el Adenocarcinoma Esofágico en el Área Sanitaria Virgen Macarena.....	134
4.2	Objetivos del uso de biomarcadores TWIST, P504S y CD 133 en la valoración de la progresión del Esófago de Barrett.....	136
5	MATERIAL Y MÉTODOS.....	137
5.1	Metodología para valorar el comportamiento del Esófago de Barrett y del Adenocarcinoma esofágico en el Área Hospitalaria Virgen Macarena de Sevilla. ....	138
5.1.3	Análisis estadístico.....	140
5.2	Metodología para valorar el uso de los biomarcadores TWIST, P504S y CD 133 en la valoración de la progresión del Esófago de Barrett. ....	143
5.2.1	Criterios de inclusión: .....	143
5.2.2	Criterios de exclusión:.....	143
5.2.3	Metodología empleada para las tinciones inmunohistoquímicas:.....	144
5.2.4	Valoración Inmunohistoquímica:.....	146
5.2.5	Análisis estadístico.....	147
6	RESULTADOS.....	150
6.1	Resultados respecto al comportamiento del Esófago de Barrett y del Adenocarcinoma esofágico en el Área Hospitalaria Virgen Macarena de Sevilla.....	152
6.1.1	Tasas de incidencia del EB y ACE. ....	152
6.1.2	Características sociodemográficas por grupos .....	155
6.2	Resultados respecto al uso de los biomarcadores TWIST, P504S y CD 133 en la valoración de la progresión del Esófago de Barrett. ....	164
6.2.1	Características de las tinciones.....	165
6.2.2	Resultado de las tinciones (Proporción, Intensidad y Q-Score).....	176
6.2.3	Interpretación de los valores del Q-Score de Allred.....	186
6.2.4	Estudio inmunohistoquímico según propio control .....	189
7	DISCUSIÓN .....	192
7.1	Comportamiento del Esófago de Barrett y del Adenocarcinoma esofágico en el Área Hospitalaria Virgen Macarena de Sevilla. ....	193
7.1.2	Incidencia del ACE y del EB. ....	193

7.1.3	Factores de riesgo implicados en la aparición del EB y desarrollo de ACE.....	194
7.1.3.1	Sexo.....	196
7.1.3.2	Edad .....	198
7.1.3.3	Obesidad .....	201
7.1.3.4	Consumo de alcohol y tabaco .....	203
7.1.3.5	Longitud del Esófago de Barrett .....	205
7.1.3.6	Morbilidad, mortalidad y supervivencia .....	206
7.2	Papel de los biomarcadores CD 133, TWIST y P504S en la valoración de la progresión del Esófago de Barrett. ....	209
7.2.2	CD 133 como marcador de células madre .....	209
7.2.2.1	CD 133 como marcador de células madre tumorales. ....	210
7.2.2.2	Detección de células madre en el Esófago de Barrett mediante el análisis inmonohistoquímico de CD 133. ....	210
7.2.3	P504s (alfa-metil-coenzima A racemasa) en el Esófago de Barrett.....	212
7.2.4	TWIST como marcador de metástasis precoces y su papel en el Esófago de Barrett. 213	
7.2.5	Expresión de CD 133, p504s y TWIST en la valoración de la progresión del Esófago de Barrett.....	215
8	CONCLUSIONES.....	219
9	BIBLIOGRAFIA.....	222

## ABREVIATURAS

EB: Esófago de Barrett	AINE's: Anti-inflamatorios no esteroideos
ERGE: Enfermedad por reflujo gastroesofágico	OMS: Organización Mundial de la Salud
RGE: Reflujo gastroesofágico	ON: Óxido nítrico
ERE: Enfermedad por reflujo erosiva	ADN: Ácido desoxirribonucleico
ERNE: Enfermedad por reflujo no erosiva	IMC: Índice de masa corporal
ACE: Adenocarcinoma esofágico	IGF: Factor de crecimiento dependiente de la insulina
DBG: Displasia de bajo grado	HR: Coeficiente de riesgo
DAG: Displasia de alto grado	LOH: Pérdida de la heterocigosis
DE: Desviación estándar	N/C: Cociente núcleo/citoplasma
OR: Odds ratio	IHQ: Inmunohistoquímica
TI: Tasa de incidencia	PECAM: Moléculas plaquetarias de adhesión endotelial
EBSD: Esófago de Barrett sin displasia	N-CAM: Moléculas de adhesión celular neural
EBDE: Esófago de Barrett con displasia estable	Ep-CAM: Moléculas de adhesión celular epitelial
EBPD: Esófago de Barrett con progresión de la displasia	EGFR: Factor de crecimiento epidérmico
APC: Pérdida del alelo 5q	PDGFR: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
CEE: Carcinoma esofágico escamoso	ALK: Kinasa linfomatosa anaplásica
IAE: Incidencia ajustada a la edad	LACG: Linfoma anaplásico de células grandes
H.P: Helicobacter pylori	BCL-2: Linfoma tipo 2 de células B
IC: Intervalo de confianza	MALT: Linfoma asociado a mucosas
FR: Factor de riesgo	AL: Amiloide
EEUU: Estado Unidos de América	AMCAR: Alfa-metil-Coenzima A racemasa
AA: Ácido araquidónico	CMC: Células madre carcinogénicas
COX2: Ciclooxygenasa 2	AGA: Asociación Americana de
PEG2: Prostaglandina E-2	
CCK2R: Receptor de colecistoquinina 2	

EGF: Factor de crecimiento epitelial	Gastroenterología
IBP: Inhibidores de la bomba de protones	BSG: Sociedad Británica de Gastroenterología
BOB CAT: <i>Barrett's and Cancer Task Force</i>	RE: Resección endoscópica
RFA: Ablación por radiofrecuencia	RME: Resección mucosa endoscópica
IND: Indefinidos	AM: Ablación mucosa
CIM: Carcinoma intramucoso	APC: Coagulación por argón-plasma
PTD: Terapia fotodinámica	CMT: Célula madre tumoral
MPEC: Electrocoagulación multipolar	

## **1 RESUMEN**

## RESUMEN

### 1.1 Estudio de prevalencia, incidencia, supervivencia y factores de riesgo asociados al Esófago de Barrett

#### INTRODUCCIÓN

El esófago de Barrett (EB) es una condición adquirida definida por la presencia de metaplasia intestinal en el esófago distal, habitualmente como resultado de la enfermedad por reflujo gastro-esofágico (ERGE) en donde el epitelio normal de tipo escamoso es remplazado por epitelio de tipo columnar. Si bien se conoce que la prevalencia de los síntomas del reflujo gastro-esofágico (RGE) en la población adulta en general, en países de occidente, es de alrededor del 7% en los que tienen un episodio de pirosis diario, y del 20% en los que manifiestan un episodio de pirosis semanal, la prevalencia del EB en la población general no puede ser estimada de la información precedente, debido a que muchos pacientes no tienen una historia previa de reflujo gastro-esofágico. La prevalencia del EB en el sur de Europa, según estudios obtenidos desde servicios de endoscopia, se ha incrementado de forma alarmante en los últimos años, pasando de 6.51/100 000 hab a 76.04/100 000 hab (1985-2001 respectivamente). La tasa más alta la tiene España con una prevalencia cercana al 12%, si tomamos en cuenta una población aproximada de 4,5 millones, tendríamos un total de 540 000 personas afectadas de EB; a esta alta prevalencia le siguen Italia con el 1.5% y Alemania con el 1.3% de la población con ERGE afecta de EB. En Inglaterra esta prevalencia ha aumentado desde el 0,08-2% en el periodo 1987-1996 hasta el 4% en 2004.

Hasta la fecha no está claro el porqué unas personas con diagnóstico de ERGE desarrollan EB y otras no, aunque parece que ciertos factores (genéticos, edad

avanzada, sexo masculino, obesidad, el consumo de tabaco y alcohol) podrían aumentar este riesgo.

El EB es un marcador aceptado de riesgo en el desarrollo de ACE. Se estima que su presencia incrementa el riesgo de ACE unas 30 veces, mientras que la ERGE sin EB sólo lo incrementa 3.1 veces. El riesgo de desarrollo de ACE sobre un EB ronda el 0.32% anual, con incidencias que varían desde el 0.1% al 0.59%, según diferentes estudios.

El grado de displasia en el EB continúa siendo la piedra angular en la clasificación del riesgo de desarrollo de ACE. El paradigma aceptado hasta el momento es que el grado de displasia está asociado directamente con el riesgo de malignización, basados en la premisa de que los cambios ocurren en un orden secuencial metaplasia-DBG-DAG-ACE. Sin embargo, esto no siempre ocurre. Las mayores series publicadas hasta la fecha muestran que hasta el 95% de los pacientes con diagnóstico de ACE no tenían diagnóstico previo de EB y que la mayoría de pacientes con EB fallecerán de causas no relacionadas con esta enfermedad.

## **OBJETIVO**

Nuestro objetivo principal es analizar el comportamiento del EB y del ACE en nuestra Área Sanitaria. Como objetivos secundarios estudiaremos los factores de riesgo asociados al EB, su comportamiento histológico a lo largo del seguimiento así como la supervivencia y causas de defunción en este tipo de pacientes.

## **MATERIAL Y METODO**

Estudio unicéntrico observacional, retrospectivo y longitudinal. Los datos se obtuvieron mediante la revisión retrospectiva de la base de datos del Área Sanitaria

Virgen Macarena, Sevilla. Se incluyeron todos los pacientes con diagnóstico de EB y/o ACE entre enero de 1996 y marzo del 2011. El periodo de seguimiento se calculó desde el diagnóstico de EB hasta la fecha de última endoscopia con biopsia esofágica. El periodo de supervivencia se estableció desde el diagnóstico inicial del EB hasta la fecha de última consulta o defunción.

Los pacientes fueron divididos inicialmente en 2 grupos: (1) EB y (2) ACE y posteriormente en cuatro subgrupos según el comportamiento histológico del EB a los largo del seguimiento. Valoramos aspectos demográficos tales como sexo, edad, tabaquismo (considerando como positivo un consumo según Índice Tabáquico >10), etilismo (considerando como positivo una ingesta de >15 Unidades/semana hombre y >12 Unidades/semana mujeres), tiempo de seguimiento (meses), supervivencia (meses) y las causas de defunción en cada uno de los subgrupos.

### **Análisis estadístico.**

Las variables cuantitativas se expresaron como media y desviación estándar (DE), y las variables cualitativas como número absoluto y porcentaje. El análisis estadístico de las variables cuantitativas para grupos independientes se realizó con el test paramétrico de la t de Student y el test no paramétrico de la U de Mann Whitney. Para cuantitativas no dicotómicas el análisis de la varianza (ANOVA). Para el estudio estadístico de las variables cualitativas empleamos el test de chi-cuadrado de Pearson ( $\chi^2$ ). Se valoró la *Odds Ratio* (OR) de cada uno de los factores de riesgo en los diferentes grupos y se analizó la supervivencia mediante curvas de Kaplan-Meier y el test de log-Rank.



## **RESULTADOS**

Durante el periodo estudiado (enero de 1996 - marzo del 2011) se realizaron un total de 38 929 endoscopias digestivas altas con hallazgos “sugestivos” de EB en 850 casos. Se obtuvo confirmación histopatológica en 649 muestras (prevalencia global del 1.7%) correspondientes a 263 pacientes. 92 pacientes fueron diagnosticados de ACE sin diagnóstico previo de EB.

### **Tasas de incidencia del EB y ACE**

Según los diferentes periodos de tiempo estudiados y tomando en cuenta nuestra población de referencia aproximada (400 000 hab), la mayor tasa de incidencia (TI) para EB se obtuvo entre enero 2008 y diciembre 2009 (76/100 000 hab), y para ACE entre enero 2010 y diciembre 2011 (19/100 000 hab). La mayor parte de los pacientes presentaban un EB corto (250 casos, 74%).

### **Características sociodemográficas por grupos**

- **Grupo EB vs ACE**

Se estudiaron un total de 430 pacientes, la mayor parte de ellos con EB (79%) corto (74%) mientras que 92 pacientes (21%) presentaron ACE sin diagnóstico previo de EB. La mayoría fueron hombres, tanto en el EB como en el ACE (75% y 88% respectivamente), valores estadísticamente significativos respecto a las mujeres ( $p < 0.05$ ). La media de edad fue de 53 años en el EB y de 67 en el ACE ( $p < 0.05$ ). El grupo más afectado fue el de la franja de edad de 50-59 años para el EB con una TI de 20/100 000 personas año mientras que en el caso del ACE, la franja con mayor tasa de incidencia fue la comprendida entre los 70-79 años (6,5/100 000 personas-año).

Se observa además que, mientras la TI en el caso del EB aumenta de forma progresiva conforme se progresa en edad, y disminuye a partir de la séptima década de la vida, la de ACE aumenta de forma lineal hasta la octava década de la vida, para, a partir de entonces, empezar a disminuir.

La mayoría de pacientes, tanto en el EB como en el ACE, presentaba antecedentes de consumo de alcohol (52% y 81% respectivamente) y tabaco (63% y 76%, respectivamente), valores que resultaron estadísticamente significativos en el caso del alcohol [ $p < 0.05$  OR 3.7 (IC 95% 1.4-9.5)], mas no en el tabaco [ $p = 0.16$  OR 1.8 (IC 95% 0.7-4.1)].

El seguimiento en el grupo de EB tuvo una media de 30 meses (0-175). La supervivencia del EB fue estadísticamente superior respecto al ACE (92 vs 24 meses,  $p < 0.05$ ) La mortalidad global para el EB fue del 6.2% mientras que para el ACE del 89% ( $p < 0.05$ ).

- **Análisis por Subgrupos**

La mayor parte de pacientes presentaban EBSD 270 (62,7%) y eran predominantemente del sexo masculino en todos los grupos. La población más joven correspondía a EBSD ( $\bar{x} = 53$  años) mientras que el grupo ACE presentaba la mayor edad ( $\bar{x} = 66.6$  años). Hubo mayor proporción de pacientes con EB corto en los grupos EB sin displasia y EBDE respecto al grupo EBPG con valores estadísticamente significativos [ $p < 0.01$  y  $p = 0.014$  OR de 4.3 (IC 95% 2.2-8.6) y 0.27 IC (0.09-0.7) respectivamente]. Observamos una mayor proporción de consumo de alcohol en el grupo ACE respecto a los grupos EBSD y EBDE ( $p = 0.003$  y  $p = 0.044$  respectivamente). La mayor supervivencia se observó en el grupo EBPD (115.3 meses), estadísticamente

significativa respecto al resto de los grupos ( $p < 0.01$ ). La mortalidad fue estadísticamente superior en el ACE respecto al resto de grupos ( $p < 0.001$ ).

De los 338 pacientes con EB (270 sin displasia, 28 con displasia estable y 40 con progresión de cambios histológicos), 8 (2.4%) evolucionaron a ACE durante el seguimiento, de estos, 2 (25%) fallecieron por complicaciones relacionadas a la enfermedad neoplásica; el primero de ellos debutó con DAG y falleció 31 meses más tarde y el segundo debutó con EB sin displasia, con cambios histológicos evolutivos hacia ACE, siendo éxitus a los 60 meses del diagnóstico inicial del EB.

## **CONCLUSIONES**

Existe una mayor incidencia y prevalencia tanto del EB como del ACE en los últimos años. Como FR encontramos el sexo masculino, mayor edad y consumo de alcohol. El EB largo (>3 cms) está implicado en la progresión del EB. La enfermedad cardiovascular y neoplásica no esofágica han sido las principales causas de mortalidad en los pacientes con EB. El diagnóstico de ACE ha sido, mayormente, como debut de la enfermedad neoplásica.

**PALABRAS CLAVE:** Esófago, Esófago de Barrett, Adenocarcinoma esofágico, Displasia de alto grado.

## 1.2 Uso de los biomarcadores TWIST, p504s y CD 133 en la valoración de la progresión del Esófago de Barrett

### INTRODUCCIÓN

La inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica que ha revolucionado la histopatología. Según el sitio de localización, la inmunomarcación de antígenos celulares puede presentarse en la membrana, el núcleo o el citoplasma. Con los recientes avances en el campo de la biología molecular, los investigadores se han dado a la tarea de caracterizar aquellos eventos decisivos que ocurren durante la transformación metaplasia-displasia-carcinoma. El uso de estos biomarcadores podría aportar una herramienta simple, reproducible y certera en la valoración de la progresión neoplásica. A medida que las células del EB progresan a displasia, adquieren alteraciones genéticas secuenciales que las acercan gradualmente hacia una transformación cancerígena. Recientes investigaciones han destacado el importante papel de diversos biomarcadores de crecimiento tumoral en el diagnóstico y seguimiento de diversos tipos de tumores gastrointestinales, incluido el ACE en el EB, sin embargo, en el momento actual, el gold standard para valorar el riesgo de progresión y malignización en el EB, sigue siendo su estratificación histopatológica. En lo que respecta a las diferentes técnicas a utilizar en nuestro estudio, sabemos que el CD 133 (también conocido como AC 133) es una glicoproteína transmembrana de cinco dominios que es expresada de forma selectiva en células madre hematopoyéticas y células progenitoras provenientes de la médula ósea fetal y adulta, cordón umbilical y sangre periférica. Es un marcador de células madre de una gran variedad de tejidos no hematopoyéticos incluyendo células neuronales y gliales en el cerebro fetal y células de progenitoras neuronales en la piel. El CD133 es un marcador expresado por un número limitado de células tumorales llamadas células madre carcinogénicas (CMC) que parecen ser responsables de iniciar el proceso de diferenciación celular tumoral, las

metástasis y la recurrencia, además de poseer capacidad auto-replicativa, potencial de diferenciación múltiple, capacidad proliferativa y carcinogénesis.

La  $\alpha$ -metilacil-coenzima A racemasa (AMCAR/P504S), pertenece a la familia de la caiB/baiF coA-transferasa. Localizada en el peroxisoma y la mitocondria es una enzima involucrada en la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga. La sobreexpresión de la proteína AMCAR se encontró presente en varios tipos de cáncer tales como colo-recto, próstata, ovario, mama, vejiga, pulmón, carcinoma de células renales, linfoma y melanoma. También se encuentra presente en los adenomas de colon y adenocarcinomas pero no en epitelio colónico normal lo que sugiere podría tener un importante papel en el desarrollo de tumores gastrointestinales.

Twist1 y Twist2 son los principales reguladores de la embriogénesis. Se ha demostrado que en condiciones patológicas Twist1 favorece la migración metastásica de células cancerosas a través de su capacidad para inducir una transición epitelio-mesenquimal. TWIST ha sido relacionada con un gran número de procesos tumorales entre los que destacan el cáncer colorrectal y pulmonar. Parece igualmente estar relacionado con la capacidad de progresión de la displasia hacia ACE en el EB aunque la evidencia obtenida hasta el momento es escasa.

## **OBJETIVO**

El objetivo primario fue determinar la utilidad del uso de los marcadores inmunohistoquímicos TWIST, CD133 y P504S en la valoración de la progresión de displasia en pacientes con esófago de Barrett y ACE. Como secundarios estudiar la utilidad de estos marcadores como auxiliares en la valoración histopatológica de la displasia y del adenocarcinoma esofágico.

## **MATERIAL Y METODO**

Tomando como punto de referencia el estudio previo, se incluyeron pacientes de cada uno de los subgrupos según el comportamiento histopatológico observado. Las diferentes técnicas de IHQ fueron realizadas en aquellos casos cuyas piezas quirúrgicas/biopsias endoscópicas fueran recuperables y tuvieran material suficiente para la realización de las mismas.

Una vez analizado el tamaño de la muestra necesario, los pacientes fueron categorizados según las características histopatológicas observadas y se incluyeron para su estudio mediante las diferentes técnicas inmunohistoquímicas (CD 133, p504s y TWIST).

Se utilizó el sistema de calificación rápida (Q-score) de Allred basado en la intensidad y proporción de la tinción.

La segunda parte del estudio inmunohistoquímico incluyó un análisis utilizando a cada paciente como su propio control. Se llevaron a cabo tinciones de IHQ a diferentes zonas (mucosa normal, EBSD y EB con displasia, además de las zonas de ACE) de las piezas quirúrgicas extraídas (esofagectomías) con diagnóstico de ACE a fin de buscar diferencias en la expresión IHQ en cada una de las diferentes tinciones estudiadas.

### **Análisis estadístico**

Para el cálculo del tamaño de muestra se utilizó la fórmula basada en la proporción. Las diferencias entre los grupos se estudiaron mediante el empleo de la Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) si menos del 20% de las casillas contenían valores menores a 5 ( $n < 5$ ); en los casos en que esto no se cumplió ( $> 20\%$  de las casillas con valores  $< 5$ ), se utilizó el test exacto de Fisher. Para el análisis de variables cuantitativas se utilizó el test de

ANOVA. Finalmente, para la comparación de proporciones entre grupos relacionados (siendo cada paciente su propio control) se utilizó la Q de Cochran.

## **RESULTADOS**

Se incluyeron 71 pacientes en el grupo control ("Mucosa normal"), 110 en el grupo Esófago de Barrett sin displasia ("EBSD"), 72 en el grupo "EB con displasia" y 34 en el grupo "ACE". No se observan diferencias estadísticamente significativas en las variables comparadas (Sexo, edad, Consumo de alcohol o tabaco ni en el IMC) La tinción CD 133 se observó, principalmente, en la zona apical, tanto de la membrana como del citoplasma en el caso de tejido tumoral. Ésta tinción también resulto francamente positiva en las glándulas submucosas de los pacientes con EB así como en zonas necróticas y detritus celulares. En el caso de p504s, la tinción fue de tipo granular localizada a nivel del citoplasma celular. La expresión del TWIST fue muy heterogénea, resultando positiva a nivel nuclear y citoplasmático en una gran variedad de tejidos, desde células del estroma, hasta linfocitos, folículos linfoides y células inflamatorias; lo cual, aunado a la falta de experiencia en el uso de esta técnica IHQ, hace que los resultados sean confusos y muy poco satisfactorios.

En el caso del CD 133, éste resulta mayormente negativo en los casos de "Mucosa normal" y "EB sin displasia", mientras que se vuelve progresivamente positiva a medida que avanzan los cambios histológicos, siendo francamente positiva en los casos de "EB con DAG" y "ACE".

En lo que respecta al p504s, vemos que resulta completamente negativo en los casos de "mucosa normal" mientras es predominantemente negativo en los casos de "EB sin displasia". Al igual que en el caso del CD 133, a medida que progresan los cambios histológicos, estos se acompañan de cambios en las proporciones de

positividad a la tinción; de esta forma, ya encontramos que hasta casi el 70% de los casos con DBG son positivos, situación que progresa hasta el 93% en los casos de DAG y del 68% en el ACE.

Mediante el empleo de la fórmula estadística seleccionada en donde cada paciente fue su propio control, se encontraron diferencias en las proporciones de positividad tanto del CD 133 como del p504s a medida que progresan los cambios histológicos en la línea metaplasia-displasia-adenocarcinoma.

## **CONCLUSIONES**

En los pacientes con esófago de Barrett, CD 133 se expresa tanto a nivel luminal en las glándulas submucosas como a lo largo del trayecto de su conducto excretor hacia la luz esofágica, por lo que podrían ser éstas células el origen del epitelio de Barrett. La P540s presentó un patrón de tinción citoplasmático siendo más positiva en los casos de displasia que en los casos sin displasia. La expresión de CD 133 es más frecuente en los casos de DAG y ACE respecto a la DBG, por ello, una tinción positiva podría estar relacionada con un peor pronóstico. La expresión de p504s con su característico patrón citoplasmático, resultó más frecuente en los casos de EB con displasia, tanto de bajo como de alto grado, respecto a la metaplasia de Barrett sin displasia. Mientras que, tanto el CD 133 como la p504s podrían ser útiles en identificar aquellos casos de EB que presenten dudas respecto a la displasia, sobre todo para patólogos no expertos y en centros no especializados, el TWIST presenta múltiples dificultades técnicas y de interpretación, que hacen muy difícil su uso rutinario en la práctica clínica habitual.

**PALABRAS CLAVE:** Esófago, Esófago de Barrett, Adenocarcinoma esofágico, Displasia de alto grado.



## **2. INTRODUCCIÓN**

## 2.1 Antecedentes históricos sobre el Esófago de Barrett

En la nomenclatura relativa al Esófago de Barrett (EB) caben las mismas críticas respecto al uso de epónimos en medicina, generalmente dan poca información acerca de la condición a la cual se refieren, con frecuencia immortalizan a médicos que no fueron los primeros en describir las condiciones que llevan su nombre, y los estudios posteriores pueden demostrar que las descripciones originales de los investigadores en referencia fueron, en algunas ocasiones incorrectas o parcialmente equivocadas; estas consideraciones en el EB no son la excepción y, de hecho, se cumplen [1-3]. Sin embargo, quizá sea esta misma situación, la que nos ayude a recordar el lado humano y personal que ha rodeado, casi invariablemente, a los avances en medicina.

Norman R. Barrett nació el 16 de Mayo de 1903 en Adelaida, al Sur de Australia. Dejó su tierra natal a los 10 años de edad para irse a radicar con su familia a Inglaterra, regresando sólo una vez, en 1963 como profesor visitante. Fue un reconocido cirujano de Tórax y trabajó en el Hospital St. Thomas's desde 1935 hasta el final de su carrera [2].

Fue el primer editor quirúrgico de la revista Thorax, permaneciendo como editor desde 1945 hasta 1971 llegando a publicar más de 70 artículos, sobre diversos tópicos, la mayoría relacionados con lo que posteriormente se conocería con EB. Como investigador quirúrgico, Ellis y Olsen, en la dedicatoria de su volumen sobre acalasia [4], se refieren a él como "The Doyen of Esophageal Surgery".

Barrett nunca reclamó ser el primero en describir el esófago distal cubierto por epitelio columnar, e inclusive llegó a referir hasta en nueve ocasiones posibles estudios previos [5-6]. Fue Philip Allison, quien en 1953, en un artículo de la revista Thorax [7] acuñó el nombre de "Úlceras de Barrett" a las que previamente Norman Barrett había

descrito en 1950 en la revista *British Journal of Surgery* [5], como “úlceras pépticas crónicas del esófago”, y al epitelio columnar tipo-gástrico circundante, a su vez, lo denominó como “Esófago de Barrett”.

De esta manera, se hace interesante poder consignar algunos aspectos del desarrollo histórico de la definición del EB, pues hay pocos términos en medicina que han implicado tantas cosas diferentes para gentes diferentes [8]. Citando a Modlin y Sachs [9] quienes a su vez realizaron una revisión de la historia y terminología de Barrett publicada por Stuart Jon Spechler [10], en 1950, Norman Barrett [5] define el esófago como “aquella parte del tracto digestivo superior, distal al esfínter cricofaríngeo, el cual está cubierto por un epitelio de tipo escamoso”. Él describió en su artículo un número de pacientes que tenían ulceraciones en un órgano tubular, intratorácico que parecía ser el esófago excepto que su porción distal estaba recubierta extensamente por un epitelio columnar de tipo gástrico. Desde que el esófago era, por definición, una estructura cubierta por epitelio escamoso, Barrett creyó que el órgano recubierto por epitelio columnar era un segmento tubular del estómago generado por tracción inducida por un esófago-corto congénito (cubierto por epitelio escamoso) y arrastrado dentro de la caja torácica. En su artículo, Barrett no identificó hallazgos de metaplasia intestinal en el epitelio columnar. Esta observación también fue descrita en 1951 por Bosher y Taylor [11], quienes comentaron acerca de la apariencia de la mucosa gástrica heterotópica en el esófago con formaciones de ulceración y estenosis. Notaron que la mucosa gástrica estaba compuesta de glándulas las cuales contenían células tipo “goblet”, pero no células parietales. Un año más tarde, en 1952, Basil Morson junto a Belcher [12] sugirieron la posible relación del adenocarcinoma de esófago y la mucosa gástrica ectópica puntualizando que, en un individuo con adenocarcinoma de esófago, la mucosa exhibía cambios atróficos hacia un tipo intestinal que contiene muchas células tipo “goblet”.

En 1953, Allison y Johnston [7] hicieron notar que Barrett se había equivocado en identificar la estructura intratorácica cubierta por epitelio columnar como estómago y que en realidad era el esófago cubierto por un epitelio de tipo columnar. Así que, 7 años después de la publicación de su trabajo original, Norman Barrett [13] aceptó que el órgano con epitelio columnar que él previamente creyó que era el estómago, era de hecho el esófago y sugirió que la condición se denominase como “esófago distal cubierto por epitelio columnar” (Figura 2.1).



**Fig. 2.1.** Composición de la fotografía de Norman Barrett y su comunicación original de 1957, acerca del epitelio columnar en esófago distal, según adaptación de Modlin y Sachs [9].

En 1959, Moersch y colaboradores [14] sugirieron que el epitelio columnar podría no ser congénito, sino adquirido como una consecuencia de la esofagitis de reflujo. En 1961, Hayward [15] envió un trabajo a la revista Thorax, de la cual Barrett era editor principal, indicando que el esófago columnar distal era un proceso metaplásico potencialmente reversible y secundario al reflujo gastro-esofágico. A pesar de ello Barrett continuó promoviendo una etiología de desarrollo congénito para el epitelio columnar distal. Es de resaltar la posición de Barrett al respecto, ya que en 1957 él sostenía que si por cualquier razón la cubierta escamosa del esófago distal fuese destruida, podría ser, en teoría, reemplazada por células columnares [13].

Desde la década del 60 hasta mediados de los 70 no sólo los trabajos respecto al EB eran escasos, sino que, además, se mantenía la controversia acerca de la naturaleza de los hallazgos histológicos del epitelio de Barrett. Este hecho fue zanjado en 1976 por un trabajo realizado por Paull A. y colaboradores [16]. En su estudio, realizado sobre once pacientes, tomaron biopsias guiadas por manometría, lo cual dio lugar a la clasificación de Barrett fúndico (con células principales y parietales), de la unión (glándulas mucosas sin células parietales) y especializado (superficie vellosa, glándulas mucosas, células caliciformes, sin células parietales ni principales). El más común, el especializado, siempre era el más proximal y el único que mostraba la capacidad de displasia o malignización. Al ser el epitelio de Barrett un epitelio de tipo glandular, los carcinomas que se originan allí, son en general del tipo adenocarcinoma, sin embargo, diferentes trabajos [17-19], han evidenciado que algunos carcinomas muestran la capacidad de migrar hacia otras variedades histológicas, fundamentalmente hacia la variedad epidermoide.

En los 80's, diversos investigadores [20-23] establecieron criterios arbitrarios en la definición del EB, considerando su presencia sólo si la extensión del esófago tubular distal cubierto con epitelio columnar fuese de 3 ó más centímetros. Esto fue realizado con fines de investigación y para poder evitar así los diagnósticos falsos positivos, consignando además los autores, que la displasia fue el hallazgo más serio de potencial degeneración maligna en el epitelio de Barrett y que, a su vez, estaba particularmente asociada con el epitelio de tipo intestinal. Al limitar el diagnóstico a una extensión igual o mayor de 3 centímetros, se estaba obviando la presencia de epitelio columnar sobre todo de tipo intestinal en los 2 a 3 últimos centímetros del esófago distal, además, se empezó a reconocer cada vez con mayor claridad que el riesgo de cáncer residía primariamente en el epitelio especializado de metaplasia intestinal y no en el de tipo gástrico. Esto ha llevado a que algunos autores opinen que "el diagnóstico del EB se debe restringir solamente a aquellos casos que tengan al menos una biopsia con la

presencia de células “goblet” [24] así, el criterio diagnóstico del EB ha pasado las últimas décadas de considerarse a un esófago extensamente comprometido por epitelio gástrico, hasta la presencia de cualquier extensión de metaplasia intestinal.

El EB tradicionalmente ha sido asociado con la enfermedad del reflujo gastro-esofágico y con el adenocarcinoma, consecuentemente. Los estudios acerca del esófago de Barrett han sido conducidos bien por investigadores primariamente interesados en el reflujo gastro-esofágico (RGE) o bien por aquellos focalizados primariamente en cáncer, por lo que estos investigadores frecuentemente han diferido en sus perspectivas y aproximaciones para el estudio del EB. Estas diferencias han contribuido a mantener la controversia acerca de la naturaleza del desorden, y esta controversia acerca de la definición persiste, ya que el mismo término de EB es artificial, y por los últimos 40 años dicha entidad ha sido definida de diversas maneras y por diferentes investigadores quienes han impuesto criterios arbitrarios para acomodar sus perspectivas personales [25].

Si la exacta localización de la unión esófago-gástrica no puede ser identificada con precisión, entonces cualquier evaluación de la extensión del esófago cubierto por epitelio columnar, es inherentemente imprecisa.

Precisamente en esta línea de pensamiento diversos estudios [26-30] han enfatizado el potencial pre-maligno de segmentos de metaplasia intestinal menores de 3 cms. Una serie de estudios remarcan que el riesgo del esófago de Barrett corto para desarrollar el adenocarcinoma está presente, si bien en menor proporción respecto a la variedad del esófago largo, por lo que se recomienda el control clínico, endoscópico y la toma de muestras para ambos grupos.

De esta manera regresamos al principio, esto es, la presencia de epitelio columnar en el esófago distal, sea de metaplasia intestinal o gástrica. Resulta pues evidente un

padecimiento, por parte del paciente, de la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), lo que a su vez afectará a un pequeño grupo de pacientes quienes desarrollarán EB y, una parte de estos, finalmente, tendrá la complicación del adenocarcinoma de esófago (ACE) [31-32]. Visto así, en perspectiva, el EB traduce una complicación de la ERGE, y esto debe hacer que el endoscopista al realizar el estudio de estos pacientes, tenga que dejar constancia de la sospecha y biopsiar cualquier hallazgo que sugiera una metaplasia columnar.

Actualmente, se define el EB como aquel que muestra, endoscópicamente, la sustitución del tejido escamoso por otro de aspecto columnar metaplásico. Esta observación debe ser claramente visible y situarse 1 cm por encima de la unión esofagogástrica. La observación endoscópica debe ser confirmada mediante el estudio histopatológico de las biopsias [33].

Esta manera de definir el EB con relación a su potencialidad de desarrollo del adenocarcinoma, orienta al especialista hacia un esfuerzo concentrado en la detección y tratamiento precoz de la neoplasia del esófago, sin embargo deja de lado a la metaplasia columnar de tipo gástrico que también tiene relación con la ERGE, y que a partir de esta definición se queda sin nombre propio, más bien sólo con una denominación o terminología con sustento histológico. Como hemos revisado en los últimos 60 años, el nombre de EB fue dado originalmente a la metaplasia columnar gástrica y actualmente el péndulo se ha movido hacia la esquina del interés de los que investigan el campo del desarrollo de las neoplasias.

La definición del EB con el criterio endoscópico aunado al criterio histológico, tiene un claro sustento en la evolución molecular de la secuencia Metaplasia-Displasia-ACE [34-36]. Basados en observaciones de diversos tipos de tumores, las alteraciones genéticas que dan lugar a aberraciones cromosómicas como origen del cáncer, han sido divididas en dos tipos: (1) acumulación gradual de mutaciones puntuales que dan

lugar a la aparición de cáncer a los largo de décadas (cáncer colorrectal) o (2) adición o pérdida de grandes fragmentos, o cromosomas enteros que dan lugar al desarrollo de cáncer de forma acelerada (por ejemplo, cáncer de próstata). Dado que el ACE presenta, a diferencia de otros tipos de cáncer gastrointestinal, gran número de alteraciones genéticas (CDKN2A LOH, TP53, LOH y aneuploidia), encajaría en el segundo tipo de desarrollo de carcinogénesis [37]. Hay experimentos que sugieren que la pérdida del alelo 17p (p53), precede a la pérdida del alelo 5q (APC), durante la progresión neoplásica en el EB, este ordenamiento de pérdida de alelos tipo 17p (p53) a 5q (APC) contrasta con aquel propuesto para el cáncer de colon, en el cual la pérdida del alelo 5q (APC) tiende a preceder a la pérdida del alelo 17p (p53), lo cual sugiere un orden genético invertido de pérdida de alelos en el desarrollo del adenocarcinoma asociado al EB, sin embargo, y como ya se comentó, no se debe perder la perspectiva de que la presencia de metaplasia columnar en esófago, refleja la ERGE y, más aún, hay estudios recientes que revelan la fuerte asociación entre los síntomas del RGE y el riesgo de ACE, independientemente de la presencia del EB [38-41].

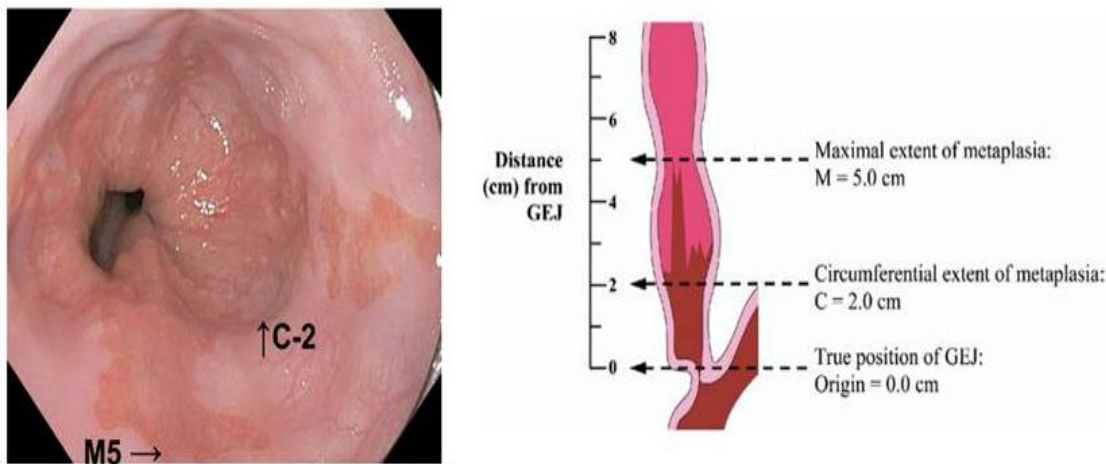
Con la ayuda de los avances tecnológicos en materia de genética y bioinformática, se han desarrollado modelos que pretenden explicar la secuencia que da origen al EB, y que lo posicionan como una clara enfermedad que evoluciona debido a una selección clonal donde el Índice de diversidad (“Diversity índices”) se sitúa como un factor predictor del desarrollo de ACE sobre EB [42].

Por esta definición moderna, irónicamente, ninguno de los pacientes que Barrett describió, tenía EB [25].

Si la definición aceptada actualmente privilegia el sustento histológico de metaplasia intestinal como se ha descrito, el criterio previo de definir el Esófago de según su extensión, debe ser siempre consignado, pues las medidas y formas son importantes a la hora de realizar estudios comparativos, manteniendo un mismo



lenguaje para evitar errores y apreciaciones subjetivas en la extensión de la enfermedad. Hoy día se considera la clasificación de Praga [43-44] como la mejor en lo que se refiere a valoración endoscópica del EB. En ésta, cada segmento de Barrett se describe como su extensión circunferencial (C) y la máxima extensión longitudinal (M).  
Figura 2.2.



**Fig 2.2** Clasificación de Praga. Ejemplo de un EB C2M5 (C2= circunferencia localizada a 2 cms de la unión esofagogástrica, M5= extensión máxima de metaplasia a 5 cms de la unión esofagogástrica). (*Sharma P et al. Gastroenterology 2006*).

Merece la pena subrayar que si bien la prevalencia del EB se incrementa con la edad, no sucede de la misma manera con la longitud del mismo, esto es, que de acuerdo a las observaciones de diversos investigadores, estos sugieren que el epitelio de Barrett se desarrolla a su máxima longitud rápidamente, permaneciendo estable por muchos años. Sin embargo, los aspectos demográficos y de patogénesis de ambas entidades parecen ser similares, sugiriendo que ellas representan la continuidad de una sola entidad [45-46].

## 2.2 Incidencia del Esófago de Barrett y del Adenocarcinoma Esofágico

El EB fue raramente diagnosticado antes del uso extendido de la endoscopia flexible, y los estudios consignados antes de la década del 70, eran hechos con base a estudios utilizando endoscopios rígidos [47]. Si bien se conoce que la prevalencia de los síntomas del RGE en la población adulta en general, en países de occidente, es de alrededor del 20%, en los que tienen un episodio de pirosis diario y de alrededor del 7% en los que manifiestan un episodio de pirosis semanal, la prevalencia del EB en la población general no puede ser estimada de la información precedente, debido a que muchos pacientes no tienen una historia previa de RGE [48-50]. Cuando se ha evaluado su prevalencia, ésta ha sido en base a estudios realizados con pacientes sometidos a endoscopia digestiva alta. Se ha estimado que la metaplasia de Barrett presenta una prevalencia del 1.2% en la población general, sin embargo, cuando se analizaron pacientes con síntomas de RGE, esta prevalencia aumentó hasta situarse cerca del 2.3%, aunque series más antiguas la estiman hasta en el 20% de los pacientes con ERGE [51]; en presencia de esofagitis la prevalencia aumenta hasta situarse en el 2.6% de los casos [52]. Por tanto, se concluye que “es razonable decir que alrededor del 1% de pacientes que acuden a los servicios de endoscopia, por cualquier razón, tendrán EB y que la prevalencia del mismo se incrementa hasta alrededor del 2-4%, cuando los pacientes se presentan con síntomas de RGE, siendo este padecimiento más frecuente en hombres que en mujeres” [47].

Una observación que merece la pena destacar es que, cuando se han realizado estudios de prevalencia de Barrett en pacientes sometidos a necropsia, esta se incrementa hasta en 16 veces (prevalencia estimada de 376 casos/100 000 habs), lo que lleva a la conclusión de que la mayoría de los individuos con EB en la población general, no son diagnosticados [53].

La prevalencia del EB en el sur de Europa, según estudios obtenidos desde servicios de endoscopia, se ha incrementado de forma alarmante en los últimos años, pasando del 6.51 a 76.04/100 000 habitantes (1985-2001) [54]. La tasa más alta de EB en pacientes sometidos a endoscopia digestiva alta por síntomas de ERGE la tiene España con una prevalencia cercana al 12%, si tomamos en cuenta que cuenta con una población aproximada de 4,5 millones, tendríamos un total de 540 000 personas afectadas de EB; a esta alta prevalencia le siguen Italia con el 1.5% y Alemania con el 1.3% de la población con ERGE afecta de EB [55]. En Inglaterra, la prevalencia se ha incrementado de 0.8- 2% en los períodos evaluados de 1987-1996 [31] hasta el 4.6% en 2004 [56].

En Asia, las enfermedades del esófago (RGE, esofagitis erosiva, EB y el ACE), son infrecuentes, sin embargo, al igual que en países occidentales, el EB ha aumentado su prevalencia a niveles alarmantes en los últimos años, según estudios realizados en Malasia [57], Corea del Sur [58], Japón [59], China [60] e India [61]. También el ACE ha mostrado aumento en Singapur [62], Japón [63] e Irán [64]. En Singapur la incidencia ajustada a la edad (IAE) para carcinoma escamoso de esófago (CEE) ha disminuido de 8.31 a 3.85 /100 000 habitantes, en el caso de los hombres, y del 3.43 al 0.81/100 000 hab, en el caso de las mujeres mientras que la IAE en lo que respecta al ACE ha aumentado del 0 al 0.54/100 000 hab en el caso de los hombres y del 0.03 al 0.13/100 000 hab en el caso de las mujeres [62]. La prevalencia en Japón, en adultos que acuden a los servicios de endoscopia es de alrededor del 0.6%, con predominancia del sexo masculino y una edad promedio de 60 años [58]. El carcinoma epidermoide aún continúa siendo el cáncer dominante en Japón, con el ACE explicando menos del 5% de las neoplasias de esófago [63].

El aumento del número de neoplasias (ACE) asociadas a ERGE y EB se ha intentado explicar por varios motivos, siendo el principal la “occidentalización” de la dieta y de los hábitos de vida. Esto ha traído consigo un aumento en las tasas de

obesidad central, ERGE, además del mismo efecto cancerígeno de los productos procesados. También la erradicación sistemática de *H. pylori* se ha mostrado que ha condicionado este aumento, al ser, la colonización por esta bacteria, un factor protector para el desarrollo de ACE [65-66]. Aunque el tabaco se ha mostrado como FR en el desarrollo del EB en Corea del Sur y Malasia [67-68], no existe un consenso universal sobre su grado de implicación en el desarrollo del EB en países asiáticos.

En países del África y del Oriente Medio, el EB y el ACE son infrecuentes, siendo la neoplasia prevalente el carcinoma epidermoide. En países tales como Uganda, Kenya, Nigeria, Etiopía y Zimbabwe, el EB es raro (casi no existe), con el ACE que explica únicamente el 4-6% de todas las neoplasias de esófago. Por otro lado, la infección por *H. pylori* en esta población es extremadamente común. Por ejemplo, en Soweto, África del sur, el 46% de niños han adquirido el *H. pylori* al año de edad, y el 100% alrededor de los 12 años. Se ha sugerido que la alta prevalencia de la infección por el *H. pylori* en estos países, podría llevar a una reducción en la secreción de ácido por parte del estómago y a una consecuente reducción en el RGE, pudiéndose explicar de esta manera la baja prevalencia de enfermedades del esófago relacionadas al factor de la producción del ácido, si bien esta hipótesis aún no ha sido confirmada [69-71].

## 2.3 Factores de riesgo en el desarrollo del Adenocarcinoma esofágico sobre Esófago de Barrett

### 2.3.1 Factores innatos

#### 2.3.1.1 *Edad*

Aunque varios estudios han intentado evaluar el papel de la edad en el riesgo de progresión del EB hacia displasia/ACE, hasta la fecha no hay resultados concluyentes [72-74]. Uno de estos estudios, realizado en la Cleveland Clinic, demostró el papel de la edad en la progresión del EB hacia cualquier tipo de displasia [75], resultado que se confirmó posteriormente en un amplio estudio que incluyó 4205 pacientes [76]. En este estudio, los autores encontraron una incidencia de EB de 2/100 000 personas-año en el grupo de edad correspondiente a los 21-30 años que se incrementaba de forma muy importante hasta alcanzar los 31/100 000 personas-año en el grupo de los 61-70 años. Se ha estimado que el riesgo de desarrollo de ACE en el EB se incrementa un 6.6% por cada 5 años que aumenta la edad [77]. Sin embargo, otro estudio no demostró ninguna diferencia en el riesgo de progresión al separar pacientes <50 y >50 años [78]. Aunque estudios multicéntricos han aportado algo más de evidencia al respecto, al encontrar que los pacientes más “añosos” presentan mayor riesgo de progresión [79], la evidencia encontrada hasta ahora es débil a la hora de realizar afirmaciones a este respecto. Por tanto, quizá lo más razonable sería concluir que, aunque con evidencia débil, la edad puede tener un papel en el desarrollo de displasia/ACE al actuar con un FR independiente.

#### 2.3.1.2 *Sexo*

En este aspecto los resultados de diversos estudios son bastante homogéneos en sus conclusiones, el sexo masculino es más prevalente tanto en pacientes con EB,

como en pacientes con ACE [80-83], con una incidencia aproximada en el caso del EB de 31/100 000 personas-año (95% IC 28 a 34), en el caso de los hombres y de 17/100 000 personas-año (95% IC 15-20) en el caso de las mujeres; respecto al ACE la incidencia aproximada es de 4.2/100 000 personas-año (95% IC 3.8-4.5) para los hombres y 0.6/100 000 personas-año (95% IC 0.4-0.7) para las mujeres. Esto se puede interpretar como una mayor prevalencia para los hombres de 2:1 y de 4:1 para EB y ACE respectivamente [76]. Sin embargo, como no podría ser de otra manera, también existe evidencia que refuta esta observación al no encontrar diferencias significativas. En este caso, se trata de un estudio prospectivo [73], débil en su metodología lo cual nos hace tomar con cautela sus conclusiones.

El porqué el sexo masculino es un FR independiente no está claro hasta la fecha. Algunos autores han especulado sobre que sea debido a que los hombres son más propensos a un patrón de obesidad visceral respecto a las mujeres, sin embargo, no hay nada concluyente al respecto.

Por tal motivo, y ante la gran cantidad de evidencia que existe a su favor, sería razonable admitir que el sexo masculino es un FR independiente que confiere a los hombres, respecto a las mujeres, 2-3 veces más riesgo de desarrollo de EB y, cuando éste está presente, 3-4 veces más riesgo de que evolucione hacia ACE.

### **2.3.1.3 Raza**

Al igual que en el caso anterior, en lo que respecta al origen étnico como FR de EB, los resultados son bastante homogéneos. Los caucásicos parecen ser la población más frecuentemente afectada, tanto para el EB como para el ACE [84-85]. Los análisis más importantes a este respecto han sido realizados utilizando bases de datos de los EEUU [86]. En este estudio, respecto al ACE, la población caucásica muestra una incidencia del doble respecto a los hispanos y cuatro veces más respecto a los afroamericanos, asiáticos, de las islas del Pacífico y nativos americanos. Cabría esperar

que dadas las importantes diferencias en lo que respecta al acceso a los recursos sanitarios (teniendo los inmigrantes, en general poco acceso a servicios sanitarios y pólizas de seguros más bajas) las diferencias se debieran a este sesgo de selección; sin embargo, este estudio toma en cuenta este factor, al realizar un estudio estratificado según los distintos distritos geográficos ajustándose a similares prestaciones sanitarias. De hecho, otro estudio, también de índole epidemiológica, pero esta vez enfocado al estudio de prevalencia de ERGE en los distintos grupos étnicos ha encontrado similares resultados, a similar incidencia de RGE, son los caucásicos son los más frecuentemente afectados por ERGE existiendo, en los afroamericanos, muy poca incidencia de esofagitis y casi nula de EB [87]. Esto hace pensar que, aunque no claramente identificados, podrían existir algunas características genéticas que confieran a la mucosa intestinal un factor protector frente al RGE.

### **2.3.2 Factores Gastrointestinales**

#### **2.3.2.1 *Esófago de Barrett***

Diversos estudios han intentado estimar la incidencia del ACE en el EB. Los estimados de estudios retrospectivos varían entre 1/55 a 1/441 pacientes-año de seguimiento [88-93], cuando se evalúan estudios prospectivos la incidencia de ACE varía de 1/52 a 1/98 pacientes-año de seguimiento, sobre un periodo evaluado de 3 a 5 años [94-98]. Los datos son difíciles de interpretar cuando son de estudios retrospectivos ya que entre otras razones tienen diferentes criterios diagnósticos de inclusión y cortos periodos de evaluación. Por otro lado, los estudios prospectivos tienen cortos periodos de seguimiento y sus tamaños muestrales son igualmente pequeños.

Sin embargo, cuando se combinan los datos de todas las series prospectivas, la incidencia del ACE es de 1/104 pacientes-año [99].

De acuerdo a un estudio internacional multicéntrico, que comprendió países de Europa del Este, del Asia, de América Central y América del Sur, se pudo apreciar que la prevalencia del EB es del 0.6-1%, con una prevalencia extremadamente baja de displasia y cáncer [69]. Las razones para tratar de explicar la disparidad en la prevalencia del EB y del ACE en las diferentes partes del mundo no están claramente entendidas, no obstante, la prevalencia de la ERGE, la obesidad, la infección por el *H. pylori* y los factores genéticos, han sido implicados [31].

El EB es un marcador aceptado de riesgo en el desarrollo de ACE. Se estima que su presencia incrementa el riesgo de ACE unas 30 veces, mientras que la ERGE sin EB sólo lo incrementa 3.1 veces respecto a la población general [100]. Un análisis realizado en el Reino Unido sobre 1761 pacientes obtenidos del "Barrett's oesophagus registry" demostró que el riesgo de desarrollo de ACE sobre un EB es de 23 casos en 3912 años de seguimiento (0.59% por año) [101]. Otros estudios han encontrado incidencias variables que varían desde el 0.32% al 0.55% [103-106]. También se ha demostrado que la mayoría de pacientes con EB no desarrollará ACE [107] y morirán de otras causas no relacionadas con esta enfermedad.

Se estima que, aproximadamente el 10% de los pacientes con EB desarrollarán una displasia de alto grado (DAG) o ACE a los 10 años desde el inicio de síntomas como disfagia/odinofagia o náusea/vómito. El tiempo desde el inicio de los síntomas hasta la aparición del EB ronda los 2.6 años para seguir hasta el desarrollo de displasia aproximadamente a los 5 años y displasia de alto grado al cabo de 9.6 años aproximadamente [108].



### **Extensión del esófago de Barrett.**

La extensión del EB ha sido ampliamente estudiada como FR condicionante del desarrollo de la DAH y posteriormente, del ACE tanto en estudios prospectivos como retrospectivos. Las limitaciones en el tamaño de la muestra han sido los principales condicionantes de que, hasta la fecha, no existan conclusiones claras a este respecto [109-112]. Estudios retrospectivos han encontrado asociación entre la extensión del EB y el desarrollo del DAH/ACE; sin embargo, las conclusiones se realizan a través de un estudio multivariante por lo que es difícil realizar afirmaciones a este respecto [113-114]. Otros estudios prospectivos también han encontrado esta asociación “extensión del EB-DAG-ACE” [115-116]. En otro estudio, la extensión del EB era factor pronóstico en el desarrollo de cualquier tipo de displasia y, subsecuentemente, de ACE [117]. Aunque no existe un consenso claro sobre la extensión que debe tener el EB para ser un FR en el desarrollo de displasia, la mayoría de estudios hacen mención al EB > de 6 cms como condicionante de este riesgo [118]. Sin embargo, también existe evidencia que contradice esta observación [119-121]. Un estudio prospectivo con importante tamaño muestral [122], ha mostrado que, una vez que se agrupa a los pacientes según los hallazgos anatomopatológicos, la extensión del EB deja de ser un FR claramente identificable y condicionante de evolución hacia displasia y ACE. Una conclusión semejante fue obtenida por otro grupo de investigadores, publicada en forma de meta-análisis, hace referencia a la poca calidad de los trabajos publicados hasta la fecha, con especial énfasis al hecho de que solo 6 estudios proporcionan datos suficientes para calcular la incidencia de ACE en los pacientes con EB de segmento corto (con un seguimiento de 1400 años-persona); grupo en el que se contabilizaron solo 7 casos de cáncer [118]. Otro meta-análisis muestra también un menor riesgo de desarrollo de ACE en EB de segmento corto [123], sin embargo, al estar basado en la recopilación de datos de pequeños estudios, tampoco tiene la calidad suficiente como para sacar conclusiones definitivas.

Como hemos observado, existen estudios de todos los tipos y con conclusiones muy dispares, sin embargo, si tomamos en cuenta la calidad de cada uno de ellos, podemos llegar a la conclusión de que, pese a que hacen falta más estudios con mayor tamaño muestral y mayor tiempo de seguimiento, parece existir evidencia suficiente que nos indica que la extensión del EB podría tener un papel en el desarrollo de displasia y su posterior progresión hacia ACE; aunque no está claro qué extensión del EB representa el punto de corte ideal para separar aquellos con riesgo alto y bajo.

### **Grado de displasia.**

El término displasia (del griego antiguo  $\delta\upsilon\sigma$ -, "dys", dificultad, y el sufijo -plasia derivado del verbo  $\pi\lambda\acute{\alpha}\sigma\sigma\omega$ , "pláссо", formar) hace referencia a una anormalidad en el aspecto de las células debido a alteraciones en el proceso de maduración de las mismas. Es una lesión celular caracterizada por una modificación irreversible del ADN que causa la alteración de la morfología y/o de la función celular. Si se produce un incremento en el número de células se convierte en una hiperplasia. La displasia también puede acabar provocando una neoplasia. Las células displásicas sufren una proliferación y alteraciones atípicas que afectan a su tamaño, forma y organización. Esto puede ser indicativo de que se encuentran en una fase de evolución temprana hacia la transformación en una neoplasia. Por lo tanto la displasia es un cambio preneoplásico o precanceroso.

Este crecimiento anormal se restringe a la capa epitelial, no invadiendo el tejido más profundo.

### **Anormalidades mucosas.**

Existen numerosas alteraciones mucosas que se relacionan con un riesgo incrementado de progresión del EB hacia DAG ó ACE. Un estudio retrospectivo definió

alteraciones mucosas como aquellas “elevaciones” de la mucosa menores a 1 cm de diámetro. Este estudio observó que aquellos con “alteraciones mucosas” presentaban un riesgo de desarrollo de ACE 2.5 veces mayor respecto a aquellos que no las presentaban (HR 2.6, IC 95% 1.2-5.4) [124]. La esofagitis erosiva también se ha establecido como un potencial FR para la malignización del EB. Un estudio holandés demostró que cuando los pacientes con EB presentaban esofagitis erosiva en su estudio endoscópico inicial, éste confería un riesgo hasta 3.5 mayor de evolucionar hacia DAG y/o ACE (risk ratio [RR], 3.5; 95% CI, 1.3–9.5) [125]. Otro estudio danés confirmó esta observación otorgando a la esofagitis erosiva, en pacientes con EB, un riesgo de hasta 5.2 veces respecto a la población general (5.2; 95% CI, 4.6–5.8) [126].

La presencia de úlceras dentro del EB también está asociada a progresión y malignización del EB. Un estudio ha demostrado que cuando el EB presenta úlceras en su interior, el riesgo de progresión de la displasia o desarrollo de ACE se incrementa hasta 1.7 veces ((HR, 1.72; 95% CI, 1.08–2.76); sin embargo, si las úlceras se encontraban en cualquier otra zona del esófago, este riesgo no se alteraba [127].

### **2.3.2.2 Reflujo ácido/base**

La relación entre la ERGE y el EB es bien conocida [128-133]. Se considera la causa primaria que desencadena todos los cambios histopatológicos que envuelven al EB para su posterior evolución hacia displasia y ACE. La ERGE es una entidad muy frecuente en países occidentales [134]. Los diversos estudios epidemiológicos disponibles hasta el momento, dejan constancia que los pacientes con síntomas frecuentes de RGE tiene 10 veces más riesgo de presentar EB [135-136]. Sin embargo, dado que sólo el 5-13% de estos pacientes desarrollarán EB a lo largo de su vida, parece razonable decir que los síntomas de RGE son poco fiables como factores predictores de evolución de la enfermedad [137-140].

Los estudios con los que contamos hasta la fecha [135-136] hacen mención a que, más importante que la presencia o no de síntomas, son la frecuencia, severidad y duración de estos los que podrían ser considerados FR en la aparición de EB; a mayor frecuencia, severidad y duración, mayor será el riesgo de que la ERGE progrese hacia EB. Esta situación parece especialmente importante cuando los síntomas de ERGE se desarrollan a más temprana edad, es decir, revisten más riesgo de progresión hacia EB los síntomas leves/moderados en edades tempranas en especial en menores de 20 años, que los severos en edades más avanzadas [141]. El riesgo “temprana edad-ERGE-EB” parece extrapolable al riesgo de desarrollo de ACE [142]. Situación que resulta comprensible, hasta cierto punto, al tener mayor expectativa de vida y, por ende, mayor tiempo para el desarrollo de cáncer.

Sin embargo, la implicación del reflujo alcalino en el EB y los cambios estructurales que produce, no están claramente identificados. Existe cada vez más evidencia del daño producido por el reflujo de sales y ácidos procedentes del duodeno (reflujo duodenal). Un estudio realizado a este respecto, aunque antiguo, demostró que los pacientes con EB complicado (displasia/estenosis/úlceras) presentaban mayores tasas de reflujo tanto ácido como alcalino que aquellos con EB no complicado; generando la hipótesis de un posible efecto sinérgico entre ambos tipos de reflujo [143]. El reflujo biliar induce un daño mucoso extenso en presencia de amplias variaciones del pH, además, se han encontrado mayores concentraciones de sales biliares, en estudios realizados mediante aspiración, en pacientes con EB y otros tipo de complicaciones [144]. Se ha observado, también, que a mayor duración de los episodios de reflujo biliar, mayor será el daño ocasionado a la mucosa esofágica [145] además, en estos pacientes, la terapia con inhibidores de la bomba de protones (IBP) no solo no es efectiva, sino que parece que la agrava dado que se produce migración bacteriana hacia el tracto digestivo superior. Estas bacterias causan daño tanto al colonizar la

mucosa como al actuar como catalizadores del proceso de desconjugación de sales biliares, situación que, al prolongarse en el tiempo, conduce a un proceso inflamatorio crónico [146]. Se ha implicado en este daño al CD95 (Fas/Apo1), receptor de membrana sobre la superficie celular que, al estimularse por los ácidos biliares, induce la apoptosis a través de la activación del Fas ligand (FasL) [147].

La inflamación mediada por el reflujo podría actuar como carcinogénico tanto a través de la vía de ácido araquidónico (AA) como del estrés oxidativo. Un pH bajo y la presencia de sales biliares promueven la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), actuando como catalizadora de la conversión del AA en varias prostaglandinas, incluyendo la prostaglandina E-2 (PEG2). La PEG2 estimula la proliferación del epitelio de Barrett a la vez que inhibe los mecanismos naturales de defensa encargados de la muerte celular. Como consecuencia, se acumulan una gran cantidad de células con gran componente de inestabilidad genética. La sobreexpresión de la COX-2 ha sido relacionada con la progresión del EB hacia ACE, lo cual hace pensar que la vía de AA puede tener implicación directa sobre la carcinogénesis [148]. La inflamación mucosa crónica también produce gran cantidad de radicales libres, disminuye los factores antioxidantes e incrementa la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo. Grandes niveles de radicales libres así como de productos de la degradación de la peroxidación lipídica han sido hallados en pacientes con EB, a la vez que bajos niveles de vitamina C y glutatión, indicando compromiso de los mecanismos de defensa oxidativa [149]. La capacidad mutagénica de los radicales libres está ampliamente demostrada a la cual habría que añadir la deficiencia en la apoptosis inducida mediante la degradación proteosomal de la p53 inducida por las sales biliares [150].

Según el estudio FINBAR (Factors Influencing the Barrett's Adenocarcinoma Relationship), resulta más indicativo de progresión del EB los síntomas crónicos y su frecuencia que la severidad en los mismos [151]. Sin embargo, una proporción muy

significativa de los pacientes con ACE (entre el 40 y el 50%) no muestran antecedentes de ERGE [152]. Además de que el reflujo gastroduodenal, independientemente de su severidad, se relaciona de forma muy pobre con los síntomas clásicos de RGE, el daño acumulado sobre el EB hace que estos sean aún más inespecíficos o incluso ausentes. Esto ha condicionado que los scores basados en los síntomas de reflujo, como predictores de complicaciones, no sean útiles en la práctica clínica.

### **2.3.2.3 *Inhibidores de la bomba de protones (IBP).***

Los inhibidores de la bomba de protones incrementan el pH, lo cual atenúa el daño del ácido sobre la mucosa esofágica. Aunque varios autores han demostrado que la normalización del pH favorece la diferenciación y disminuye la proliferación del epitelio de Barrett [153], el uso sistemático de los IBP's no ha afectado el incremento en la incidencia del ACE. De hecho, los trabajos realizados en modelos animales, han mostrado que su uso puede estar relacionado con la progresión del EB hacia ACE [154]. Esta observación podría estar relacionada a través de la interacción de la gastrina con el receptor de colecistoquinina CCK2R, estimulando al factor de crecimiento epitelial (EGF) y el trifol-péptido, lo cual induce la expresión de la COX2. En cultivos celulares se ha demostrado que la gastrina induce proliferación epitelial además, la mucosa del EB expresa mayor concentración de CCK2R respecto a al epitelio escamoso normal. La estimulación de la CCK2R actúa inhibiendo los factores de apoptosis celular [155].

A pesar de esto, la importancia de los IBP sobre la progresión y malignización del EB no está totalmente aclarada, si bien, estudios recientes han encontrado que podría relacionarse con la progresión del EB cuando se mezclan tanto reflujo ácido

como biliar [156], sin embargo, al igual que en estudios previos, se trata de modelos animales que permiten sacar conclusiones limitadas.

A la fecha existen varios estudios que pretenden sentar las bases sobre el posible papel de los IBP en el EB. Dos de ellos han encontrado una disminución del riesgo de ACE en pacientes con EB cuando son usados durante largos periodos de tiempo mientras que otros han demostrado un aumento de este mismo riesgo [157, 158]. Otro estudio ha intentado poner algo de luz a este respecto, intentando evaluar el papel de la hipergastrinemia en el ACE, estudio que, aunque ha encontrado cambios proliferativos en relación con la activación de la COX2 en modelos *in vitro*, estos cambios no han sido encontrados *in vivo* [159]. Un reciente meta análisis ha concluido que la terapia con IBP (en periodos de >2-3 años) logra reducir la evolución del EB tanto a displasia como a ACE; al parecer, éste efecto es independiente del uso de aspirina, AINE's, estatinas o esofagitis erosiva [160]. Por lo que se concluye que existe mayor evidencia a favor del uso de IBP en el EB, siempre y cuando se trate de una situación producto de reflujo ácido gástrico puro. En presencia de reflujo gastroduodenal este tratamiento quizá no aporte mayores beneficios siendo, incluso, perjudicial en el control del EB.

A la fecha sigue en marcha un gran estudio multicéntrico, The Aspirin Esomeprazole Chemoprevention Trial (ASPECT) que pretende evaluar el papel sinérgico del uso de la aspirina + esomeprazol en la disminución del riesgo de ACE; a la fecha los estudios preliminares indican que el principal problema radica en que el 5% de los pacientes reclutados han tenido que abandonar el estudio por intolerancia a la aspirina; el estudio concluye en 2018.

#### **2.3.2.4 Cirugía Antirreflujo**

Hasta ahora se ha mantenido la controversia acerca del papel de la cirugía antirreflujo en el control y remisión del EB. Diversos estudios realizados hasta el

momento muestran que la cirugía disminuye, mas no elimina el riesgo de displasia y ACE en pacientes con EB [161-166] Una revisión sistemática, que incluyó 25 estudios con un tamaño muestral de 1,696 pacientes, demostró que el riesgo de ACE en pacientes tratados mediante cirugía antirreflujo es significativamente menor respecto de aquellos tratados únicamente mediante tratamiento médico (2.8% vs 6.3%/ 1000 pacientes-año, respectivamente [167]. Se recomienda que los pacientes sometidos a cirugía antirreflujo por EB sean sometidos a pH-metría postoperatoria a fin de detectar aquellos que mantienen reflujo gastroduodenal asintomático, situación que podría incrementar el riesgo de desarrollo de displasia y ACE [168]. El fallo en la funduplicatura, con la consecuente recurrencia de la ERGE también se relaciona con progresión del EB hacia displasia y ACE [169-171].

Respecto a si la cirugía antirreflujo induce la remisión del EB, diversos estudios han abordado esta interrogante. Lo que sí parece claro es que, cuando la cirugía se realiza en condiciones óptimas y logra, objetivado mediante pH metría, el control del reflujo gastroduodenal, se observa una remisión significativa el EB comparado frente a tratamiento médico [171-172]; en particular en el EB corto [173]. El estudio más importante realizado hasta el momento [181] muestra que la cirugía antirreflujo logra una regresión significativa del EB comparada frente a tratamiento médico (15.4 vs 1.9%  $p= 0.0004$ ). Esta regresión afecta predominantemente al EB sin displasia que involuciona hacia epitelio normal (17 vs 0.4%).

### **2.3.2.5 *Infeción por Helicobacter pylori***

*Helicobacter pylori* (HP) es una bacteria que coloniza la mucosa gástrica. Actúa modulando la secreción de ácido gástrico lo cual, según diferentes teorías, vendría a disminuir la incidencia de ERGE, esofagitis y, finalmente, EB [174-178]. Cuando la



infección por HP causa inflamación gástrica y atrofia, disminuye la producción de ácido gástrico al dañar las células parietales del fundus gástrico [179]. Diversa evidencia en forma de meta-análisis y revisiones sistemáticas han llegado a relacionar de forma inversa la presencia de HP y ERGE, aunque, hasta ahora esta asociación es heterogénea en sus resultados [180-182]. Estudios recientes estiman que la incidencia de EB y ACE se reduce aproximadamente a la mitad en presencia de H pylori y atrofia gástrica (Odds ratio 0.52% y 0.64% respectivamente) [183-184]. La cadena cagA del H pylori está directamente relacionada con la su poder para inducir inflamación de alto grado y atrofia [185]. A esto hay que añadir que un gran estudio prospectivo que compara pacientes con EB vs ERGE demostró una relación inversa entre la intensidad de la enfermedad y la presencia de infección por H pylori; es decir, la ERGE presenta tasas de infección por H pylori del 44%, porcentaje que baja hasta el 35% en pacientes con EB no complicado y que continúa bajando hasta situarse cerca del 14-15% en paciente con EB con displasia de alto grado y ACE [186]. Sin embargo, al igual que con otros factores de riesgo, también existe evidencia contradictoria. Un estudio diseñado para evitar sesgos demográficos y de estilo de vida no pudo demostrar la relación entre la presencia de cagA y ACE [187]. Quizá esto sea debido a otro factor de confusión, el reflujo biliar. Estudios han demostrado que la presencia de reflujo biliar evita la colonización por H pylori pero no evita y, de hecho, contribuye, al daño tanto en la mucosa gástrica como en la esofágica, de tal forma que podemos tener atrofia gástrica producto del excesivo reflujo biliar y, a la misma vez un EB/ACE [155].

Aún así, dado que sí que está demostrado el poder carcinogénico del H pylori (mutágeno de clase 1, según la Organización Mundial de la Salud) resulta altamente cuestionable el papel protector de esta bacteria y aún más cuestionable el no erradicarla cuando es detectada.

### **2.3.2.6 Nitritos salivares**

Tanto los nitratos de los alimentos como aquellos concentrados en la saliva, son reducidos a nitritos por acción de las bacterias contenidas en el tracto digestivo superior. En pacientes con RGE, los nitritos se transforman en óxido nítrico (ON) en la luz esofágica. Esta situación se ve agravada en caso de aclorhidria secundaria a toma crónica de IBP's o por gastritis atrófica donde las bacterias reductoras de nitritos crecen sin restricciones, agravando y elevando la presencia de ON en el esófago [155]. Estudios in vitro han demostrado el poder carcinogénico del ON. Actúa, al parecer, rompiendo los enlaces de doble cadena del ADN de las células de Barrett lo cual podría ser un factor carcinogénico asociado a su progresión hacia ACE [188].

En el siglo XX hemos asistido al uso cada vez mayor de nitratos en la agricultura lo cual ha derivado no solo en su consumo de forma directa en los alimentos, sino también en el agua que bebemos, situación que coincide, de forma paralela, al aumento lineal en la incidencia de ACE observada en los últimos años [189].

## **2.3.3 Otros factores de riesgo modificables.**

### **2.3.3.1 Obesidad**

El incremento en la obesidad mundial también es paralelo al que observamos en el EB y ACE. Se han encontrado fuertes asociaciones entre la obesidad y la presencia de ERGE/esofagitis erosiva [190]. Aunque parecería lógico pensar que a mayor obesidad, mayor riesgo de ERGE y EB, un meta-análisis que relacionó el Índice de Masa Corporal (IMC) con la presencia de EB, sólo pudo demostrar un incremento muy discreto del riesgo [191]. Sin embargo, un IMC elevado sí que parece ser un FR para ACE (OR 1.8 y 2.4 para IMC de >25 y >30, respectivamente) [192]. Este incremento del riesgo parece más relacionado con la distribución de la grasa que del IMC en sí, donde

la obesidad visceral resulta el FR más importante [193]. Otros estudios han demostrado relación entre el IMC y la presencia de ACE a edades tempranas, sugiriendo que la adiposidad puede actuar de forma muy temprana en la evolución de la enfermedad [135, 194].

Durante los últimos años han surgido otros pequeños estudios que han fallado en el objetivo de relacionar el IMC como FR en la progresión del EB hacia displasia de alto grado y ACE [195]; este fallo puede ser debido al pequeño tamaño muestral así como a otros factores de confusión. Sin embargo, un estudio del Seattle Barrett's Esophagus Program reveló una fuerte asociación entre el Índice Cadera-Cintura y el riesgo de progresión del EB hacia ACE; de nuevo, la distribución de la grasa resultó más importante que el peso *per se*.

La obesidad está relacionada con la ERGE a través de varios mecanismos mecánicos y fisiológicos. Sin embargo, parte de la asociación entre la obesidad y el EB/ACE es independiente de la presencia de ERGE; esto sugiere la existencia de un mecanismo independiente del RGE. La obesidad central está relacionada con resistencia a la insulina, niveles más bajos de globulina fijadora de hormonas sexuales, grelina y adiponectina. También se observan niveles elevados de insulina, leptina y ácidos grasos libres [196-204]. La insulina estimula de forma directa la producción del Factor de Crecimiento dependiente de la Insulina (IGF) y sus respectivos receptores de formas complejas. Niveles elevados de insulina inhiben la producción hepática de las Proteínas ligadoras de Factor de Crecimiento dependiente de la Insulina tipo 1 (IGF-binding protein 1) [205]. Esto condiciona una mayor liberación y biodisponibilidad de IGF-I, lo cual, mantenido en el tiempo ha demostrado un FR fundamental en el desarrollo de varios tipos de cáncer (mama, próstata, pulmón, colon y recto) [206].

Habiendo identificado a la obesidad como FR en el EB/ACE, parecería lógico pensar que una disminución en el IMC conllevaría una reducción en este riesgo. Sin embargo, los estudios de los que disponemos hasta el momento no han logrado aclarar esta suposición. En un estudio relativamente reciente, una dieta sana asociada a

reducción de peso no mostró disminución significativa de este riesgo. Este hallazgo quizá sea relativo al pequeño tamaño muestral (87 pacientes) y a la escasa pérdida de peso (3.6 kgs) [207].

### **2.3.3.2 Dieta.**

Numerosos estudios han establecido la relación entre la dieta alta en frutas y vegetales, y la disminución del riesgo de ACE [208-209]. Así como el aumento con el consumo de carne procesada [210]. Un estudio observacional realizado en Suecia demostró que los pacientes que presentaban un mayor consumo de frutas (cuartil superior) y vegetales presentaban una reducción del riesgo de ACE cercano al 50%, respecto aquellos que consumían menos (cuartil inferior) [211]. Sin embargo, otras investigaciones han puesto esto en tela de juicio al no encontrar disminución en los marcadores de proliferación celular, en aquellos pacientes a los que se aumentó la cantidad de frutas y vegetales consumidos en la dieta [212-213]; a la vez que el estudio FINBAR demostró reducción del riesgo de ACE con el consumo de frutas, mas no de vegetales [149]. Por todo esto, se ha propuesto el posible papel que los antioxidantes contenidos en la fruta como posible explicación a este hallazgo. Otros estudios han avalado este hallazgo dado que se ha demostrado que los pacientes que toman pastillas multivitamínicas presentaban disminución tanto en el riesgo de tetraploidía (Cociente de riesgo  $HR$  0.19) como de ACE ( $HR$  0.38). También se observaron reducciones del riesgo con la vitamina E ( $HR$  0.25) y vitamina C ( $HR$  0.25), este último confirmado por otro estudio similar [214]. Otros estudios realizados con diferentes antioxidantes como el zinc, vitamina A, B-criptoxantina, riboflavina, ácido fólico, fibra, proteínas y carbohidratos han mostrado similares resultados, mientras las grasas saturadas aumentaban este riesgo [215]. Un estudio encaminado a evaluar el efecto protector del selenio en pacientes con EB demostró que aquellos con mayores niveles

en sangre (situados en los tres cuartiles superiores) presentaban menos riesgo de displasia de alto grado, (OR 0.5), aneuploidia (OR 0.5) y de disminución de heterocigosis en el fragmento 17p (LOH 17p), cuando se comparan con aquellos pacientes situados en el cuartil inferior. Esta misma investigación no encontró afectación tipo LOH 16p, un evento temprano en el desarrollo de displasia, lo que indica que el selenio podría tener un papel protector en la fase tardía de la progresión hacia ACE. [216].

Ante todos estos hallazgos, la European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) realizó una revisión sistemática que ha sentado las bases sobre el papel de la dieta en el desarrollo de ACE. De esta forma se ha llegado a la conclusión de que, independientemente de la cantidad de frutas y vegetales consumidos, es la variedad en la misma lo que atribuye a estos alimentos una relación inversa entre su consumo y el riesgo de desarrollo de carcinoma escamoso de esófago. La principal asociación inversa entre el consumo de fruta y el carcinoma escamoso se observa en pacientes que han fumado alguna vez. Aunque según los diferentes estudios, el consumo de estos alimentos ha mostrado que reduce la incidencia de adenocarcinoma intestinal (aunque a niveles no significativos), estos mismos han fallado en demostrar, de forma definitiva, que el consumo de frutas y verduras disminuya el riesgo de desarrollo de ACE o gástrico, dado que se encuentran, probablemente, sesgados por el estilo de vida que mantienen a la par este tipo de personas (vida más sana, ejercicio habitual, menor IMC, menor consumo de alcohol y tabaco, etc.) [217].

### **2.3.3.3 Alcohol**

Los estudios que relacionan el consumo de alcohol con el desarrollo de EB y ACE son escasos. El registro de EB del Reino Unido (UK BE Registry) no encontró asociación entre el consumo de alcohol y el EB, al compararlo con pacientes con

esofagitis por reflujo [218]. A la fecha existen numerosos estudios (al menos 14) que buscan establecer una relación entre el consumo de alcohol y el ACE; los resultados son dispares, heterogéneos e involucran un número reducido de pacientes. La mayor parte de estos estudios no encuentra relación o incluso, proponen que el vino tinto tiene cierto papel protector [219-229]. Recientemente se ha realizado un meta-análisis que concluye que, en base a la evidencia epidemiológica con la que contamos hasta el momento, el consumo de alcohol no representa un factor de riesgo en la malignización y progresión del EB. También se concluye que se necesitan mayores y mejores estudios, con mayor tamaño muestral, mejor control de los factores de confusión así como mayores tiempos de seguimiento para obtener conclusiones más definitivas [230].

#### **2.3.3.4 Tabaco**

En contraste con lo se sabe sobre el tabaco como FR para el desarrollo de carcinoma escamoso de esófago, su papel en el ACE es contradictorio. Existen estudios que no encuentran ninguna asociación [227-229], y otros que le otorgan un riesgo hasta 3.4 veces mayor [230]. Un estudio realizado en Australia demostró que los pacientes que fuman tienen un riesgo 2-3 veces mayor de EB y ACE. Sin embargo, este riesgo no era dosis dependiente [231]. Otros estudios, realizados con menor tamaño muestral, no han encontrado esta asociación [226]. Un estudio reciente, realizado con amplio tamaño muestral y con un seguimiento de 12 años encontró que el tabaco era una FR para progresión del EB hacia ACE. El riesgo se incrementa 2 veces para el desarrollo de displasia de alto grado y ACE (HR 2.03, IC 95% 1.29-3.17) [232]. Este riesgo es independiente de la cantidad de tabaco inhalado. De ahí que se deba insistir sobre el cese del consumo de tabaco en la población en general, con especial importancia en los pacientes con EB.

### **2.3.3.5 Nivel socioeconómico**

No existe evidencia clara que asocie el nivel socioeconómico y el riesgo de progresión del EB. Mientras que unos estudios sugieren que un nivel elevado implica mayor riesgo, otros estudios encuentran lo contrario [81].

### **2.3.3.6 Inhibidores de la COX-2**

Dado el rol del ácido araquidónico (AA) en la vía de la progresión neoplásica, su inhibición farmacológica podría modificar la historia natural del EB. Varios estudios han intentado investigar el papel protector de la aspirina y de los anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's) en la progresión del EB hacia ACE. Un meta-análisis demostró el papel protector (OR 0.67) de estos medicamentos, tanto usados de forma esporádica como continuada. La aspirina confería el mayor efecto protector respecto a los AINE's [246]. Sin embargo, otro estudio aleatorizado a la toma de celecoxib vs placebo en pacientes con EB, no compartió esta observación [233]. Y así, la evidencia con que contamos hasta el momento, sigue siendo heterogénea. Mientras que un estudio retrospectivo realizado en Reino Unido con más de 3683 pacientes-año no demostró un efecto protector de la aspirina frente a la malignización del EB [234], otro estudio, también retrospectivo desde 1996 al 2010 y que incluyó 2932 pacientes con cáncer aerodigestivo superior, demostró que la aspirina, los AINE's y los inhibidores de la COX-2 otorgaban un papel protector frente al desarrollo de neoplasias, al ser comparados con controles sanos [235]. Dada la información contradictoria con que contamos hasta la fecha, se puede decir que el uso de aspirina y otros AINE's/inhibidores de la COX-2, podrían ser usados de forma empírica, no sólo por su efecto antineoplásico sino por, y sobre todo, su beneficio cardiovascular; previa valoración riesgo/beneficio en cada caso en particular. Quizás el estudio AspECT brinde mayor información, una vez sea concluido.

## 2.4 Aspectos histopatológicos del Esófago de Barrett.

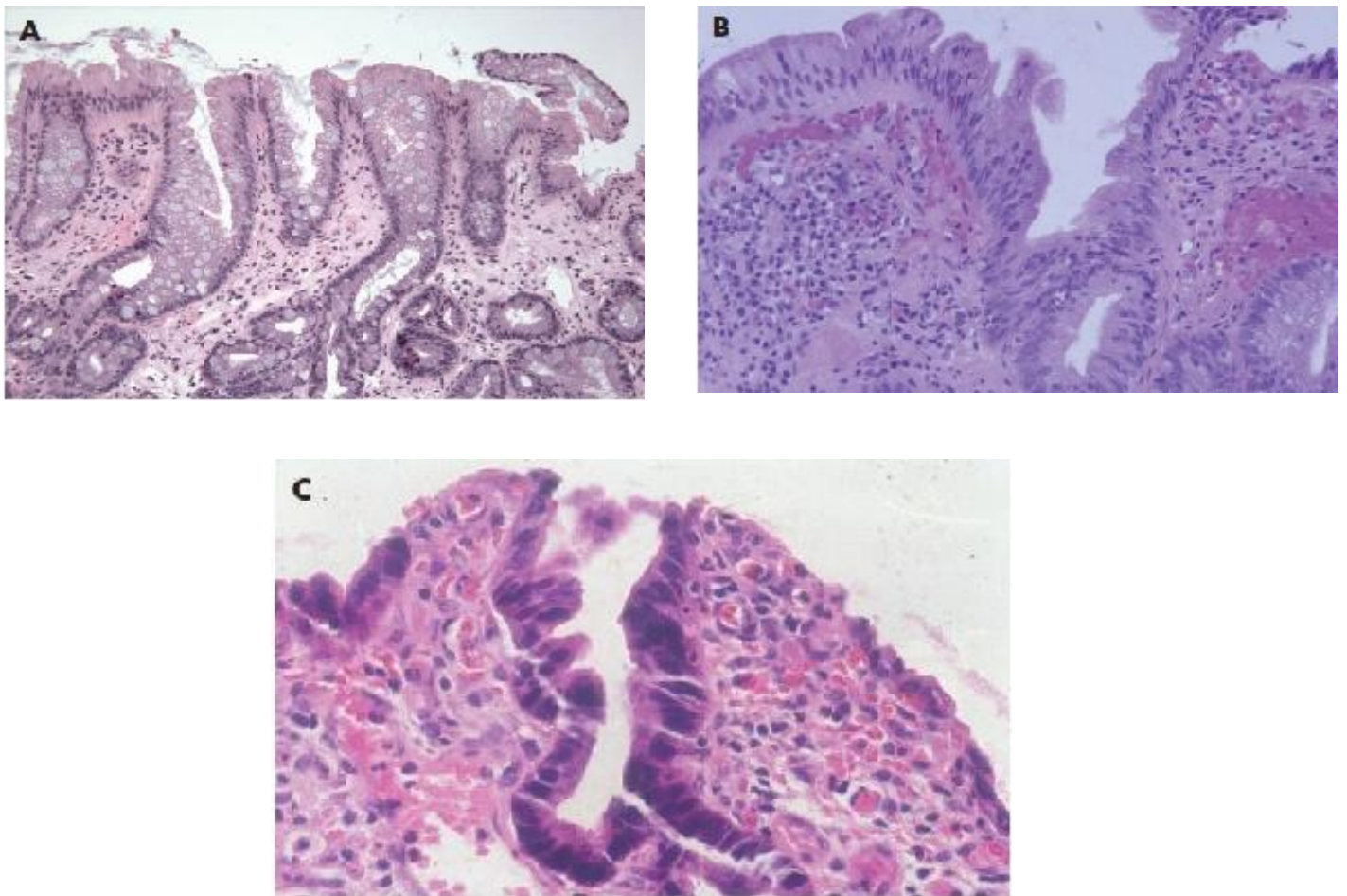
Según la clasificación actualmente aceptada [236], el EB puede incluir diferentes términos histológicos:

### 2.4.1 Negativo para Displasia

El diagnóstico “negativo para displasia” se aplica a aquellos casos en que se observa epitelio columnar metaplásico con cambios regenerativos. Desafortunadamente, en ocasiones, los cambios regenerativos epiteliales son extremos, en especial en la mucosa adyacente a la unión escamo-columnar o en aquellos casos con inflamación y/o ulceraciones activas. En general, el EB “negativo para displasia” muestra características histológicas regenerativas junto con conservación de la arquitectura críptica. En general, el pleomorfismo nuclear, la pérdida de la polaridad celular y un marcado incremento del cociente Núcleo/Citoplasma (N/C) son marcadores de displasia y no de regeneración celular. Sin embargo, el epitelio recién formado sobre una úlcera puede mostrar un incremento en el índice N/C, hipercromaticidad y leve disminución de la polaridad además de ligero pleomorfismo. En este sentido, las crestas sobre la superficie celular son la norma, lo cual nos ayuda a interpretar la benignidad del epitelio. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en la displasia, las células caliciformes, tanto normales como distróficas, son bastante comunes. La mucina citoplasmática puede estar disminuida, en especial en áreas de inflamación, pero incluso en estas circunstancias, las células crípticas usualmente muestran las células muestra un incremento progresivo en la cantidad de mucina a medida que nos aproximamos a la superficie epitelial. Estas características, la preservación del índice N/C y la disminución en el grado de estratificación nuclear en los niveles superiores de las criptas y en el epitelio superficial, representan las características distintivas de la “maduración” superficial, que es la característica más importante en lo que respecta al diagnóstico de EB sin displasia. En general, cambios nucleares y citoplasmáticos



aunados a estratificación, son más frecuentes en superficies ulcerosas o inflamadas. Sin embargo, en estas circunstancias, y en contraste con respecto a lo que ocurre en la displasia, el grado de atipia en relación con cambios regenerativos usualmente se disipa gradualmente a lo largo de la mucosa conforme nos alejamos del proceso inflamatorio/ulceroso; esto representa una ayuda a la hora de distinguir “atipia” de “displasia”. (Figura 2.3)

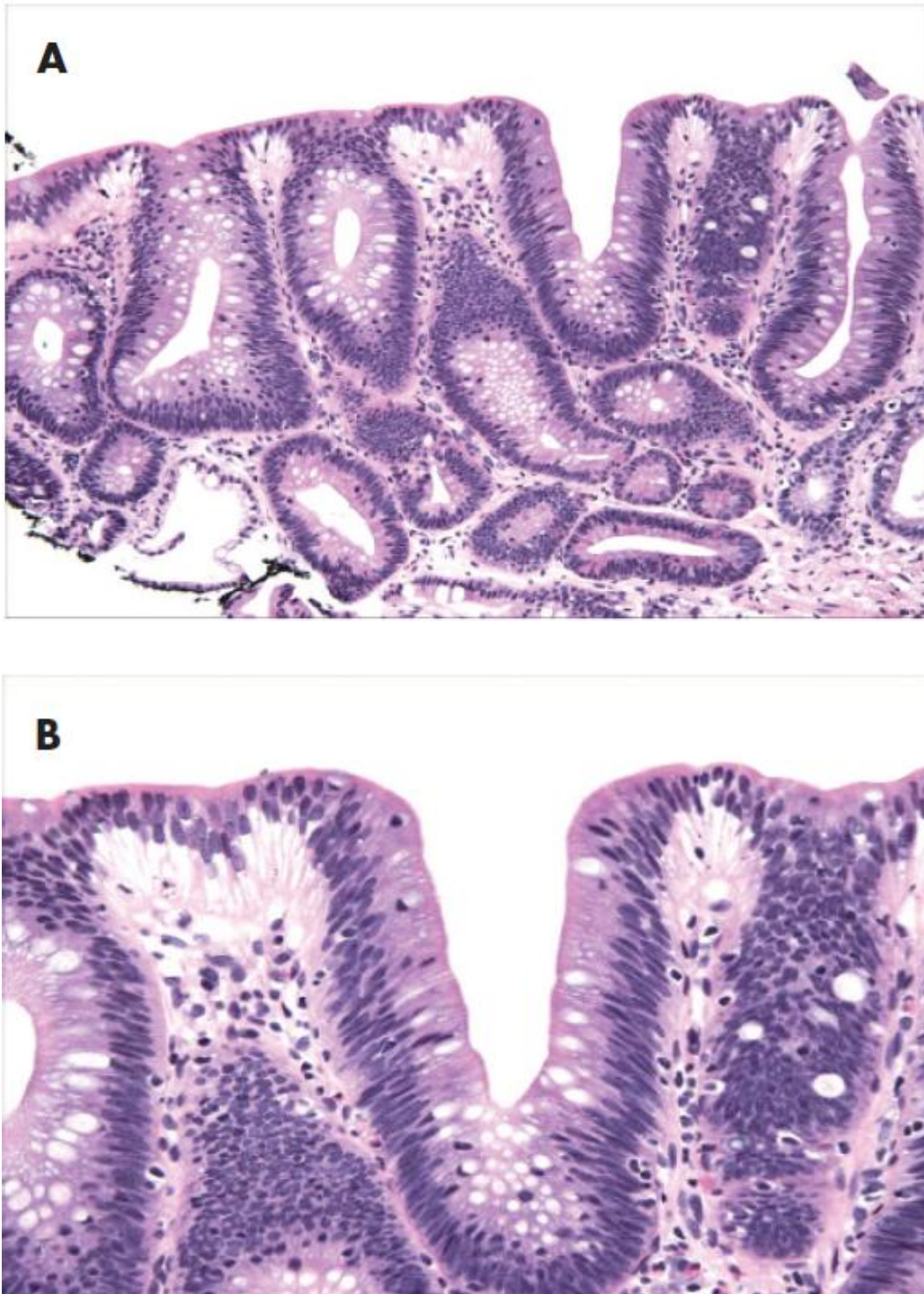


**Fig 2.3.** (A). Metaplasia intestinal en EB con cambios regenerativos moderados. Se observa un leve grado de distorsión criptica, situación normal en el EB; los núcleos son normales. (B). Fotografía de alta resolución que muestra los cambios regenerativos en la unión escamo-columnar del EB. (C). Se observa un área de regeneración extrema próxima a una zona ulcerosa. Se observan células atípicas en el epitelio que recubre la úlcera. La biopsia, tras tratamiento, a los 6 meses, no mostró displasia. (Odze RD, *J Clin Pathol.* 2006)

### 2.4.2 Positivo para displasia, de bajo y alto grado

En términos generales, existen dos tipos de displasia en el EB: (1) del tipo “adenoma” y (2) “No adenoma”, por su parecido, o la ausencia del mismo, al aspecto histológico de los adenomas de colon. Sin embargo, formas “inusuales” o “no convencionales” de displasia han sido descritas recientemente, tanto en el EB como en la EII.

La forma DBG de estirpe “adenomatosa”, es la forma de displasia más frecuente en el EB, muestra criptas de arquitectura más o menos conservada o quizá, sólo con mínima distorsión y núcleos estratificados atípicos en “forma de lápiz” limitados, la mayoría de las veces, a la parte basal del citoplasma celular. Los núcleos en la DBG se muestran habitualmente alargados, abarrotados e hiper cromáticos; muestran, además, un contorno irregular y un patrón de cromatina denso con o sin múltiples nucléolos de pequeño tamaño. Las células displásicas se caracterizan por ser carentes de mucina y mostrar una disminución en el número de células caliciformes. Otros aspectos incluyen aumento en el número de mitosis, tanto típicas como atípicas, preservación (o quizá leve disminución) de la polaridad celular, incremento del índice N/C (en especial en la base de las criptas) y ausencia de maduración superficial, característica de la displasia en general. Cabe destacar que, el tejido displásico, a menudo muestra un cambio brusco a tejido “no displásico”, situación que nos ayuda a distinguir la “displasia” de los “cambios regenerativos” característicamente benignos. (Figura 2.4)



**Fig 2.4.** (A) DBG en EB. Los núcleos muestran un aspecto en “punta de lápiz”, hiper cromáticos y estratificados, pero limitados a la mitad basal del citoplasma, excepto focalmente en la superficie del epitelio. En términos generales, hay pocas anomalías en su arquitectura. (B) A mayor aumento los núcleos muestran cromatina grosera y discreta cantidad de múltiples nucléolos de pequeño tamaño. (Odze RD, *J Clin Pathol.* 2006)

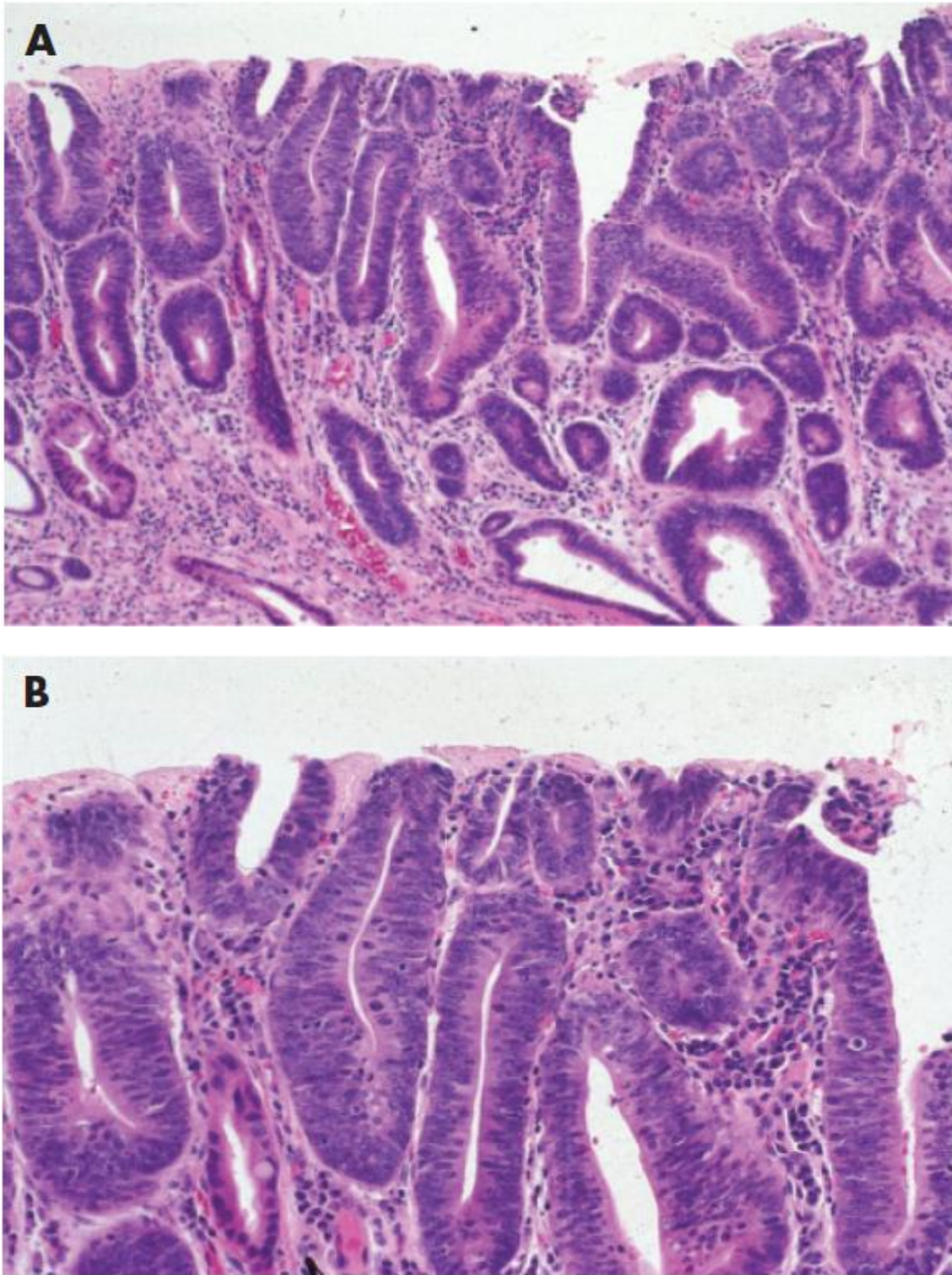
Con la progresión hacia DAG, el grado de afectación de la arquitectura celular se hace más patente (Tabla 2.1).

Feature	Low Grade	High Grade
<b>Cytology</b>		
↑ N/C ratio	+	++
Loss of cell polarity	-	+
Mitosis	+	++
Atypical mitosis	+/-	+
Full-thickness nuclear stratification	-	+
Decreased goblet cells (+/- dystrophic)	+	++
Hyperchromasia	+	++
Multiple nucleoli	+/-	+/-
Large irregular (prominent) nucleoli	-	+/-
Irregular nuclear contour	+	++
Nuclear pleomorphism	-	+
<b>Architecture</b>		
Villiform change	-	+/-
Crypt budding/branching	+/-	++
Crowded (back-to-back) crypts	+/-	++
Irregular crypt shapes	+/-	+
Intraluminal papilla/ridges	-	+/-
Lamina propria between glands	+	+/-

N/C, nuclear/cytoplasmic ratio; -, absent; +/-, may be present; +, usually present.

**Tabla 2.1.** Características histológicas en el EB con DBG y DAG. (Odze RD, *J Clin Pathol.* 2006)

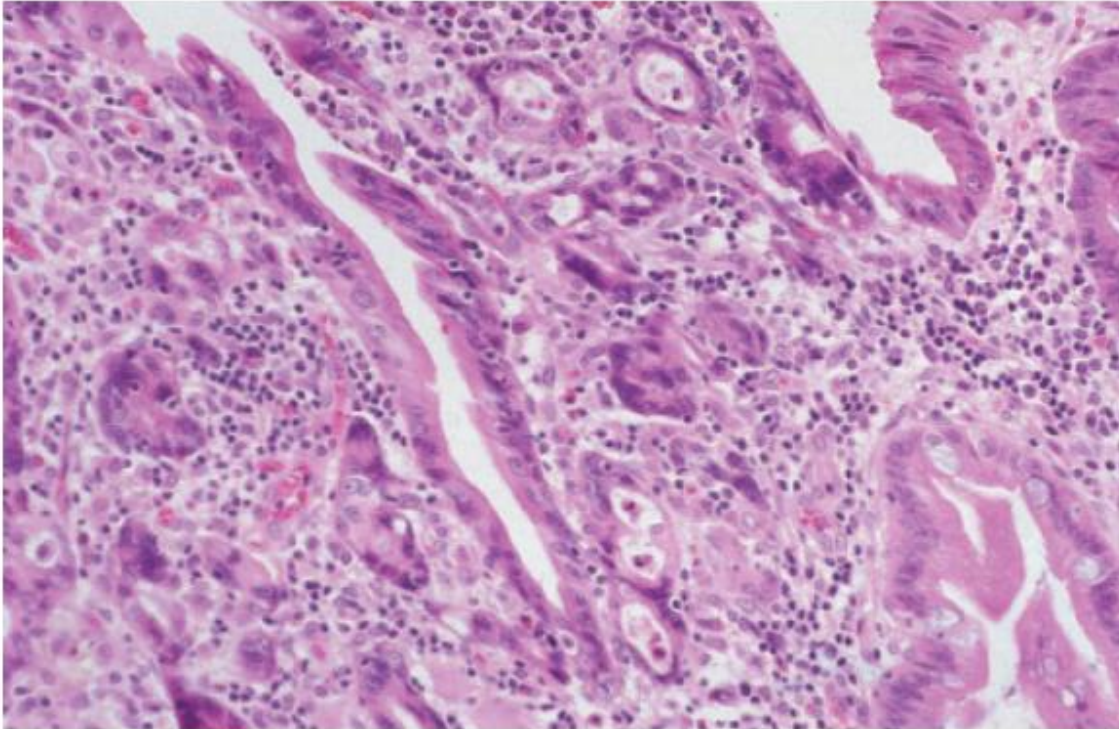
El diagnóstico de DAG se establece con la presencia de criptas incipientes, ramificadas y marcadamente hacinadas (evidenciada mediante una marcada disminución en la cantidad de lamina propia entre las criptas displásicas) o a una configuración vellosa de la superficie del epitelio. Las criptas a menudo muestran una configuración irregular, con papilas intracelulares o puentes. Sin embargo, la presencia de puentes intraluminales prominentes que le otorga a la célula un aspecto cribiforme, nos debería hacer sospechar y descartar la presencia de adenocarcinoma intramucoso. (Figura 2.5)



**Fig 2.5.** (A) En contraste con la DBG, la DAG muestra glándulas hacinadas con marcada estratificación nuclear. El núcleo alcanza la superficie luminal en las partes más profundas de la cripta. Además, existe moderada distorsión de la arquitectura nuclear. (B) A mayor aumento, los núcleos tienen un patrón de cromatina ligeramente más abierto con nucléolos prominentes, en algunos casos múltiples, e importante disminución de la polaridad celular. El índice núcleo/citoplasma N/C está marcadamente aumentado respecto a la DBG. (Odze RD, *J Clin Pathol.* 2006)

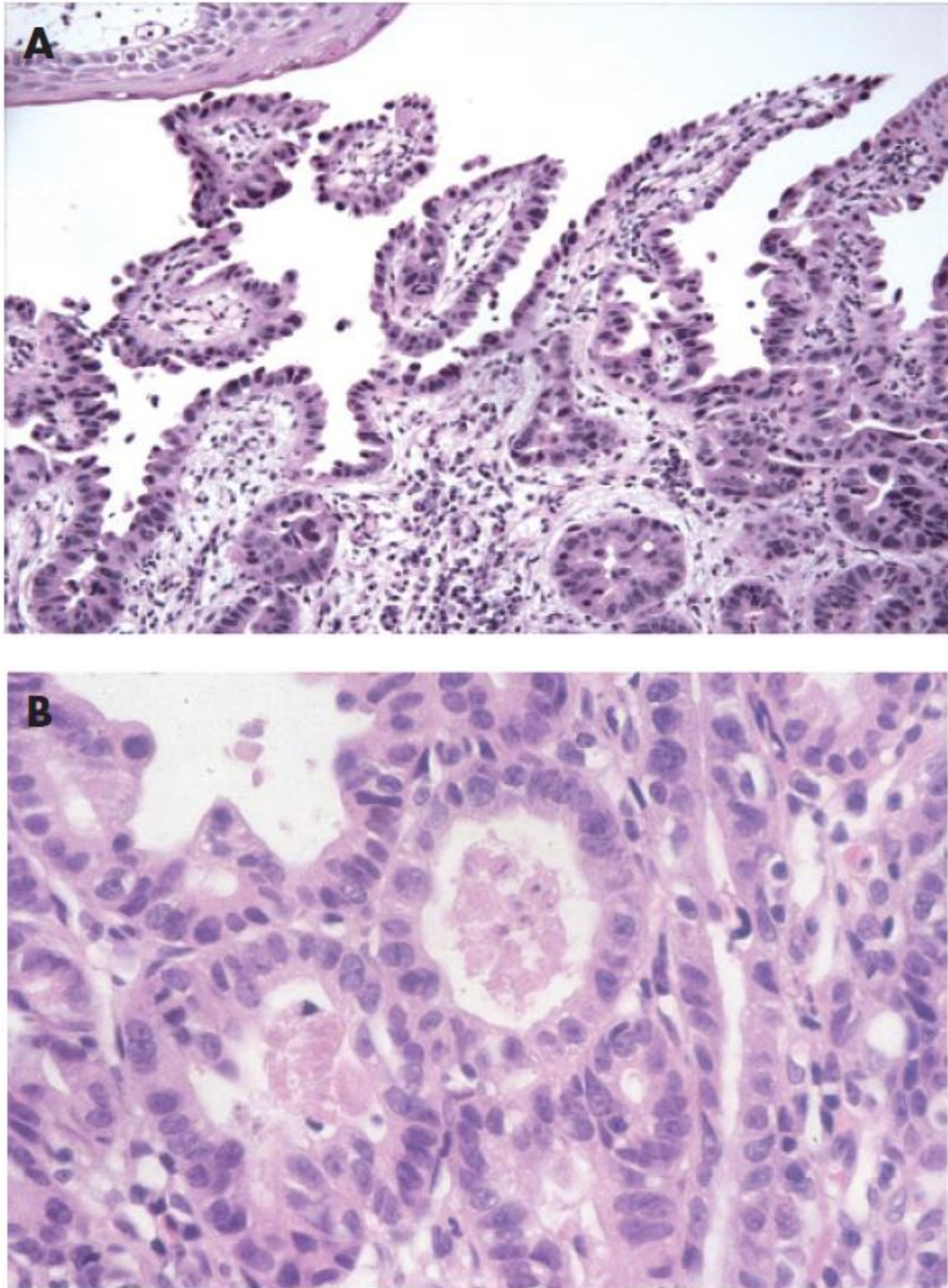
Citológicamente, la DAG, a diferencia de lo que ocurre en la DBG, muestra células con importante pleomorfismo del núcleo el cual presenta, además, bordes irregulares; el índice N/C se encuentra aumentado, existe pérdida de la polaridad celular y un incremento en el número de mitosis atípicas, en particular en las zonas más apicales de las criptas e incluso en el epitelio de la superficie. La estratificación del grosor total del núcleo, tanto en células crípticas como del epitelio superficial, es una característica clásica de la DAG. Los nucléolos, cuando están presentes, suelen ser grandes e irregulares. Al igual que ocurre en la DBG, la cantidad de mucina se encuentra disminuida y las células caliciformes, tanto típicas como distróficas, se encuentran marcadamente disminuidas o incluso ausentes. En resumen, los aspectos clave que nos hacen diferenciar la DAG de la de bajo grado incluyen la estratificación completa del núcleo celular, pérdida de la polaridad, en especial en las partes más apicales de las criptas y en la superficie epitelial, mitosis atípicas o importante pérdida de la arquitectura celular normal.

A medida que la transformación neoplásica progresa, las células pueden romper la membrana basal e invadir la lámina propia y la *muscularis mucosae*, situación que traduce la presencia de adenocarcinoma intramucoso (Figura 2.6)



**Fig 2.6.** Visión de alto poder que muestra una DAG con adenocarcinoma intramucoso. El adenocarcinoma intramucoso se caracteriza por la proliferación de pequeñas glándulas, irregulares en su forma y con núcleos marcadamente atípicos, que infiltran la *lámina propria* en un contexto caótico que no puede ser explicado por afectación de criptas antiguamente localizadas a este nivel. (Odze RD, *J Clin Pathol*. 2006)

La displasia no adenomatosa es una entidad rara y poco estudiada respecto a su biología, características anatómo-patológicas e historia natural. Sin embargo, la mayoría de los autores consideran a la displasia “no adenomatosa” una forma de DAG a efectos del manejo clínico del paciente. La displasia “no adenomatosa” se caracteriza por unas criptas que contactan una con la otra (patrón “espalda con espalda”) y contiene células de aspecto epitelial o cuboidal; el cociente N/C se encuentra aumentado, con núcleos irregulares ovales o redondeados, con patrón de cromatina abierto y nucléolos prominentes. De hecho, las criptas pueden tener poco o ningún contacto con la *lámina propria*, situación que debería aumentar la sospecha sobre la presencia de un adenocarcinoma intramucoso (Figura 2.7).



**Fig 2.7.** (A) Displasia de alto grado no adenomatosa en EB. En contraste con la variedad adenomatosa, las células neoplásicas muestran un fenotipo levemente columnar o cuboidal, núcleos altamente irregulares con marcado incremento del cociente N/C además de marcada disminución de la polaridad celular. (B) Un mayor aumento de otra área del mismo paciente muestra el patrón "espalda con espalda" además de un claro aspecto cuboidal, con aumento del cociente N/C, nucléolos prominentes y pérdida de la polaridad celular. (Odze RD, *J Clin Pathol.* 2006)



### 2.4.3 Problemas actuales en la interpretación de las lesiones en el EB

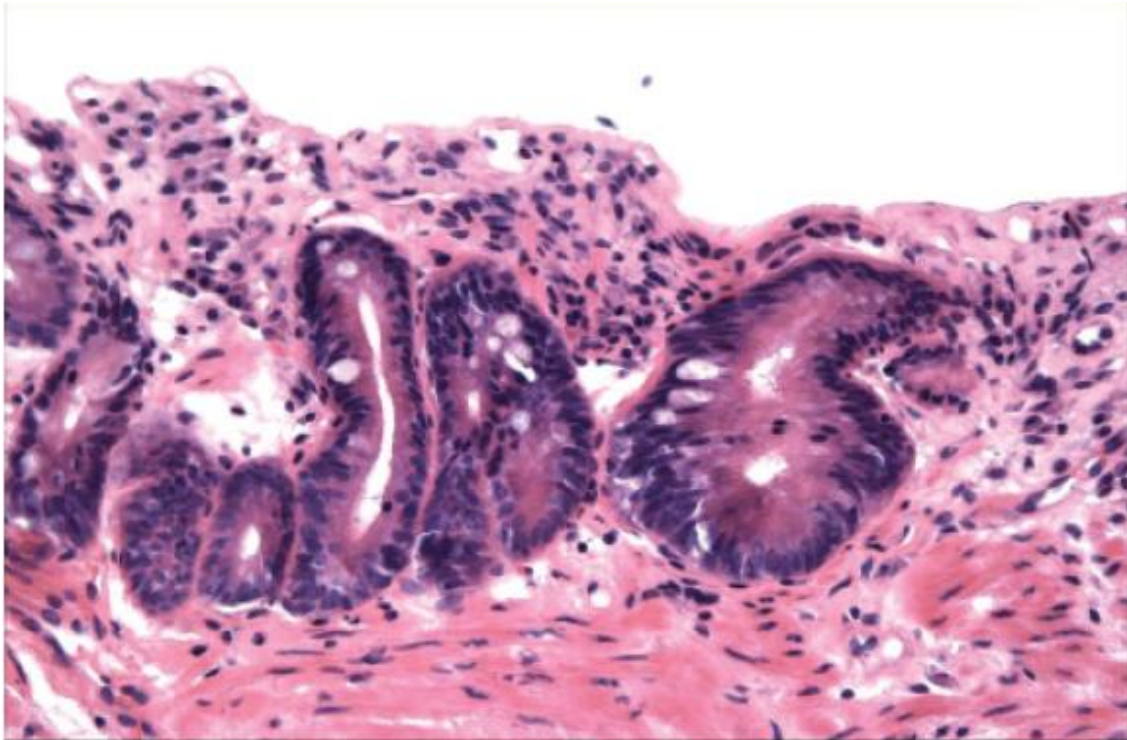
#### 2.4.3.1 *Proceso regenerativo vs displasia de bajo grado*

Como se ha comentado anteriormente, a la fecha existen estudios contradictorios respecto al papel que juega la DBG en la morbimortalidad de los pacientes con EB. Desafortunadamente, si tomamos en cuenta que los cambios que sigue el EB hacia la displasia pueden ser muy sutiles y que las alteraciones histológicas producto de la inflamación y reparación tisular pueden ser muchas y de muy variada presentación, es de entender la amplia variabilidad intra e inter-observador a la hora de interpretar las muestras, en especial cuando la displasia puede ser muy incipiente. Esta dificultad afecta incluso a patólogos expertos. El mayor nivel de variabilidad ocurre al intentar separar aquellos pacientes con importante actividad regenerativa de aquellos con DBG, ante esta dificultad a menudo se recurre a un diagnóstico “indefinido para displasia”. En uno de los estudios más importantes sobre EB que se han publicado hasta la fecha [237], se reunió a un grupo de 8 patólogos expertos en enfermedades del tracto gastrointestinal, los resultados fueron que, en el diagnóstico de “negativo para displasia” vs “indefinido para displasia” vs DBG, el nivel de coincidencia era del 0.6, es decir, el diagnóstico sólo era coincidente en un 60% de los casos, este resultado sólo fue levemente mejorado en otro trabajo [238] al intentar separar los casos “negativos para displasia” de aquellos con DBG. Estos autores encontraron especial dificultad a la hora de evaluar lesiones en el espectro más bajo de la displasia, por ejemplo, los valores de *kappa* (porcentaje de acuerdo entre observadores) fueron de 0.32 (razonable) y 0.15 (escaso) en el diagnóstico de de DBG e indefinido para displasia, respectivamente.

Quizá el término de “indefinido para displasia” debería utilizarse, según varios autores [236], en las siguientes circunstancias:

- Debido a dificultades técnicas
- Atipia relacionada con inflamación y ulceración; y
- Cambios celulares “sugestivos de displasia” que afecten únicamente las bases de las criptas, con evidencia de maduración de la superficie epitelial.

Las biopsias obtenidas de manera tangencial, sometidas a quemaduras o carentes de superficie epitelial, hacen que la valoración de la displasia sea un asunto prácticamente imposible (Figura 2.8).



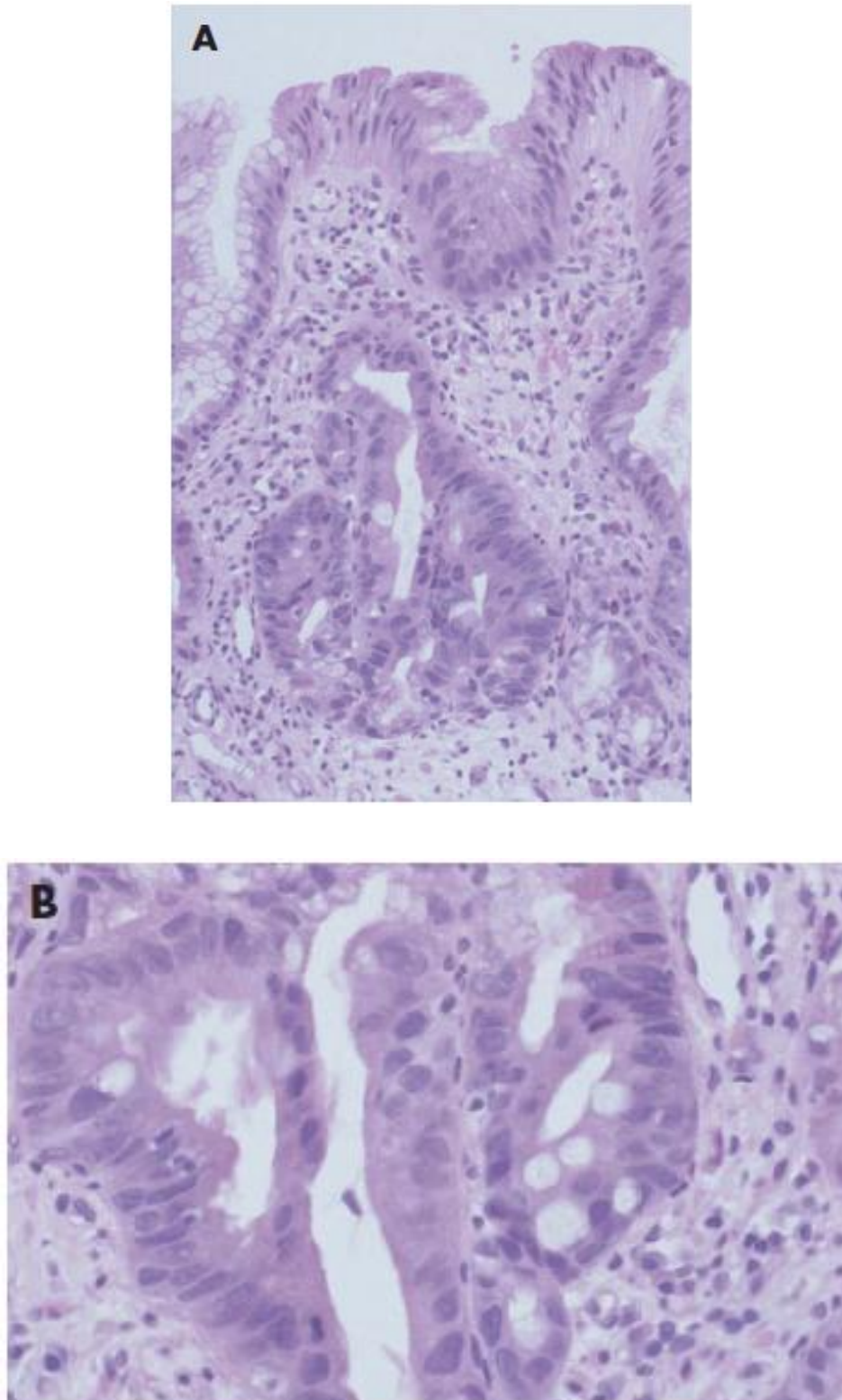
**Fig 2.8.** Vista de alta potencia que muestra un área considerada indefinida para displasia. Aunque las criptas muestran algunas características compatibles con DBG, la ausencia de la superficie epitelial hace que la evaluación de la maduración superficial sea imposible. (Odze RD, *J Clin Pathol.* 2006)

De esta forma se entiende que las evaluaciones histopatológicas resulten muchas veces complejas y no exentas de equivocaciones a la hora de su interpretación. Un estudio que sometió a reevaluación, por patólogos expertos, muestras con diagnóstico de DBG y DAG realizadas por patólogos generales, terminó por “desescalar” el grado histológico de 64 de los 71 casos de DBG y de 11 de los 23 con DAG. De hecho, el 46% de estas desescaladas fueron realizadas en base a que las muestras de tejido no reunían las características mínimas para ser evaluadas en este aspecto [239]. Las biopsias tangenciales, que carecen de criptas bien orientadas y superficie epitelial pueden ser difíciles de evaluar para la presencia o ausencia de maduración en la superficie, parámetro muy importante a la hora de decidir si los cambios observados se corresponden a cambios regenerativos o displásicos.

El epitelio regenerativo, en especial en los casos de inflamación activa o procesos ulcerosos, pueden, en ocasiones, presentar una considerable atipia celular que llega a ser incluso tan marcada que nos podría hacer pensar en DBG o incluso en DAG. En biopsias que conserven una arquitectura relativamente normal, la ausencia de una transición brusca entre el epitelio típico y atípico, la presencia de maduración en la superficie, combinado con la ausencia de pleomorfismo nuclear, mitosis atípicas y pérdida de la polaridad celular, son características que nos ayudan a distinguir los procesos inflamatorios de la displasia. En este escenario, parece lógico considerar que estos pacientes “indefinidos para displasia” deban mantener un seguimiento clínico así como repetir el estudio anatomopatológico de muestras obtenidas tras un tratamiento antirreflujo agresivo, a fin de evitar sesgos en la interpretación de los estudios producto de procesos inflamatorios agudos o crónicos. Como se ha mencionado antes, los cambios “atípicos” producto de procesos regenerativos, suelen ser más marcados a nivel de la unión escamo-columnar, zona que, por su situación anatómica, se encuentra sometida a mayor recambio celular como consecuencia del proceso normal lesión-reparación. Por este motivo, debemos insistir en la importancia de evaluar

detalladamente las muestras obtenidas de esta zona anatómica, a fin de evitar caer en un error al sobreestimar el grado de lesión tisular interpretando como “displásicas” zonas que, en su contexto, pueden ser normales.

La evaluación de la displasia, por tanto, implica valoraciones subjetivas por diversos autores. Resulta habitual, entre los patólogos digestivos [237,116, 240] diagnosticar como displásicas, independientemente del grado, aquellas lesiones que involucran a la totalidad de la cripta y la superficie epitelial en ausencia de maduración superficial. Sin embargo, otras observaciones [241] han dejado patente que puede existir displasia que afecte sólo a la base de la cripta, con relativa preservación de zonas más apicales y superficie epitelial. En este estudio, los autores estudian un grupo de pacientes (15) que muestran cambios histológicos sugestivos de displasia en la base de las criptas, sin embargo, conservan la propiedad de maduración superficial y que son sometidos a diversas técnicas inmunohistoquímicas y moleculares (p53, cuantificación de 9pLOH, 17pLOH y aneuploidia). Los autores encuentran evidencia suficiente como para concluir que “los cambios en estos pacientes son muy sugestivos de displasia, pese a que conservan la capacidad de maduración superficial (Figura 2.9).



**Fig. 2.9.** Vista de potencia media (A) y alta (B) que muestra una zona que combina cambios sugestivos de displasia criptica basal con maduración superficial. En esta toma, la parte basal de la cripta muestra células que impresionan de displásicas (alargamiento nuclear, estratificación y pérdida de la polaridad). Se observan también algunas zonas de mitosis. La parte superficial de las criptas muestra, sin embargo, un proceso de maduración del epitelio, caracterizado por disminución progresiva del tamaño del núcleo, de la estratificación así como adquisición progresiva de mucina citoplasmática a medida que nos aproximamos a la superficie mucosa. (Odze RD, *J Clin Pathol.* 2006)

La siguiente figura representa un algoritmo que podría resultar útil a la hora de evaluar aquellas lesiones difíciles de interpretar (Figura 2.10)

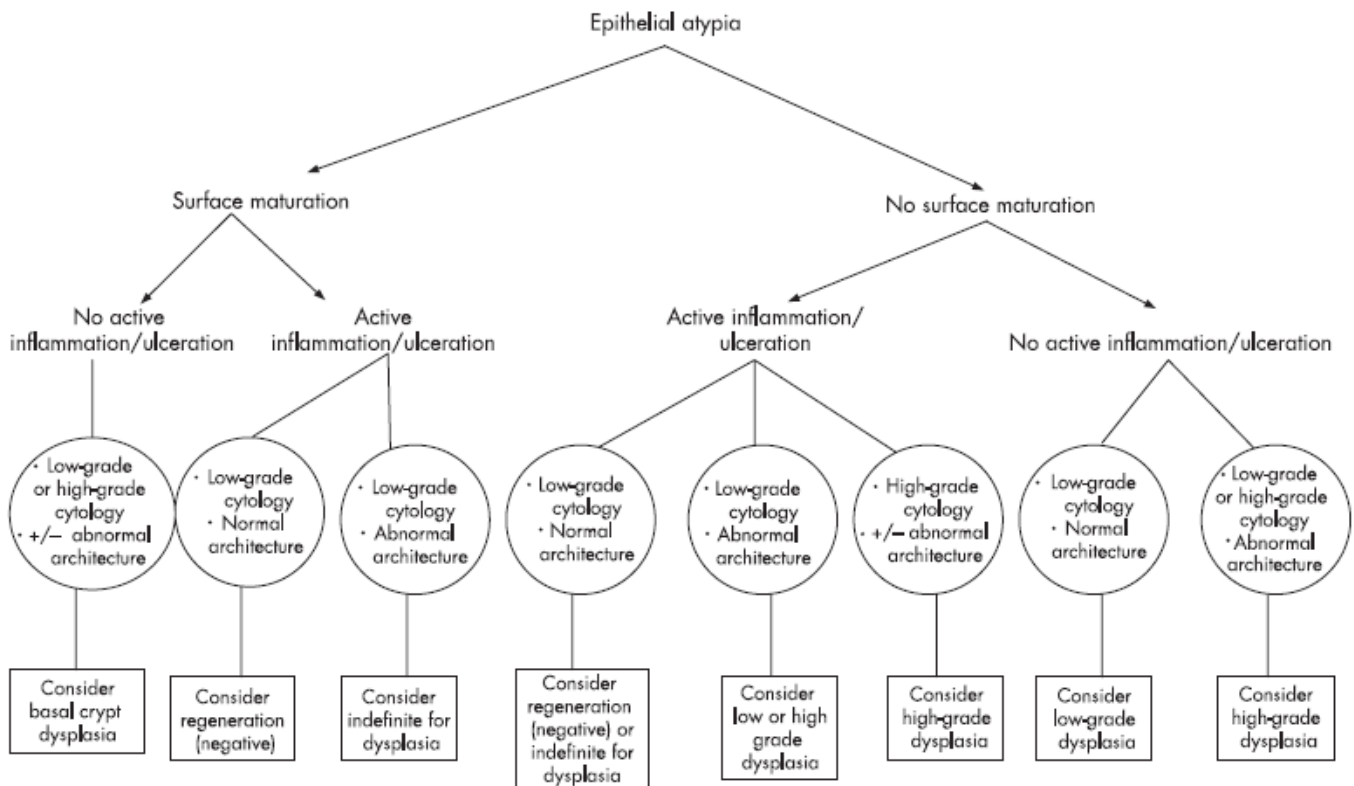


Fig. 2.10. Algoritmo para el abordaje diagnóstico en casos de EB con atipia epitelial. (Odze RD, *J Clin Pathol*. 2006).

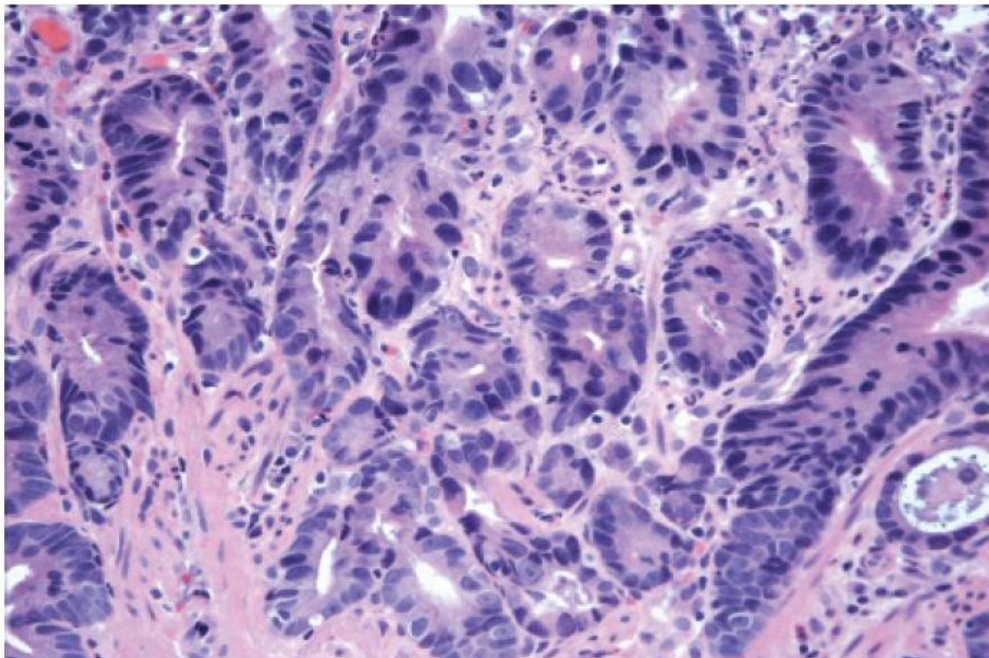
#### 2.4.3.2 Displasia de bajo grado vs displasia de alto grado

Como se ha comentado anteriormente, la principal diferencia entre la DAG respecto a la DBG radica en el grado de desestructuración de la arquitectura normal así como de las alteraciones celulares observadas. Desafortunadamente, a medida que los cambios histológicos avanzan realmente no existe ningún punto de corte que nos haga definir, tajantemente, si estos cambios se corresponden con DBG o DAG. En general, la tipificación de la displasia se realiza tomando en cuenta el mayor grado de atipia observada en la muestra. Sin embargo, el número de criptas que deben estar afectadas, para hacer una valoración global de DAG representa un tema que, hasta la fecha, no está aclarado. Sí es de destacar que en el artículo publicado y que, hasta la fecha, sirve

de patrón de referencia a la hora de clasificar la displasia [112] hacen mención a que “no parece prudente clasificar con DAG la presencia de afectación de un o dos criptas”. Estudios recientes hacen mención al beneficio que supone valorar la extensión de la DAG en el riesgo de progresión hacia ACE. De esta forma, se ha observado que aquellos pacientes que presentan mayor cantidad de criptas afectas (5.8 vs 2.6), presentaban un riesgo mucho mayor de progresión hacia ACE [242]. Esta observación ha sido también corroborada por otro estudio; en este, la supervivencia de los pacientes con “focos de DAG” era significativamente mayor respecto a aquellos pacientes con “DAG difusa” [243].

#### 2.4.3.3 *DAG vs adenocarcinoma intramucoso.*

La distinción entre estas dos entidades no sólo entraña, al igual que en las situaciones previas, algunas dificultades en su interpretación, sino que estas dificultades son trascendentales en el manejo clínico de estos pacientes (Figura 2.11)



**Fig 2.11.** EB con DAG y un área focal sugestiva de adenocarcinoma intramucoso. En el centro del campo se observa una zona con proliferación de pequeñas glándulas en un patrón “espalda con espalda”, existe una leve afectación de la lámina propia que es difícil de explicar por la afectación de criptas previas. También se observa la presencia de una célula aislada en el interior de la lámina propia.

Dado que existen vasos linfáticos en la lámina propia de la mucosa esofágica, la posibilidad de metástasis ganglionares en pacientes con tumores limitados al compartimiento mucoso es entre 5-8% [244], de ahí que muchos de estos pacientes, hasta la fecha, prefieran ser manejados de formas más agresivas mediante cirugía [245-246].

Diversos estudios han intentado evaluar las alteraciones histológicas más relevantes que nos permitan diferenciar la DAG del carcinoma intramucoso; sin embargo, si algo ha quedado claro, es que, con mucha frecuencia, se tiende a sobrecalificar los casos como carcinomas intramucosos en lugar de DAG. En uno de estos estudios, la concordancia inter-observador a la hora de evaluar estas dos entidades, comparando un patólogo general y dos especializados en patología digestiva, obtuvo un valor de *kappa* de tan solo 0.42 (escaso). En este estudio, la mayor diferencia se relaciona con el hecho de sobre-estadificar los hallazgos observados, en especial cuando las muestras son evaluadas por el patólogo general [244].

Hasta ahora, lo que sí parece razonable, es clasificar como carcinoma intramucoso una muestra obtenida con una adecuada técnica (evitando muestras tangenciales) adecuada en cantidad y localización y que muestre las siguientes particularidades:

- Células aisladas o en pequeños racimos, localizadas en la lámina propia, que muestren un patrón de distribución “espalda con espalda”.
- Glándula de aspecto completo o “cribiforme”, con evidencia de expansión de la lámina propia y distorsión de las criptas que la rodean.
- Presencia de células neoplásicas o glándulas con patrón “espalda con espalda” con importante afectación de la arquitectura glandular normal; que no pueda ser explicada por una presencia previa de glándulas de Barrett.



La presencia de necrosis o desmoplasia, aunque muy ligadas a la presencia de un adenocarcinoma, suelen ser entidades muy poco frecuentes en carcinomas limitados a la mucosa e incluso en aquellos con patrón submucoso invasivo [244].

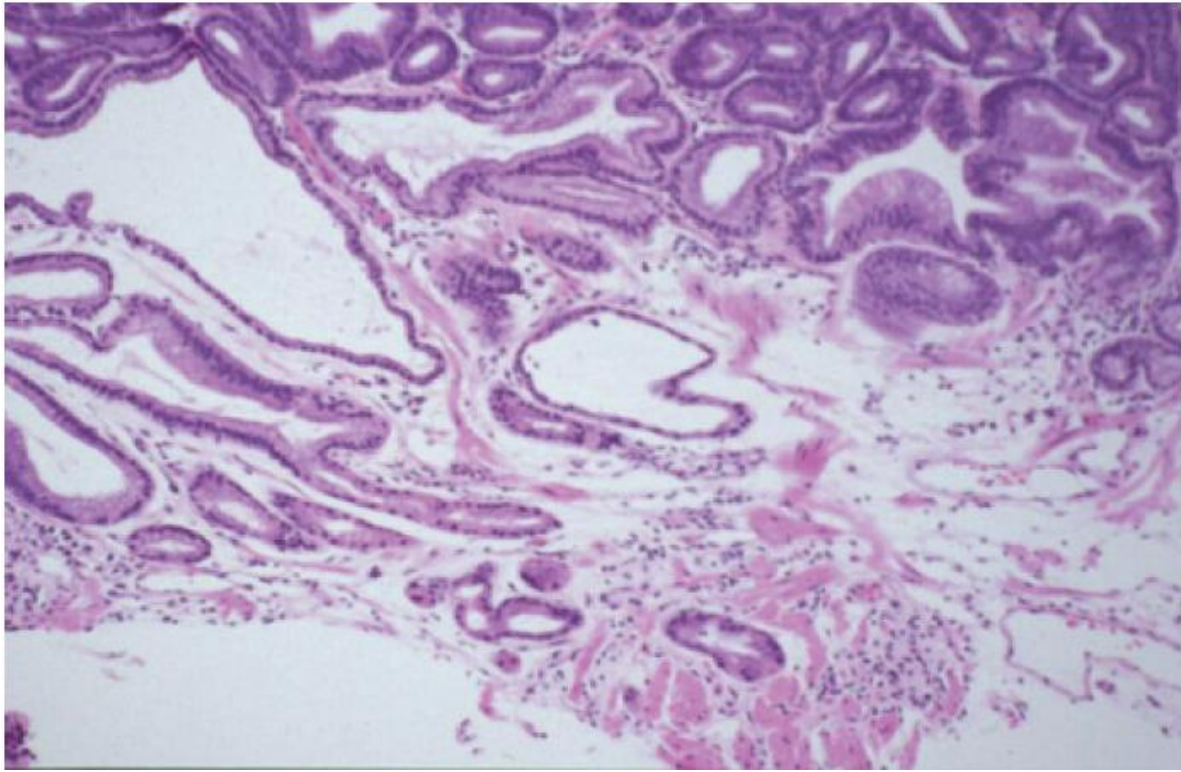
En cualquier caso, de existir dudas diagnósticas, parece razonable seguir muy de cerca a estos pacientes con control endoscópico estrecho a fin de detectar aquellos cambios histológicos más claramente interpretables.

#### **2.4.3.4 Carcinoma intramucoso vs submucoso**

En ocasiones, las glándulas displásicas se localizan en la muscularis mucosae. En estos casos, la dificultad radica en el hecho de saber diferenciar si los cambios observados corresponden a un verdadero adenocarcinoma intramucoso invasivo o a la localización ectópica de una glándula sin patrón invasivo (Figura 2.12). El no sobreinterpretar los hallazgos observados resulta fundamental, en especial si las glándulas presentan una estructura más no menos normal o sólo cambios compatibles con DBG y las criptas se encuentran relativamente preservadas.

Otro factor añadido, y que supone una dificultad más en la interpretación de estas muestras, es que los pacientes con EB a menudo desarrollan una capa de *muscularis mucosae* “falsa” en el sentido del origen histológico, el encontrar glándulas en su interior siembra dudas sobre si interpretar los resultados como adenocarcinoma intramucoso o submucoso. Sin embargo, parece que la supervivencia, tanto si invaden la “falsa” *muscularis mucosae* como la “verdadera”, no parece verse afectada. En este estudio [247], cuando la invasión afectaba a la “falsa” muscularis, sólo existía afectación linfática en el 1% de los casos respecto al 44% cuando afectaba la porción media o profunda de la “verdadera” submucosa. De esto se deduce, que los tumores localizados en este espacio, entre submucosa “falsa” y “verdadera”, invaden la *lamina propria* y

deberían ser considerados, desde el punto de vista biológico, como intramucosos, dado su comportamiento invasivo.



**Fig 2.12.** Biopsia mucosa que muestra un EB con DBG además de glándulas atípicas localizadas en la capa superficial de la muscularis mucosae. Las glándulas en la parte profunda de la mucosa muestran un epitelio atenuado pero sin otras alteraciones histológicas relevantes. Esta situación puede aparecer en algunos pacientes con EB sin que necesariamente exista un verdadero adenocarcinoma.

El grado de displasia continúa siendo la piedra angular en la clasificación del riesgo de desarrollo de ACE en los pacientes con EB. Su clasificación y estratificación está basada en las categorías desarrolladas para pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal [248] y desde donde se ha extrapolado para ser usada en pacientes con EB [249]. El paradigma aceptado hasta el momento es que el grado de displasia está asociado directamente con el riesgo de malignización del EB [250], basados en la premisa de que los cambios ocurren en un orden secuencial metaplasia-DBG-DAG-ACE. Sin embargo, esto no siempre ocurre [251-253].

## 2.4.4 Inmunohistoquímica en el Esófago de Barrett

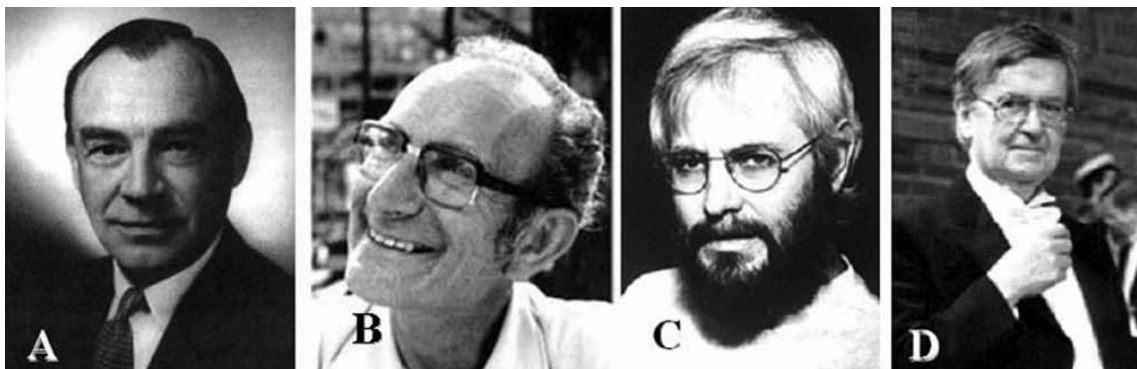
### 2.4.4.1 Bases de la inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica que ha revolucionado la histopatología. El desarrollo de la metodología de anticuerpos marcados con fluoresceína (inmunofluorescencia indirecta) realizado por Albert H Coons (Figura 2.12-A), Hugh Creech, Norman Jones y Ernst Berlinier, en la Universidad de Harvard en 1941, fue el antecedente del florecimiento de la inmunopatología [254]. El uso de anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína le permitió a Coons el estudio detallado de diversos antígenos, la identificación de proteínas tisulares, la detección de complejos inmunitarios, la localización de antígenos virales en células infectadas y de antígenos tumorales en diversas neoplasias. A pesar de esta trascendente innovación, la técnica de inmunofluorescencia fue, hasta cierto punto, de utilidad limitada en la patología quirúrgica diagnóstica, quizá debido a que requiere tejido fresco y un microscopio especial (de fluorescencia) que no cuenta con la mejor resolución morfológica. Pero sin duda el método creado por Coons y col. sentó las bases de la inmunohistoquímica actual.

En 1959 Rodney Porter y Gerald Edelman describieron la estructura de las inmunoglobulinas, por lo que en 1972 recibieron el premio Nobel de Fisiología o Medicina. Su descubrimiento fue posible gracias a que obtuvieron grandes cantidades de estas proteínas de pacientes con mieloma de células plasmáticas (mieloma múltiple). Las inmunoglobulinas del mieloma, proteínas de Bence-Jones y macroglobulinas monoclonales jugaron un papel fundamental en el esclarecimiento de la estructura, genética, síntesis y metabolismo de las inmunoglobulinas. Algunos años después, Susumu Tonegawa, premio Nobel de Medicina en 1987, describió la diversidad de los anticuerpos, demostró la compleja recombinación somática y los mecanismos de hipermutación a que están sujetos los linfocitos B en sus mecanismos de producción y síntesis de inmunoglobulinas, lo que les permite su selecta especificidad ante la

demanda de millones de antígenos potenciales [255]. En el párrafo final de la carta publicada el 7 agosto de 1975 en la revista *Nature*, Köhler y Milstein indicaron que: “It is possible to hybridise antibody-producing cells from different origins. Such cells can be grown *in-vitro* in massive cultures to provide specific antibody. Such cultures could be valuable for medical and industrial use” [256].

En 1984 Cesar Milstein, Georges JF Köhler y Niels K Jerne recibieron el Premio Nobel de Medicina por su aportación para la producción de anticuerpos monoclonales [255] (figura 2.12 B, C, D). Estos investigadores pudieron unir dos células y obtener un híbrido (hibridoma) que comparten características funcionales de ambas poblaciones celulares. Fusionaron un linfocito B del bazo de un ratón inmunizado con eritrocitos de oveja (que producía anticuerpos contra un epítipo del eritrocito), con células plasmáticas de mieloma de un ratón, la célula resultado de esta fusión vivía de forma indefinida *in vitro*. Este híbrido es capaz secretar inmunoglobulinas en contra del epítipo del eritrocito de oveja, debido a que el hibridoma también había adquirido la facultad de secreción de inmunoglobulinas del mieloma y su capacidad para vivir *in vitro*. Así fue como pudieron producir anticuerpos *in vitro* en contra de un solo determinante de una compleja estructura antigénica. Köhler y Milstein demostraron que virtualmente es posible fusionar cualquier célula con líneas celulares de mieloma, produciendo así cantidades homogéneas ilimitadas de anticuerpos con la especificidad de la célula fusionada.



**Fig. 2.12.** A) Albert H. Coons, B) Cesar Milstein, C) Georges J.F. Köhler, D) Niels K. Jerne.

Actualmente existen numerosas estrategias terapéuticas oncológicas que utilizan anticuerpos monoclonales como el anti-CD20 (Rituximab) [257-258], anti-CD117 (Gleevec) [259], y anti-Her2/neu (Herceptin) [260], determinantes que pueden hacerse evidentes en el tejido obtenido por biopsia mediante inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD20, CD117 y Her2/neu, respectivamente (vide infra) [261]. El uso de anticuerpos monoclonales es parte de la rutina de los laboratorio de patología debido a que son de gran utilidad en el diagnóstico de tumores metastásicos de primario desconocido, tumores de partes blandas, linfomas y leucemias y pueden ayudar a la identificación de algunos agentes infecciosos [262] además, los anticuerpos monoclonales pueden ser de utilidad como factores pronósticos y predictivos en diversos tumores.

Es necesario que el patólogo conozca las características biológicas generales de los antígenos utilizados, así como el tejido con el cual reacciona, la localización celular donde la inmunorreacción debe encontrarse, y tener en mente las posibles reacciones cruzadas inespecíficas de cada anticuerpo. Como ejemplos están las inclusiones nucleares de biotina en el endometrio gestacional mal interpretadas como infección por herpes virus [263], la expresión aberrante de CD43 y CD5 en algunos linfomas B de células pequeñas, la expresión de receptores de estrógenos en adenocarcinomas pulmonares [264], la positividad del HMB45 en pcomas [265-267], y la expresión de CD117 en tumores desmoides y otros tumores de tejidos blandos [268-270].

Muchas de las discrepancias informadas en la literatura se han atribuido a problemas metodológicos y técnicos, primordialmente relacionados con la técnica de conservación y procesamiento de los tejidos [271-272]. Por esto es necesario el uso de métodos estandarizados para inmunohistoquímica diagnóstica, con un continuo programa de calidad, validez independiente y acreditación de laboratorios especializados en la materia [273].

#### 2.4.4.1.1 Interpretación y categorización de las inmunorreacciones basada en la localización celular

Es menester informar no sólo si la inmunorreacción es positiva o negativa, sino también la distribución citológica y las características de expresión de los antígenos empleados. Si no se especifica la localización subcelular (nuclear, membranosa o citoplásmica) del inmunorreactante, el informe diagnóstico podría carecer de significado. Por ejemplo, en ocasiones el Her2/neu (cerbB2) o el CD99 presentan reacción granular citoplásmica que debe considerarse negativa, pues tanto el Her2/neu como el CD 99 deben interpretarse como positivos, exclusivamente cuando la reacción se encuentra en la membrana celular (vide infra).

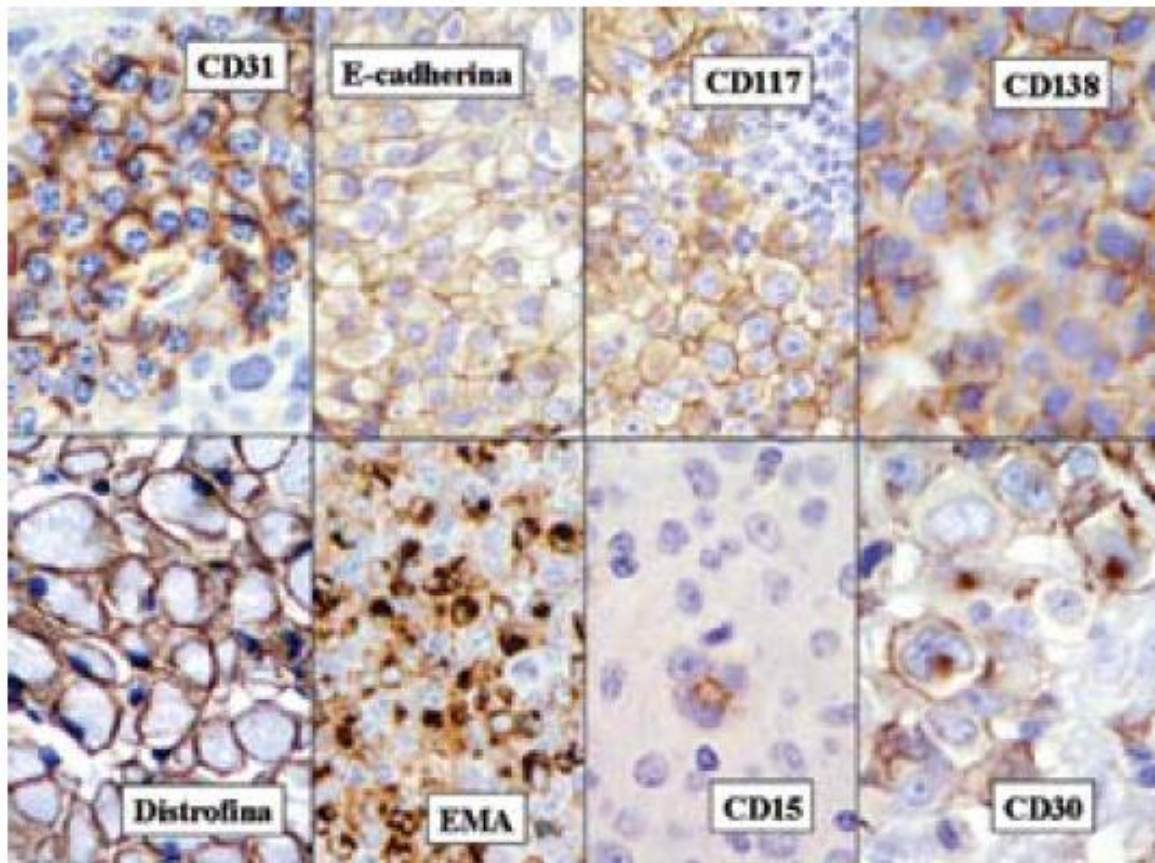
Según el sitio de localización, la inmunomarcación de antígenos celulares puede presentarse en la membrana, el núcleo o el citoplasma. Existen antígenos, como el amiloide, la fibronectina, la laminina y la colágena tipo IV cuya localización es extracelular (Figura 2.13).

Membranoso	Citoplásmico	Nuclear	Extracelular	Mixto
CD1a	Caldesmon	Receptor de Estrógenos	Osteocalcina	B-catenina (M/N)
CD2 /CD3 /CD4 /CD5/ CD7/	Actina de músculo liso	Receptor de Progesterona	Osteonectina	Calretinina (N/C )
CD8	Actina músculo específica	Receptor de Andrógenos	Colágena IV	S-100 (N/C)
CD10	Desmina	p53	Laminina	ALK (N/C)
CD20	Calponina	p63	Componente amiloide P	WT1 (N/C)
CD21	Vimentina	PAX5		CD3 (M/C)
CD23	Citoqueratinas	Oct 2		CD79a (M/C)
CD31	Bcl-2	Oct 3/4		CD15 (M/Golgi/C)
CD34	CD61 (GP11a)	Bob 1		CD30 (M/Golgi/C)
CD43	CD68	Ciclina D1		LMP1 (M/Golgi/C)
CD45	Mieloperoxidasa	TdT		Fascina (C/M)
CD56	TIA-1	Bcl-6		
CD57	Granzima B	NPM1		
Immunoglobulinas	Perforina	Miogenina		
Kappa	TRAcP	MyoD1		
Lambda	DBA 44.1	p16		
CD99	Kappa	p21		
CD123	Lambda	CMV		
CD138	Immunoglobulinas	Telomerasa		
Glucocortina	Cromogranina	CDX-2		
Espectrina	Sinaptofisina	TTF-1		
Trombomodulina	Neurofilamentos	Ki-67		
E-cadherina	GFAP	PCNA		
PLAP	AMACR	VPH		
EMA	Antígeno Próstata Específico	Antígeno T del Virus JC		
Distrofina	a-Inhibina			
CEA	Gonadotropina coriónica humana			
PGP 9.5	a-fetoproteína			
VEGF	HMB-45			
Her2/neu (c-erbB2)	Melan-A			
EGFR1	Mamoglobina			
Glut-1	VEGF			
CD117 (c-kit)	Prolectina			
CD31	ACTH			
CD34				

Figura 2.13. Patrones de localización para diferentes anticuerpos.

## Expresión en la membrana celular

La coloración de la membrana puede presentarse en diferentes circunstancias (Figura 2.14).



**Fig 2.14.** Inmunomarcación de membrana: CD31 en células plasmáticas reactivas. E-cadherina en carcinoma mamario ductal infiltrante. CD 177 en el seminoma clásico. CD 138 en el mieloma de células plasmáticas. Distrofina, marcación submembranaral en músculo esquelético. EMA membrana y acentuación paranuclear en linfoma anaplásico de células grandes. CD 15 positivo granular en región paranuclear. CD 30 células de Reed-Sternberg con marcación membranosa y paranuclear.

### 1) Antígenos localizados en la membrana celular

- Moléculas de adhesión celular como: caderinas, moléculas plaquetarias de adhesión endotelial (PECAM), moléculas de adhesión celular neural (N-CAM), moléculas de adhesión celular epitelial (Ep-CAM).
- Proteínas y receptores de la superficie celular o transmembranosas, como el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), Her2/neu (c-erbB-2), CD117 (c-kit),

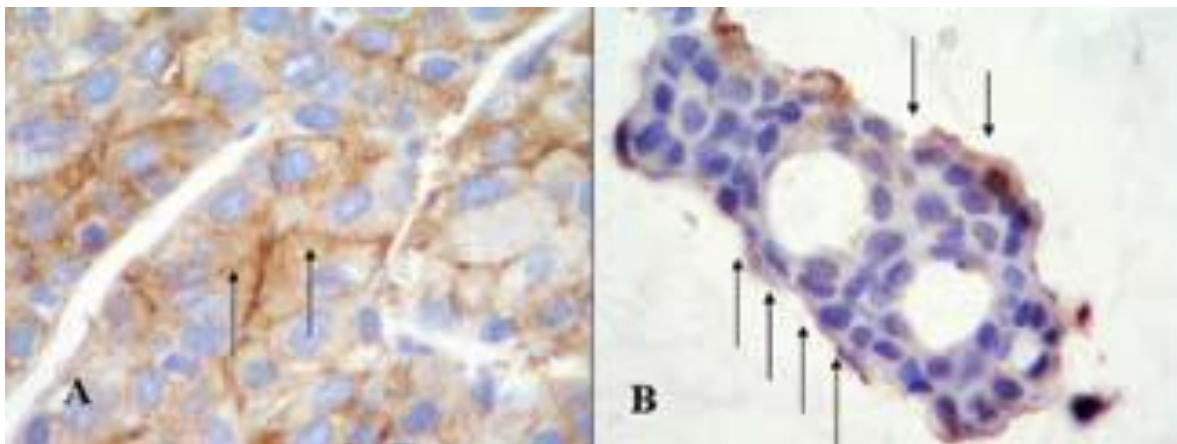


CD31, CD34, algunos antígenos leucocitarios (CD20, CD3, CD43, CD138), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR) y la proteína latente de membrana del virus de Epstein-Barr (LMP1).

2) *Moléculas con patrón membranoso*. Se obtiene este patrón debido a que los anticuerpos se unen a proteínas de membrana y con el citoesqueleto subyacente, como la  $\beta$ -catenina (en células epiteliales), la distrofina (en células musculares) y la espectrina (en eritrocitos). Estas proteínas muestran inmunoreactividad de membrana por su localización lineal a lo largo de la interfase membrana-citoplasma [261]. Algunos anticuerpos dirigidos contra antígenos de las membranas suelen producir marcación perimetral, que puede estar acompañada de acentuación citoplásmica para-nuclear (aparato de Golgi) como el CD30, CD15, el LMP-1 y el EMA (este último en casos de linfoma anaplásico de células grandes). Esto se debe a que el aparato de Golgi es el sitio donde se agregan los carbohidratos a las proteínas antes de ser transportadas hacia la superficie celular (Figura 2.14). En ocasiones, la marcación es exclusivamente en el aparato de Golgi, cuando la densidad de las moléculas en la superficie celular es muy baja para su detección inmunohistoquímica, como puede verse con el CD15 (LeuM1), como en algunos casos de linfoma de Hodgkin clásico (figura 2); la fascina tiene marcación membranosa y citoplásmica [261].

La polarización normal de las células epiteliales hace que algunos antígenos de la membrana muestren marcación restringida o predominante en su superficie apical, como puede verse con el antígeno de membrana epitelial, el antígeno carcinoembrionario, la villina o en las superficies baso-laterales, como cuando se utiliza E-caderina,  $\beta$ -catenina, o Ep-cam (figura 3). Este es el patrón de marcación “polarizado” de algunos antígenos en células normales y puede reemplazarse por marcación perimetral en neoplasias malignas debido a los trastornos en la polaridad celular que ocurren en las células neoplásicas. El carcinoma mucinoso es un ejemplo de polaridad

alterada. Esta variante de carcinoma mamario mucinoso podría ser una forma de carcinoma in situ en donde la mucina, en lugar de ser secretada hacia la superficie apical celular, por medio de un mecanismo de “inversión de la polaridad”, produce secreción hacia el estroma, lo que conlleva el desprendimiento del epitelio de su estroma subyacente. De esta forma, la mucina “invade” el estroma y separa a las células de su membrana basal. Lo anterior no sólo explica el excelente pronóstico del carcinoma mucinoso de la mama sino, además, el hecho de que casi la mayor parte del moco es extracelular.<sup>21</sup> En el carcinoma mucinoso la expresión de algunos inmunorreagentes, como el antígeno de membrana epitelial y el antígeno carcinoembrionario predominan hacia la superficie basal, lo que traduce esta “inversión de la polaridad” (Figura 2.15) [274-279]



**Fig 2.15.** Inmunomarcación con antígeno carcinoembrionario (CEA). A) Carcinoma hepatocelular. Nótese la polarización de la inmunorreacción hacia la superficie apical de las células (flechas). B) Carcinoma mucinoso de la glándula mamaria. La positividad CEA exhibe acentuación en la parte adluminal (flechas).

Los siguientes tres ejemplos de inmunorreacción membranosa tienen relevancia clínica bajo ciertas circunstancias:

- 1) La expresión membranosa del Her-2/neu tiene implicaciones pronósticas. Existe correlación directa entre la expresión de HER-2/neu y la resistencia a citoxano/metotrexato y tamoxifeno. Con tecnología recombinante se desarrolló un anticuerpo monoclonal contra HER-2/neu, conocido como trastuzumab

(huMAB HER-2, Herceptin®) que inhibe al HER-2/neu y, a su vez, bloquea el crecimiento de la célula neoplásica. Por inmunohistoquímica utilizando HercepTest (DAKO Corporation®), o con cerbB2/CB11 se puede determinar si hay expresión de Her2/neu. La interpretación se hace mediante una escala que va de 0 a 3 (marcación de membrana) con equivalencia con la sobreexpresión génica. Cuando las células tienen menos de 20,000 receptores no muestran inmunomarcación (negativo, 0); si tienen cerca de 100,000 receptores muestran inmunomarcación parcial, leve o moderada de la membrana con menos de 10% de las células con marcación completa en la membrana (positivo, 1+); cuando tienen 500,000 receptores muestran inmunomarcación en la membrana en más de 10% de las células (positivo, 2+), y si tienen aproximadamente 2'300,000 receptores muestran inmunomarcación completa de la membrana en más del 10% de las células (positivo, 3+). Cuando se realiza inmunohistoquímica estandarizada en tejidos bien fijados y procesados hay una excelente correlación entre el número de genes amplificados y la expresión proteica membranosa [280-298]. Otro marcador de membrana con implicaciones pronosticas es el factor de crecimiento epidérmico que normalmente se expresa en los estratos basal y supra basal de los epitelios escamosos estratificados y se sobreexpresa en varios carcinomas, por incremento en el número de copias génicas.<sup>23</sup> El anti-EGFR (Gefitinib ®, Cetuximab®) se utiliza en el tratamiento de carcinomas del pulmón, carcinomas de la cabeza y el cuello, y otros tipos de tumores. La evaluación inmunohistoquímica del anti-EGFR es membranosa y, de manera similar al Her2/neu, existe una forma de evaluar la sobreexpresión del factor de crecimiento epidérmico: multiplicando la extensión e intensidad de la positividad de la marcación (0,1, 2, 3) [299-313].

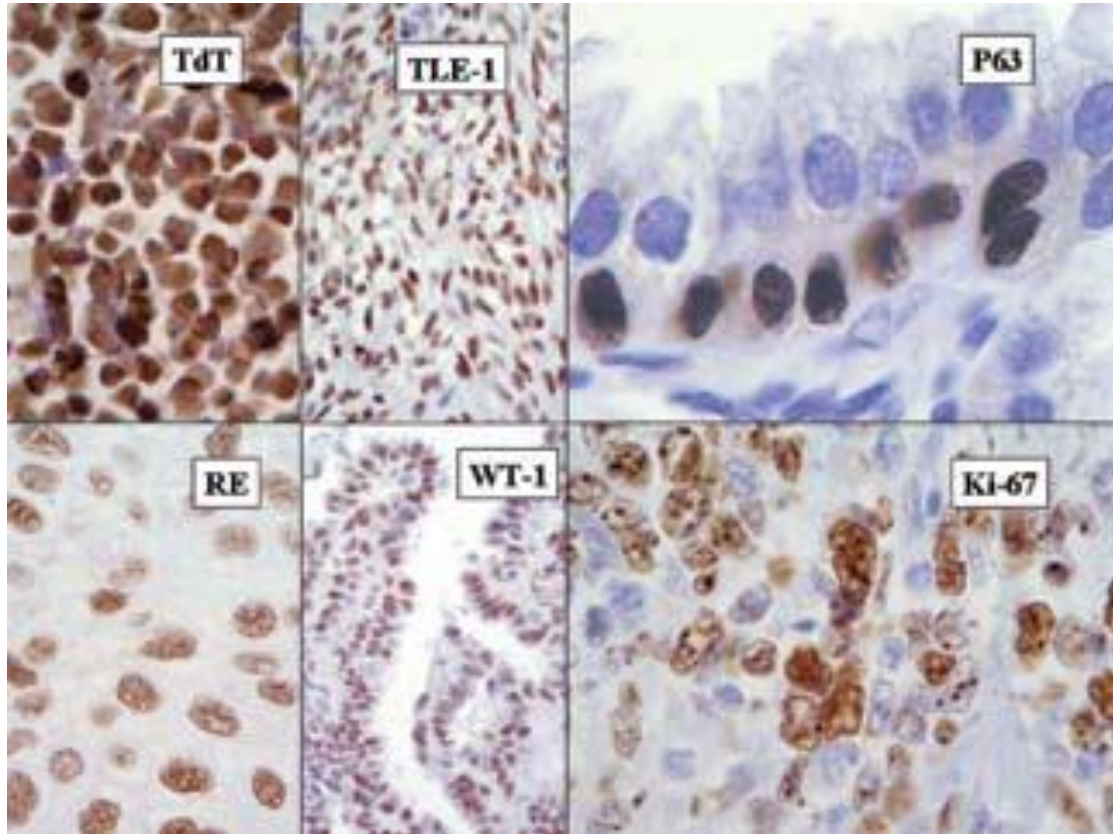
- 2) Los antígenos leucocitarios, que incluyen CD-1, CD-2, CD-3, CD-4, CD-5, CD-7, CD-8, CD-19, CD-20, CD-43 y CD-45, CD133, son receptores de la superficie celular o ligandos involucrados en el reconocimiento, interacción, adhesión y transducción celular de señales o interacción con proteínas solubles-glicoproteínas y matriz extracelular. La marcación inmunohistoquímica para estos antígenos produce un patrón perimetral de membrana debido a la distribución uniforme de estos antígenos en la superficie celular. La expresión de membrana en los linfocitos neoplásicos puede ser el blanco de anticuerpos terapéuticos. El más utilizado en el tratamiento de linfomas de células B y linfoma de Hodgkin de predominio linfocítico nodular es el anticuerpo anti-CD-20/rituximab (Mabthera®). Se han estudiado otros anticuerpos como el Blinatumomab®, Polatuzumab® y Bortezomib®, con resultados esperanzadores [314-317]. Rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico murino-humano que se une específicamente al CD20 y establece funciones para mediar la lisis de las células B. Otro anticuerpo del que recientemente puede disponerse es el Campath-1H (Alemtuzumab®) y los anticuerpos Ofatumumab®, Obinutuzumab®. Este anticuerpo está dirigido contra el CD52, que es una proteína que se encuentra en la membrana de los linfocitos B, y que se ha utilizado en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica [318-325].
- 3) El CD117 (c-kit) es una proteína transmembranosa de 145 KDa que funciona como receptor de la tirosina cinasa. El gen c-kit se localiza en el cromosoma 4 (4q11-12) próximo al gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El CD117 es un epítipo localizado en el dominio extracelular del receptor y es estructuralmente similar a otros receptores con actividad de tirosina cinasa, como el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRs), y el factor estimulante de colonias (CSF1R) entre otros. El c-kit,

normalmente, se expresa en las células hematopoyéticas progenitoras, células cebadas (mastocitos), células germinales, melanocitos y células intersticiales de Cajal. La mutación da como resultado la activación constitutiva del c-kit, que participa en la patogénesis de los tumores del estroma gastrointestinal y representa uno de los mayores criterios diagnósticos para estos tumores. La demostración inmunohistoquímica de CD117 no sólo contribuye al diagnóstico de los GIST, sino en la selección de los pacientes que pueden beneficiarse con el tratamiento con el inhibidor del receptor de tirosina cinasa STI571 (Gleevec®). Existen algunos informes de la expresión de CD117 en sarcomas de células claras, tumores desmoides intra-abdominales, angiomiolipomas, y otros tumores de partes blandas. Por las características biológicas del c-kit, que es un receptor transmembranoso, la inmunomarcación debe ser predominantemente de la membrana celular o citoplasmática con acentuación de la primera [326-343].

### **Expresión nuclear**

Existen diversos anticuerpos dirigidos contra las proteínas o enzimas nucleares. La mayor parte de los antígenos nucleares incluye a proteínas asociadas al ciclo celular, proteínas reparadoras de genes, enzimas nucleares, factores de transcripción, productos de genes supresores tumorales, receptores de hormonas esteroideas, proteínas ligadoras de calcio, y algunas proteínas virales nucleares (cuadro 1 y figura 4). La decoración nuclear puede ser homogénea granular, como: TdT, bcl-6, p63 y los receptores de estrógenos, progesterona y andrógenos; con patrón moteado, como lo expresa el antígeno nuclear latente del Herpes virus humano 8, o granular fino con acentuación nucleolar como el Ki-67 (MIB-1), telomerasa, nucleofosmina o *transductin-like enhancer of split 1* TLE-1 (Figura 2.16). El WT1, por sus siglas en inglés [resultado de la translocación recíproca t (11;22) (p13;q11) o (p13;q12)], es un marcador nuclear

que se encuentra en el tumor de Wilms, tumor desmoplásico intra-abdominal y tumores serosos del ovario; sin embargo, en algunos otros tumores puede haber positividad citoplásmica [344-355].

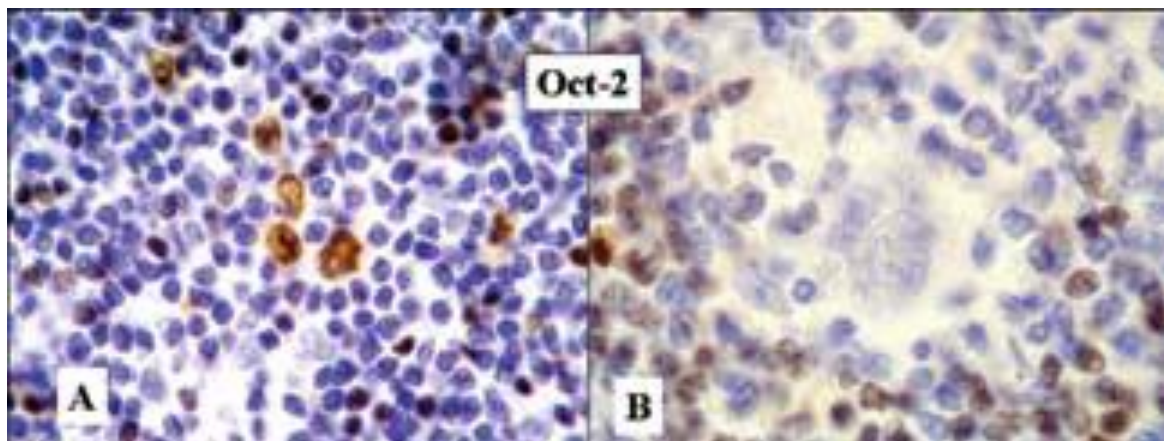


**Fig 2.16.** Inmunomarcación nuclear. TdT en un linfoma linfoblástico, TLE1 en sarcoma sinovial, p63 células mioepiteliales de la glándula mamaria. Receptores de estrógenos en carcinoma mamario ductal, WT1 en tumor seroso de ovario, Ki67 en linfoma B difuso de células grandes.

El Pax-5 y Oct2 son marcadores de expresión nuclear intensa en linfocitos B y contribuyen al diagnóstico de linfoma de Hodgkin clásico y al de predominio linfocítico. La familia de transcritores nucleares Pax está compuesta por nueve miembros que funcionan durante la embriogénesis y regulan la diferenciación celular. El Pax 5 (localizado en el cromosoma 9p13) codifica a una proteína de línea específica de linfocitos B (B-cell specific activator protein/BSAP) que se expresa en células precursoras B (pro-B y pre-B) y linfocitos maduros. La expresión débil granular nuclear en las células de Reed-Sternberg es de utilidad en el diagnóstico inmunohistoquímico

del linfoma de Hodgkin clásico. El Oct2 es un factor de transcripción nuclear de células B que se une específicamente al octámero (5'ATTGCAT- 3') y regula la activación de la expresión génica de inmunoglobulinas en conjunto con la coactivación de BOB-1. El Oct2 se expresa en la mayor parte de los núcleos de los linfocitos B y en casi todos los linfomas B. El Oct2 es positivo en los núcleos de las células L y H (en palomita de maíz) del linfoma de Hodgkin con predominio linfocítico nodular y es negativo hasta en 75% de las células de Reed-Sternberg del linfoma de Hodgkin clásico (Figura 2.17).

En algunos anticuerpos la marcación nuclear puede estar acompañada de positividad citoplasmática variable, quizá relacionada con la difusión de moléculas o localización parcial de las moléculas en el citoplasma, como la proteína S-100, la calretinina, y el Alk-1 (este último en algunas circunstancias produce marcación simultánea del núcleo y el citoplasma, vide infra) [356-368].



**Fig 2.17.** Inmunomarcación con Oct-2. A) Linfoma de Hodgkin de predominio linfocítico nodular. Inmunomarcación nuclear en células L y H. B) Linfoma de Hodgkin clásico (esclerosis nodular). Nótese que la célula de Reed-Sternberg (centro) es negativa, mientras que los linfocitos B pequeños reactivos muestran positividad nuclear.

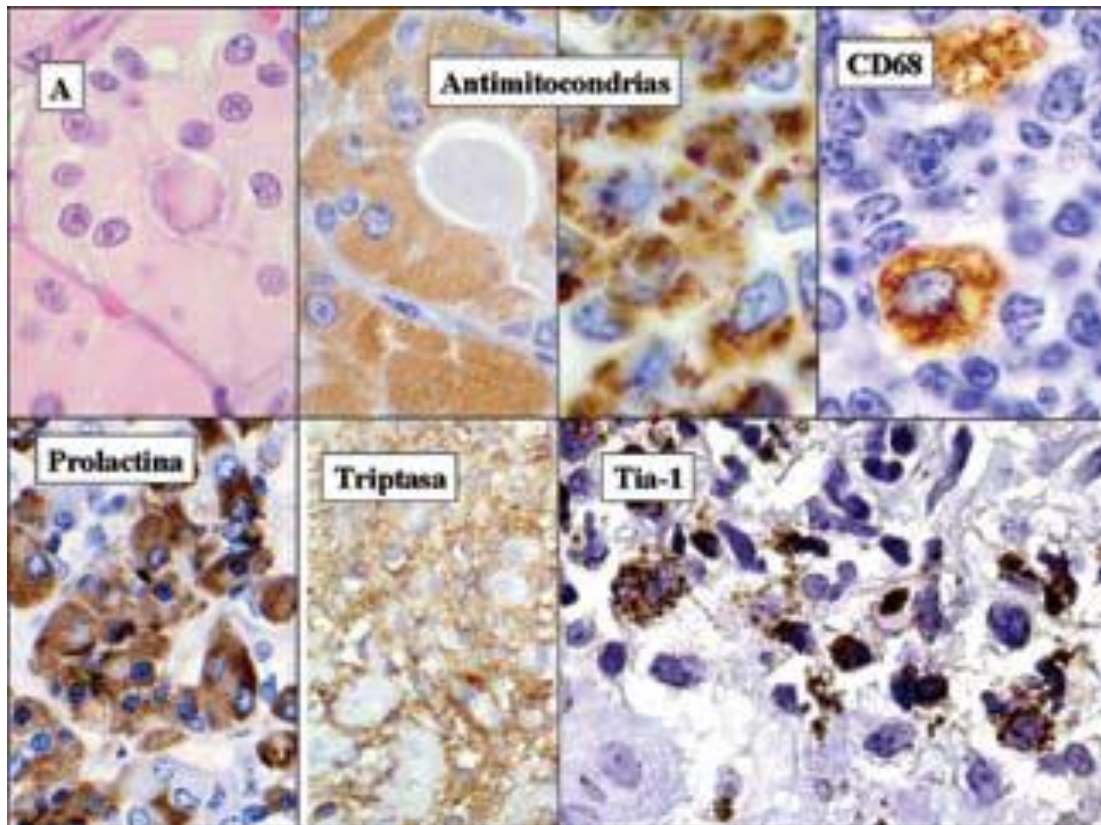
## Expresión citoplasmática

El citoplasma contiene diversos orgánulos y una red de estructuras que forman el citoesqueleto (microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos) responsable de la forma, rigidez, transporte intracelular y de la movilidad celular. Los antígenos citoplasmáticos muestran tres patrones de tinción: a) granular, b) difuso, y c) fibrilar.

### a) Patrón citoplásmico granular.

La decoración citoplásmica granular identifica los antígenos que se localizan en los orgánulos, como: anticuerpos anti-mitocondriales, enzimas y proteínas lisosomales (CD68), gránulos citoplásmicos de los mastocitos (triptasa, CD117), gránulos citotóxicos (CD56, Tia-1), gránulos secretores neuroendocrinos (cromogranina, sinaptofisina, PGP 9.5), hormonas (prolactina, ACTH, hormona del crecimiento) y algunos microorganismos (Figura 2.18). La marcación puede parecer homogénea cuando la célula está “empaquetada” por dichos orgánulos o gránulos, pero en la observación detallada se podrán identificar gránulos en una proporción del citoplasma celular. Los gránulos citoplasmáticos pueden tener polarización celular particular, como los gránulos de las células neuroendocrinas del aparato gastrointestinal que se concentran en la base de la célula, que es el polo donde son vertidos hacia los vasos sanguíneos del estroma. Los gránulos de secreción exocrina o apócrina se localizan, predominantemente, por debajo del polo apical de las células (localización luminal).



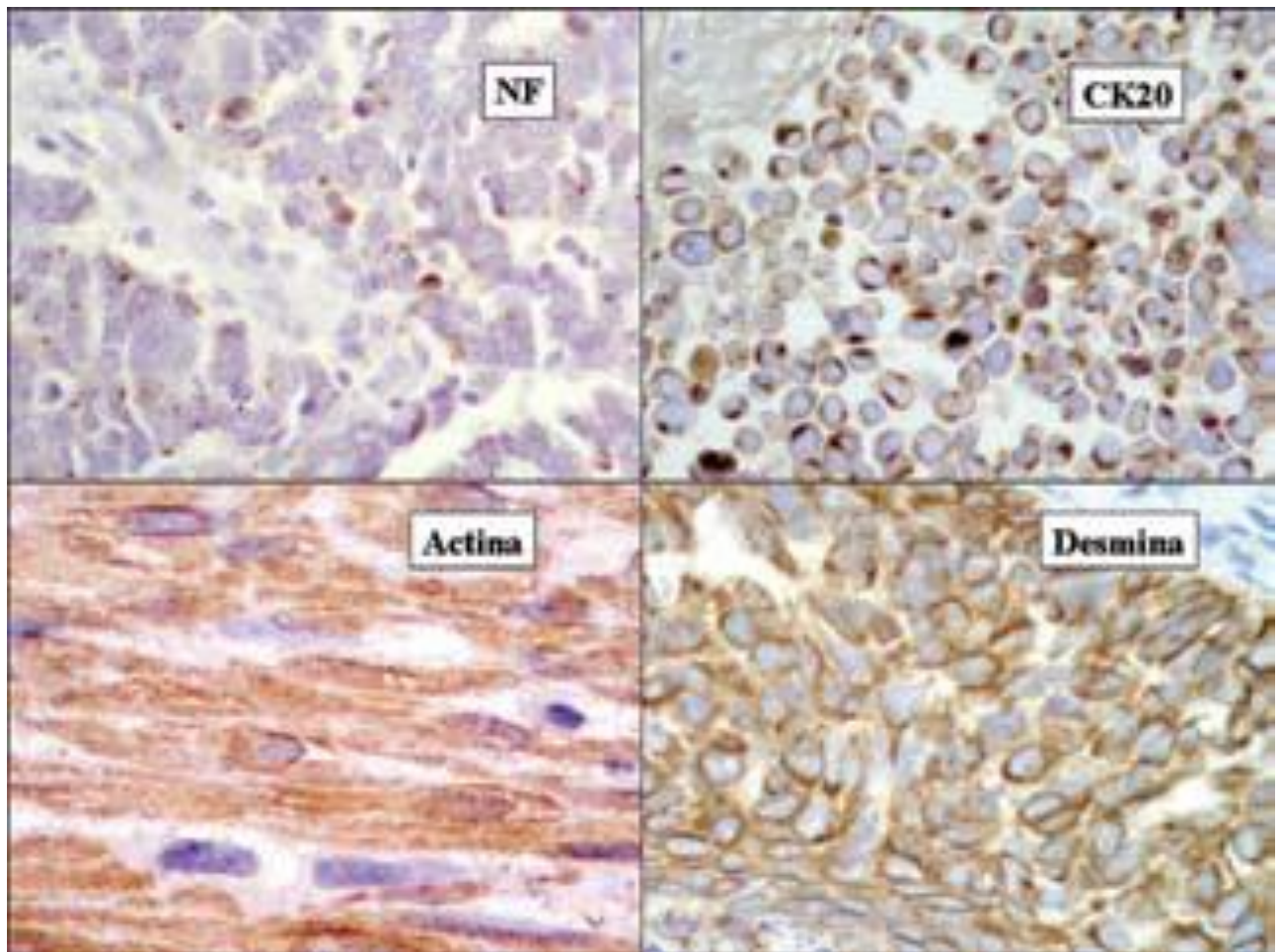


**Fig 2.18.** Inmunomarcación citoplásmica. A) Tumor de Warthin H y E. Antimitocondrias en el mismo tumor de Warthin de la figura A y en un caso de carcinoma mamario oncocítico. CD68 en macrófagos, prolactina en hipófisis normal, triptasa en mastocitoma cutáneo, Tia-1 en linfoma T/NK.

b) Patrón citoplásmico fibrilar.

El esqueleto celular está compuesto por filamentos: pequeños (actina), grandes (microtúbulos) e intermedios (citoqueratina, vimentina, desmina, proteína fibrilar ácida glial, neurofilamentos, nestina, periferina, internexina y lamininas nucleares). Las fibras del citoesqueleto forman una malla que se extiende desde la membrana nuclear hasta la membrana celular, por lo que la inmunomarcación de estas proteínas exhibe de forma característica un patrón fibrilar, frecuentemente con acentuación submembranosa debido al “revestimiento” laminar que estas fibras tienen por debajo de la membrana celular y simulan el patrón de marcación de membrana. Con diversos anticuerpos en los carcinomas de células pequeñas (queratinas), carcinomas de células de Merkel (CK 20,

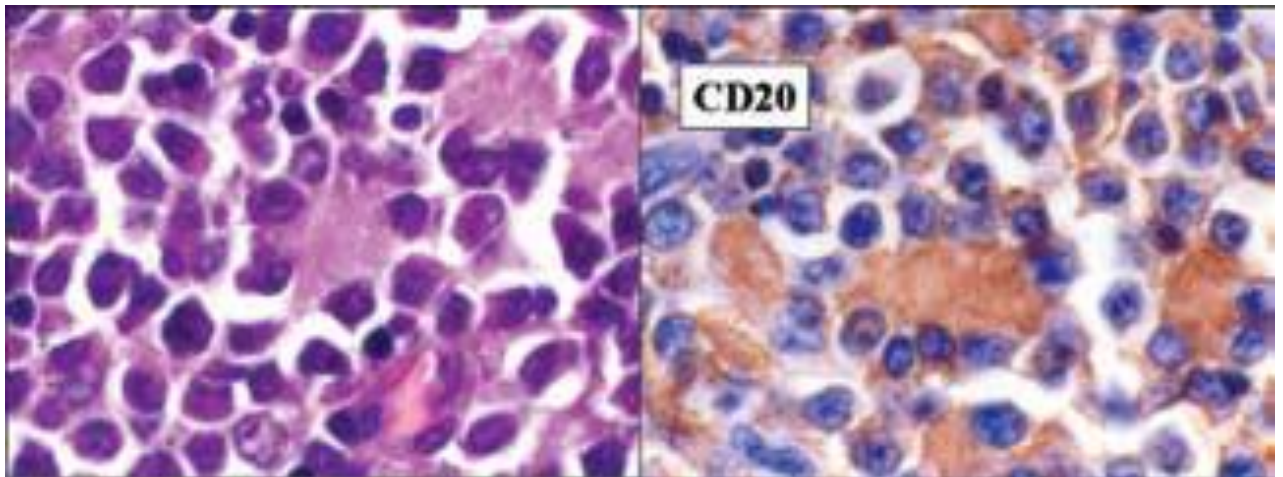
cromogranina A), tumor desmoplásico de células pequeñas (desmina) y tumores rabdoideos malignos (queratina/vimetina) puede apreciarse acentuación en la decoración en la región perinuclear (punto paranuclear) debido a la existencia de cúmulos o agregados de filamentos intermedios en esta región (Figura 2.19).



**Fig 2.19.** Inmunomarcación citoplásmica. Arriba izquierda y arriba derecha, neurofilamentos y queratina 20 en tumor de células de Merkel, nótese la acentuación paranuclear (punto paranuclear). Abajo izquierda pared muscular de intestino con actina, marcación fibrilar. Abajo derecha. Tumor desmoplásico de células pequeñas con desmina, nótese la acentuación paranuclear.

## c) Patrón citoplasmático.

Los antígenos que producen un patrón de marcación citoplasmático incluyen: proteínas del citoplasma o vesículas grandes, como: hemoglobina, albúmina, mioglobina, tiroglobulina, enolasa neurona específica, inmunoglobulinas, CD3, CD79a, bcl-2 y algunas proteínas virales, como el HBsAg, que produce un patrón homogéneo de tinción, casi siempre paranuclear. La positividad para estas moléculas puede, algunas veces, mostrar un patrón granular. Las inmunoglobulinas, CD3, CD79a, y bcl-2 tienen marcación citoplásmica con acentuación alrededor de la membrana nuclear [269-373]. Existen casos raros de linfomas B de células grandes con abundante matriz fibrilar que mediante el uso de CD20 exhibe inmunorreacción positiva con patrón de marcación citoplásmica “estriada”, lo que indica que el material está formado por membrana celular con procesos celulares interdigitantes (Figura 2.20) [374-378].



**Fig 2.20.** Linfoma no Hodgkin difuso de células grandes con matriz fibrilar y formación de pseudo-rosetas. Izquierda H&E, derecha CD20. Nótese como las células se agregan formando “pseudo-rosetas” y las membranas son marcadas con CD20.

### 2.4.4.1.2 Expresión inmunohistoquímica como reflejo de eventos moleculares

La expresión inmunohistoquímica de algunos antígenos es el resultado de productos de expresión genética secundarios a traslocaciones específicas (Figura 2.21).

Como referencia se citan tres ejemplos.

<i>Proteína detectada (IHQ)</i>	<i>Enfermedad</i>	<i>Gen de fusión</i>	<i>Translocación</i>	<i>Patrón de tinción</i>
Ciclina D1	Linfoma de células del manto	CyclinD1-IgH	t(11;14)(q13;q32)	nuclear
	Mieloma múltiple	CyclinD1-IgH	t(11;14)(q13;q32)	nuclear
Bcl-2	Linfoma folicular	bcl-2-IgH	t(14;18)(q32;q21)	nuclear
		bcl-2-IgL	t(2;18)(p12;q21)	nuclear
Bcl-10	Linfoma MALT	bcl-10-IgH	t(1;14)(p22;q32)	nuclear
		API2-MALT1	t(11;18)(q21;q21)	nuclear
		bcl-10-Ig?	t(1;2)(p22;p12)	nuclear
ALK-1	Linfoma anaplásico de células grandes	NMP/ALK	t(2;5)(p23;q35)	nuclear y citoplásmico
		TPM3-ALK	t(1;2)(q21;p23)	citoplásmico con acentuación membranosa
		TPM4-ALK	t(2;19)(p23;p13.3)	citoplásmico con acentuación membranosa
		TFG-ALK	t(2;3)(p23;q21)	citoplasma
		ATIC-ALK	Inv(2)(p23;q35)	citoplasma
		CLTCL-ALK	t(2;22)(p23;q11.2)	citoplásmico granular
WT1 (carboxi-t)	Tumor de células pequeñas redondas desmoplásico	MSN-ALK	t(X;2)(q11-12;p23)	membranoso
		EWS-WT1	t(11;22)(p13;q12)	Nuclear (en ocasiones puede haber marcación citoplásmica, ver texto)
FLI1	Sarcoma de Ewing/PNET	EWS/FLI1	t(11;22)(q24;q12)	nuclear
TFE3	Carcinoma renal con tXp11.2	PRCC-TFE3	t(X;1)(p11.2;q21)	nuclear
		ASPL-TFE3	t(X;17)(p11.2;q25)	nuclear
		PSF-TFE3	t(X;1)(p11.2;p34)	nuclear
		NonO-TFE3	Inv(X)(p11;q12)	nuclear
SYT	Sarcoma sinovial	SYT-SSX1,2,4	t(X;18)(p11.2;q11)	nuclear

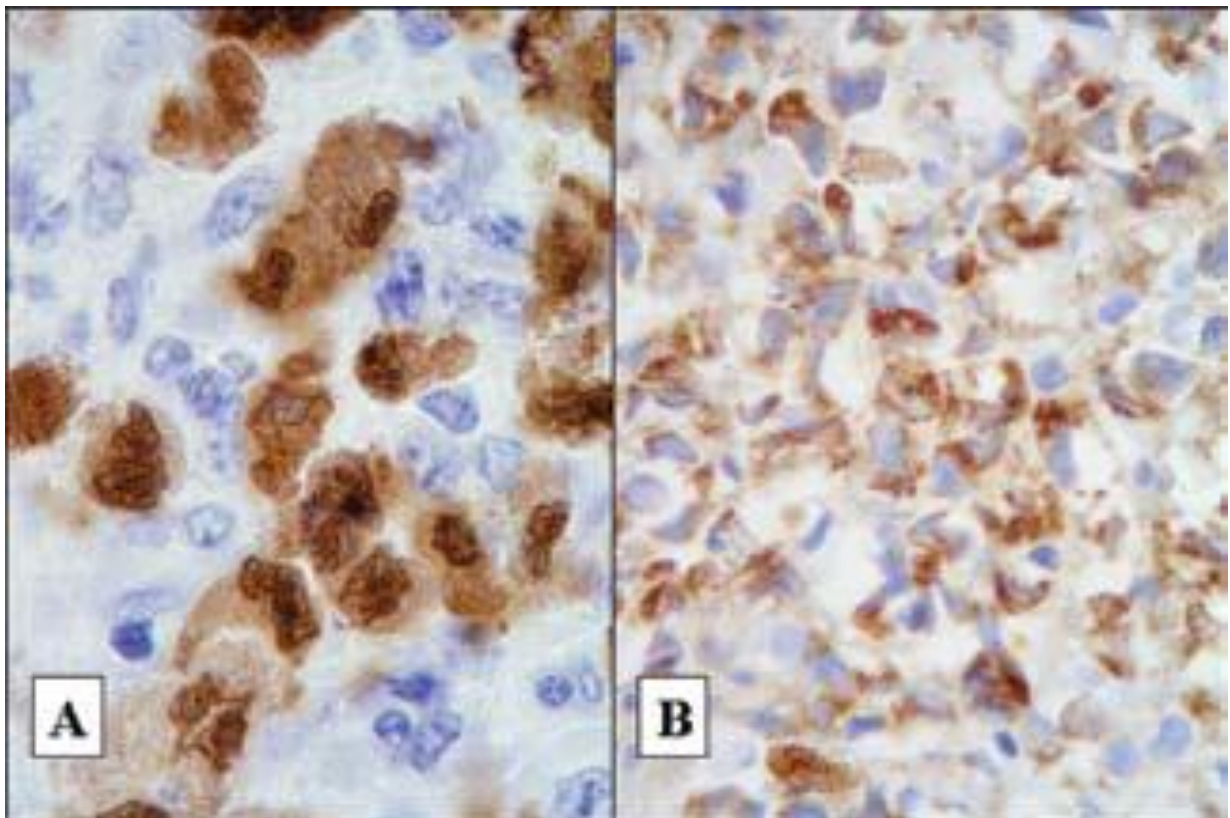
**Fig 2.21.** Detección de proteínas relacionadas con eventos moleculares específicos.

## 1) ALK

La expresión de ALK (Anaplastic lymphoma kinase) en los linfomas anaplásicos de células grandes (LACG) refleja la translocación  $t(2;5)(p23;q35)$ , que se encuentra hasta en 70% de estos linfomas. El gen de la cinasa del linfoma anaplásico (ALK) codifica una tirosina cinasa transmembranosa, que pertenece a la super familia de receptores de insulina y se localiza en el cromosoma 2p23. En los linfomas anaplásicos de células grandes con la translocación clásica  $t(2;5)(p23;q35)$ , el gen ALK se fusiona con el gen de nucleofosfamina (NPM) que se localiza en el cromosoma 5 y codifica una proteína nuclear [344]. Esta fusión de genes resulta en la producción de una proteína quimérica con el extremo amino terminal de nucleofosfamina unido al dominio citoplásmico del gen de la cinasa del linfoma anaplásico. Esto lleva a la activación de la tirosinacinasas que quizá juegue un papel fundamental en la génesis de los LACG [379-387]. La localización inmunohistoquímica subcelular de ALK puede correlacionarse con el patrón de translocación. En los LACG con  $t(2;5)$  (NPM-ALK) la expresión de ALK coexiste tanto en el núcleo como en el citoplasma. La marcación granular citoplásmica se relaciona con la  $t(2;22)$  (translocación entre el gen de la clathrina-CLTCL y el gen ALK), y la marcación de membrana y citoplasma indica  $t(1;2)$  (translocación entre el gen de la tropomiosina- TPM3 y el gen ALK) [388-400]. La positividad inmunohistoquímica para ALK representa un punto esencial en el diagnóstico de los LACG (Figura 2.22).

La expresión del ALK puede identificar un subtipo de LACG que, predominantemente, ocurre en pacientes jóvenes, con buena respuesta a la quimioterapia y pronóstico favorable. Por excepción, algunos linfomas difusos de células grandes B pueden expresar ALK. Estos casos presentan, predominantemente, morfología inmunoblástica-plasmoblástica y pueden tener crecimiento sinusoidal. El patrón de inmunomarcación también se correlaciona

bien con el gen translocado, que es citoplasmático granular cuando es CLTCL (Clathrina), y nuclear-citoplasmático cuando es NPM [388-400]. La expresión del ALK no es exclusiva de los LACG, puede encontrarse en otros tumores, como los inflamatorios miofibroblásticos (en donde se ha identificado la translocación del gen ALK), en el rhabdomiosarcoma alveolar, el mesenquimoma maligno, los liposarcomas pleomórficos y mixoides, el sarcoma de Ewing/tumor neuroectodérmico primitivo, el sarcoma fibromixóide de bajo grado, el osteosarcoma extraesquelético, los schwannomas, los lipomas y en el mieloma de células plasmáticas (Figura 2.22) [401-411].



**Fig 2.22.** Alk-1 en linfoma anaplásico de células grandes. A) Marcación nuclear y citoplásmica. B) Marcación granular citoplásmica.

## 2) *BCL-2*

El Bcl-2 (B-cell lymphoma-2), descrito en 1984 por Tsujimoto y col (con la participación de Peter C. Nowell, quien describió el cromosoma Filadelfia) fue la primera proteína que se relacionó con traslocaciones y que se identificó en linfomas (linfoma folicular) [412]. El Bcl-2 es una proteína que se localiza en la membrana interna mitocondrial (y en menor proporción en la membrana nuclear y el retículo endoplásmico) que juega un papel fundamental en la protección celular contra la apoptosis [413-418]. El Bcl-2 suele encontrarse en el citoplasma de los linfocitos B de la zona del manto, en algunas células del centro germinal y en algunos linfocitos T. En la translocación t(14;18) identificada en los linfomas foliculares se yuxtapone el gen que codifica para la proteína Bcl-2 del cromosoma 18 con el gen de cadena pesada de inmunoglobulina del cromosoma 14, e induce la sobreexpresión de Bcl-2. Esta translocación sucede en 75 a 90% de los linfomas foliculares y puede hacerse evidente por medio de inmunomarcación con anti-Bcl-2. Esto se observa en un porcentaje mayor de casos de linfomas foliculares grado I, comparados con los de grado III. Debido a que los centros germinales reactivos no son positivos al Bcl-2, la inmunomarcación con este anticuerpo ha sido de gran utilidad en el diagnóstico diferencial entre hiperplasias y linfomas foliculares. No obstante, la expresión de Bcl-2 no es específica de linfomas foliculares ni indica necesariamente un origen folicular, ya que puede existir en otros procesos linfoproliferativos, aunque en ellos la sobre-expresión de la proteína no se vincula con la translocación (14;18). Debido a que algunas células T son positivas al Bcl-2 en los folículos neoplásicos, es necesario realizar marcadores complementarios para células B y T para evidenciar qué células son las reactivas al Bcl-2 en dichas neoplasias. El Bcl-2 es de utilidad en el diagnóstico diferencial entre linfomas difusos de células grandes con inmunofenotipo B y el linfoma de Burkitt. El linfoma de Burkitt es

negativo al Bcl-2 mientras que el linfoma difuso puede expresar Bcl-2 hasta en 30% de los casos [419-426].

### 3) *BCL-10*.

El Bcl-10 es una proteína adaptadora, con una unión a caspasa (caspase recruitment domain/ CARD) que promueve la apoptosis y activa la pro-caspasa 9 y NF- $\kappa$ B, descrita por primera vez en los linfomas B tipo MALT. Lo normal es que Bcl-10 se exprese en el citoplasma de linfocitos B localizados en centros germinales y en la zona marginal. La expresión nuclear de BCL-10 se manifiesta en un grupo de linfomas B de la zona marginal, extraganglionar (linfomas MALT) con translocación  $t(1;14)(p22;q32)$  o  $t(11;18)(q21;q21)$ . Puede haber inmunomarcación citoplásmica en casos de LZM con  $t(14;18)$  que afectan el gen *MART1*.<sup>57,58</sup> Los casos de LZM con marcación nuclear positiva tienen menor edad de presentación (51.4), mayor predominio del sexo masculino (19/14) y predilección por la localización pulmonar y del aparato digestivo, comparados con los casos con solo marcación citoplasmática (como en los linfomas MALT tiroideos). En los casos originados en el aparato digestivo existe correlación entre el porcentaje de tumores Bcl-10 positivos y el grado de invasión de la neoplasia. Fueron positivos al Bcl-10 36.4% de los tumores confinados a la mucosa y en 100 % de los casos de los tumores con extensión mas allá de la serosa. Además de su reconocida expresión en linfomas B tipo MALT, la expresión de Bcl-10 puede presentarse en algunos casos de linfomas linfoplasmocíticos (macroglobulinemia de Waldenstrom, 55%), todos con positividad nuclear. En general, este último grupo de linfomas muestra mayor índice de afección de la médula ósea, pero no existe correlación entre la



positividad al anticuerpo y las concentraciones séricas de paraproteína IgM de cadenas ligeras o variables clínicas [427-436].

#### 2.4.4.1.3 Antígenos extracelulares

##### a) Osteocalcina

Existen diversas proteínas que intervienen en el proceso de mineralización, que al identificarlas mediante inmunohistoquímica son de importancia diagnóstica en los tumores óseos. La osteocalcina es una de las principales proteínas intraóseas, de función poco precisa, que predominantemente se localiza en el citoplasma de los osteoblastos. Es una molécula de peso aproximado de 5.8 KDa compuesta por 49 aminoácidos que incluyen tres residuos ácido gamma- carboxilglutámico (gla). Después de su producción por los osteoblastos, la osteocalcina se incorpora a la matriz ósea y una fracción se libera a la circulación y puede medirse como parámetro bioquímico del metabolismo óseo. La osteocalcina se sobreexpresa en presencia de análogos de la vitamina D, como la 1,25dihidroxitamina D2 y la 24-epi-1,25dihidroxitamina D2, en el paso final de la diferenciación osteoblástica y en la formación de osteoide. Está demostrado que algunos fibroblastos pueden expresar epítopes que pueden producir reacciones cruzadas cuando se utilizan anticuerpos policlonales anti-osteocalcina, por lo que para un diagnóstico específico se requieren anticuerpos monoclonales con reconocimiento selectivo de péptidos. En la detección de tumores formadores de hueso, la osteocalcina tiene 70% de sensibilidad y 100% de especificidad, comparada con 90% de sensibilidad y 50% de especificidad informada con la osteonectina. Además, hay que considerar que la osteonectina puede ser positiva en el tumor de células gigantes, el condroblastoma, en células endoteliales y fibroblastos, por lo cual debe tenerse precaución en su interpretación [437-442].

### **b) Colágena tipo IV y laminina**

La colágena tipo IV es el principal componente estructural de la membrana basal. Los genes que codifican para la molécula de la colágena IV se localizan en el cromosoma 13q. La colágena IV difiere de los otros tipos de colágena en su secuencia de aminoácidos, pues no forma fibras y su estructura helicoidal se interrumpe. La laminina y la enactina-nidogen son otros de los componentes de la membrana basal que se une a los glucosaminoglicanos: actúan como puente para la unión de la colágena tipo IV de la membrana basal con la matriz adyacente. Además, la colágena IV forma el sustrato para el crecimiento de algunas células endoteliales, musculares y de nervios periféricos y participa en la interacción intercelular. Quizá la alteración estructural de la colágena IV contribuya a diversas alteraciones en la morfología celular [443-451].

Los anticuerpos contra colágena IV son útiles para evaluar la integridad de las membranas en células normales, así como la ausencia de ésta en carcinomas. La adenosis esclerosante y la microglandular de la glándula mamaria tienen una membrana basal bien desarrollada que puede ser resaltada por medio de inmunomarcación con colágena IV. Lo anterior y la existencia de células mioepiteliales evidenciadas por medio de la actina (p63 o CD10) favorecen el proceso reactivo sobre un carcinoma. Para distinguir la pseudoinvasión provocada por cortes tangenciales en un pólipo adenomatoso de un verdadero adenocarcinoma infiltrante puede utilizarse colágena IV (*vide infra*). Un ejemplo de la utilidad de la colágena IV en sarcomas es el diagnóstico diferencial histológico entre histiocitoma fibroso maligno, fibrosarcoma y tumor maligno de vaina nerviosa periférica. La existencia de colágena IV o laminina favorece el tumor maligno de vaina nerviosa periférica, cuando la P-S100 y el CD57 (marcadores de tumor maligno de vaina nerviosa periférica) son negativos [452-457].

Con E-caderina y colágena tipo IV es posible evaluar el estado de las uniones intercelulares junto con la membrana basal. En el adenocarcinoma estos anticuerpos

muestran marcación discontinua en 65% con E-caderina y 96% con colágena IV. Las glándulas en focos de pseudoinvasión muestran expresión membranosa intensa, difusa y continua con E-caderina y continua y bien delimitada en la membrana basal con colágena tipo IV [458-460].

### **c) Amiloide**

El término amiloide (*amylum*) lo acuñó en 1838 el botánico Matthias Schleiden para describir la apariencia del almidón en las plantas. En 1854 Rudolf Virchow empleó el término para designar a los cuerpos amiláceos del sistema nervioso debido a su reacción con tinciones de yodo. Virchow estaba convencido que los cuerpos amiláceos cerebrales podían considerarse idénticos al almidón de las plantas y aplicaba el término amiloide para las enfermedades llamadas “degeneración lardácea” o “ceroide de órganos”, como el hígado o el bazo [461].

La existencia de amiloide define un grupo de enfermedades con etiopatogenia diversa, cuyas características sobresalientes son: el depósito tisular de material proteináceo acelular, amorfo, eosinófilo y que muestra birrefringencia color verde-manzana con luz polarizada con la tinción de rojo Congo.<sup>67</sup> El amiloide corresponde a diversos grupos de proteínas fibrilares no ramificadas que, por difracción de rayos X, orientan perpendicularmente al eje de la fibra a las cadenas de amiloide, en una especie de patrón de “plegamiento beta” (b fibrilosis).

Un elemento más de ayuda para la identificación del material amorfo eosinófilo sospechoso como amiloide es la presencia de una molécula pentagonal de 25 KDa, llamada componente amiloide P, que es parte de todos los tipos de amiloide.<sup>69,70</sup> Existen anticuerpos comerciales dirigidos en contra del componente P. En un estudio de 169 biopsias con amiloidosis, todas fueron positivas para el componente P.<sup>67</sup>

Después de que se determina que el material amorfo es amiloide, el siguiente paso es la caracterización de la proteína amiloidogénica, pues el tratamiento médico es diferente, dependiendo de la causa subyacente a la producción de amiloide. Hasta el momento se han identificado más de 20 diferentes tipos de sustancias generadoras de amiloide. Los tipos más frecuentes de amiloidosis son los provocadas por: a) cadenas ligeras de inmunoglobulinas (AL/45%/ amiloidosis primaria), b) el amiloide AA (amiloidosis reactiva/AA-19%) y c) por transtiretina (ATTR-12%/ amiloide senil). Algunos otros tipos de sustancias amiloidogénicas poco frecuentes son la  $\beta$ 2-microglobulina, calcitonina, fibrinógeno, apolipoproteína AI, lisozima, queratoepitelina y lactoferrina.

Para la caracterización de AL se utilizan anticuerpos contra las cadenas ligeras kappa y lambda de las inmunoglobulinas. El material casi siempre es positivo a uno de los dos inmunorreagentes. Desafortunadamente el AL deriva de las porciones variables de las cadenas ligeras  $\kappa$  o  $\lambda$  por lo cual cada paciente poseerá un tipo único de amiloide L, lo que disminuye las posibilidades de que un solo anticuerpo sea capaz de detectar todas las variantes. Aunado a esto, las proteínas amiloides, especialmente el tipo L, pueden precipitar otras proteínas séricas y provocar inmunomarcación positiva con más de un anticuerpo. Una dificultad más estriba en la coexistencia de dos o más proteínas amiloides en el mismo paciente (AL+A $\beta$ 2M, AL+ATTR, AA+A $\beta$ 2M). Por lo tanto, es importante identificar si existe restricción de cadenas ligeras en las células plasmáticas del tejido en estudio y correlacionarlas con los hallazgos clínicos del paciente [462-481].

#### 2.4.4.1.4 Consideraciones técnicas

##### **Factores que influyen en la inmunomarcación**

En la evaluación de las inmunomarcaciones son importantes dos elementos: 1) el factor preanalítico (intrínseco) y 2) el factor analítico (extrínseco) [482-486].

- a. El factor pre-analítico se refiere a las características del tejido y su preservación antigénica. La conservación adecuada de las características antigénicas del tejido depende del tipo de fijador empleado, de la fijación adecuada, y del tiempo de la fijación. El formol buffer al 10% es el fijador más utilizado. El pH del formol tiene influencia directa en la conservación antigénica del tejido y la variación de este puede alterar la estructura proteica de los epítopes. Algunos procedimientos técnicos, como el sobrecalentamiento del tejido, la descalcificación y la congelación, también pueden afectar la preservación antigénica.
- b. Los factores analíticos (extrínsecos) son los elementos externos al tejido que pueden controlarse en el laboratorio de inmunohistoquímica e incluyen: el tipo de anticuerpo utilizado, la sensibilidad y dilución, el sistema de detección, los cromógenos empleados, el método de recuperación utilizado y la interpretación de la reacción por el patólogo.

##### **Falsos positivos por biotina endógena**

La biotina es una proteína que actúa como cofactor en la reacción de descarboxilación, es parte del complejo de la vitamina B, y se encuentra en células ricas en mitocondrias, como en las células de los túbulos contorneados proximales del riñón, los hepatocitos, las células apócrinas y las células de Hürthle de la tiroides. Durante la recuperación antigénica inducida por el calor (Heat induced antigen retrieval/ HIAR) puede incrementarse la actividad de la biotina endógena y la actividad tipo biotina

(actividad de unión a avidina) y producir marcaciones falsas positivas cuando se utiliza un sistema de detección inmunohistoquímico tipo avidina-biotina. Estos falsos positivos se presentan, sobre todo, con algunos anticuerpos, como es el caso de la inhibina en carcinomas hepatocelulares, del virus herpes simple en endometrio gestacional, y del citomegalovirus cuando se utiliza hibridación *in situ*. La tinción de biotina se localiza con más frecuencia en el citoplasma, casi siempre con patrón granular o moteado. La biotina también puede localizarse en el núcleo, como puede verse en el endometrio gestacional, en las “mórulas” del carcinoma de endometrio, en el blastoma pulmonar, en la variante cribiforme del carcinoma papilar de tiroides, en el pancreatoblastoma y en los adenomas colónicos. Estas falsas positivas secundarias a la actividad de biotina endógena pueden sospecharse cuando la localización y el patrón subcelular de un anticuerpo dado no es el esperado, como el patrón idéntico de marcación visto con múltiples anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos, particularmente si la tinción es débil. La forma de solucionar esta marcación de biotina endógena es con la inmunomarcación con un bloqueo avidina-biotina o un sistema de detección alternativo que no incluya avidina-biotina, como el sistema de detección de polímeros o peroxidasa-antiperoxidasa. Sin embargo, estos sistemas de detección no están totalmente libres de tinciones inespecíficas. Un ejemplo relativamente común es observar la tinción citoplasmática difusa débil en las células del músculo liso usando el sistema de detección de polímeros (EnVision/Dako®); además, algunos anticuerpos por sí solos también pueden producir tinciones inespecíficas (como algunos anticuerpos policlonales) [494-509].

#### **2.4.4.2 Papel de la Inmunohistoquímica en el Esófago de Barrett**

Con los recientes avances en el campo de la biología molecular, los investigadores se han dado a la tarea de caracterizar aquellos eventos decisivos que ocurren durante la transformación metaplasia-displasia-carcinoma. El uso de estos biomarcadores podría aportar una herramienta simple, reproducible y certera en la valoración de la progresión neoplásica. A medida que las células del EB progresan a displasia, adquieren alteraciones genéticas secuenciales que las acercan gradualmente hacia una transformación cancerígena. Los cambios moleculares responsables de esta transformación no se conocen en su totalidad. Se han propuesto seis factores fisiológicos decisivos que las células deben adquirir en su evolución hacia el cáncer (Figura 2.23). Estos eventos decisivos incluyen la habilidad para proliferar sin necesidad de estimulación exógena, para resistir las señales de inhibición celular, para evadir los mecanismos de muerte celular programada o apoptosis, para resistir la senescencia celular, el desarrollo de factores de angiogénesis y la capacidad para invadir y metastatizar [510].

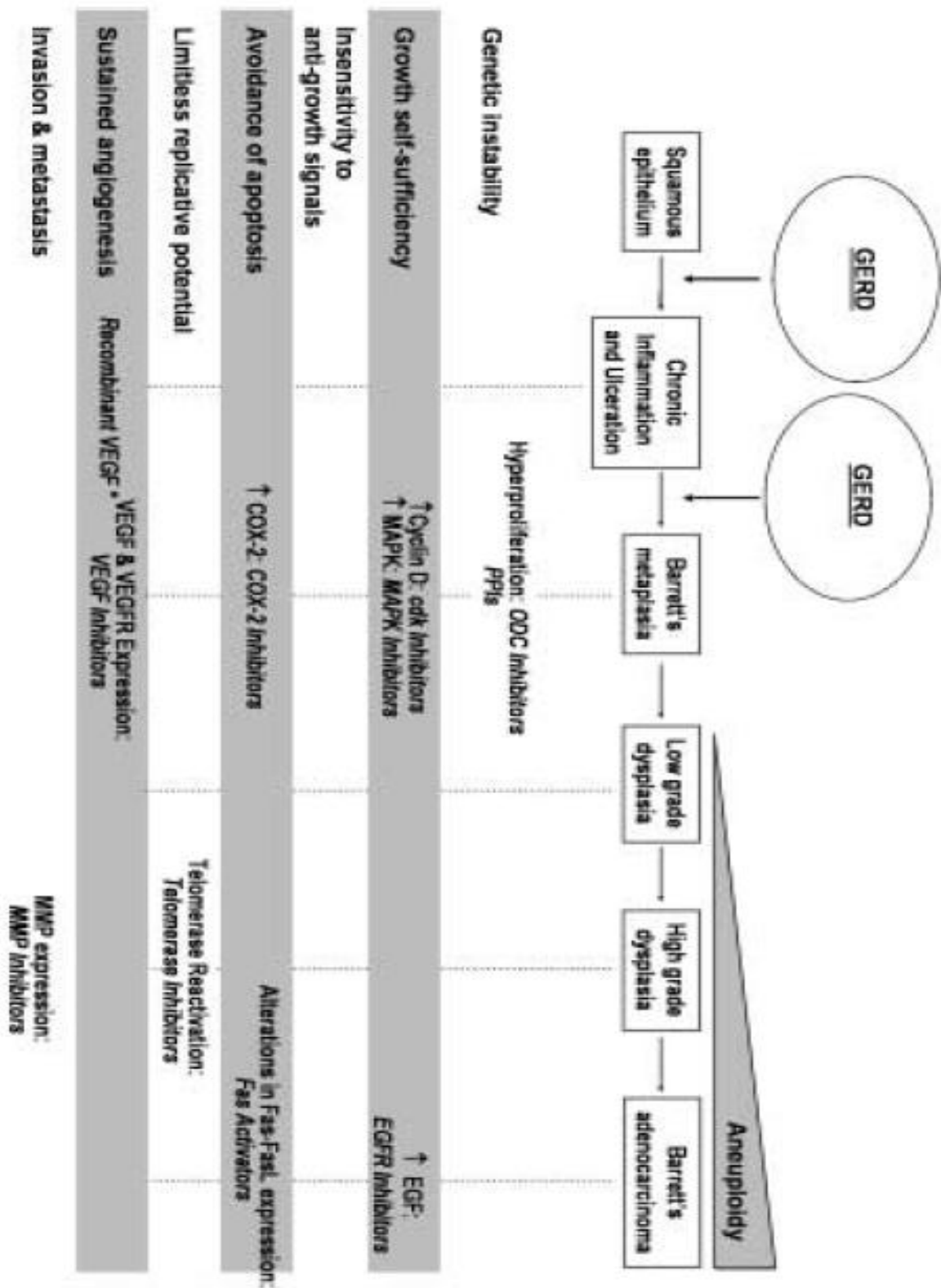


Fig 2.23. Señales moleculares en la transformación carcinomatosa del esófago de Barrett.



Recientes investigaciones han destacado el importante papel de diversos biomarcadores de crecimiento tumoral en el diagnóstico y seguimiento de diversos tipos de tumores gastrointestinales, incluido el ACE en el EB, sin embargo, en el momento actual, el gold standard para valorar el riesgo de progresión y malignización en el EB, sigue siendo su estratificación histopatológica. Sin embargo, esta valoración presenta una gran variabilidad inter-observador ( $\kappa$  0.18-0.35) [511], y marcada tendencia hacia la sobreestimación de los hallazgos observados [512], lo cual puede explicar la gran diferencia en cuanto a predicción del riesgo de malignización se refiere y que va desde el 0.6% hasta el 13.4% [513-515]. Por este motivo, diferentes técnicas inmunohistoquímicas han sido usadas en la estimación objetiva de este riesgo.

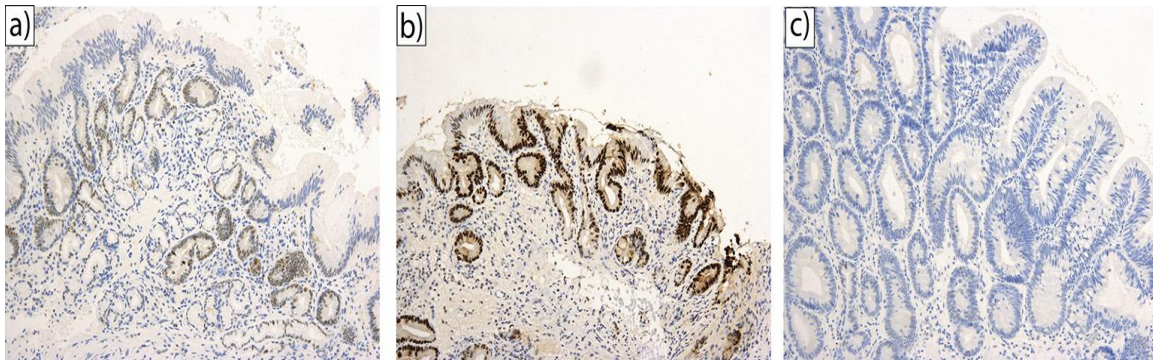
#### 2.4.4.2.1 p53

El gen p53 se localiza en el cromosoma 17p13. El gen p53 codifica un factor de transcripción, la proteína p53, que fue descubierta a fines de los años 70 y participa en el control del ciclo celular, en la síntesis y reparación del ADN y en la apoptosis al activar la p21 en la fase G1/S del ciclo celular. El producto del gen p53 es un regulador del crecimiento y la proliferación celular; en su forma libre (wild type) la proteína p53 suprime el crecimiento celular, mientras que en la proteína mutada actúa como oncogén. El contexto celular, la interacción con otras proteínas celulares y oncovirales y los cambios en la conformación física del p53, son los responsables de la modulación de las funciones de p53 [516-518]. Las mutaciones del gen p53 usualmente tienen como resultado la acumulación de la proteína p53 y de esta manera el producto del gen puede ser detectado por métodos inmunohistoquímicos. Se asume que la p53 está dañada en las áreas que resultan positivas a esta técnica. En el EB, la función de esta proteína se ve alterada por mutaciones o por pérdida de la heterocigosis. La acumulación de la proteína p53 puede ser detectada en una variedad de tumores como carcinoma de mama, pulmón, testículo, estómago, tumores de tejidos blandos y

melanomas. La positividad del p53 ha sido asociada al pronóstico en cáncer colorrectal y de mama entre otros; con el desarrollo de metástasis en cáncer de pulmón y con la disminución de la supervivencia en pacientes con carcinoma de mama, colon, estómago y pulmón [519-521]. Numerosos trabajos describen la acumulación de la proteína p53 en lesiones displásicas de esófago sugiriendo que esta alteración podría tener un rol en la carcinogénesis esofágica. Esta acumulación ocurre a nivel nuclear y se hace más evidente a medida que aumenta el grado de lesión. Las mutaciones habitualmente ocurren en los puentes que unen las cadenas de ADN y pueden conducir a cambios que eviten su síntesis en los tejidos o que sean removidos del tejido por el propio organismo.

La frecuencia de positividad del p53 en esófago de Barrett y adenocarcinomas varía según los autores, entre el 30 y 80%, según el grado de displasia y entre 44 y 90% en adenocarcinomas [522-525]. Las mutaciones de la p53 ocurren raramente en el EB sin displasia (aunque pueden ocurrir si la zona de EB sin displasia estudiada coexiste con un cáncer esofágico en alguna otra localización), sin embargo, pueden ocurrir hasta en el 70% de los casos de ACE [526-528], esto hace pensar que las mutaciones de esta proteína ocurren en fases tardías de su malignización; la pérdida de la heterocigosis en la TP53 puede afectar grandes áreas tisulares a través de la expansión clonal [529].

Nos referimos a una tinción p53 positiva cuando existe un incremento de su presencia o una ausencia total de la misma, su sola presencia, al formar parte de la estructura tisular normal, no puede considerarse patológica. De esta forma se deduce que, al formar parte de la estructura tisular normal, la carencia de la misma es por sí mismo anormal y debe considerarse patológico (Figura 2.24). Por definición, si las mutaciones resultantes conducen a una anulación p53 (a diferencia de las mutaciones puntuales que conducen a anulación parcial de la síntesis de la proteína y, por tanto, tendremos una tinción positiva pero no aumentada), observaremos una ausencia completa de la misma, situación que se ha relacionado con la presencia de displasia [530].



**Fig 2.24.** Inmunohistoquímica del p53 en el EB. a) Patrón normal, b) Sobreexpresión de p53, c) Ausencia de expresión de p53.

La inmunohistoquímica de la p53 es una técnica útil, que aporta información clínicamente relevante viniendo a complementar el estudio histopatológico convencional [531]. Puede ser particularmente útil a la hora de disminuir el sesgo inter-observador en la interpretación de la displasia [532]. Las guías clínicas actuales recomiendan el estudio de la p53 en todos los casos de displasia, como añadido a las técnicas convencionales, a fin de lograr una evaluación objetiva histopatológica más fácilmente reproducible. También es una herramienta útil a la hora de valorar el riesgo de progresión. Según diferentes estudios, un resultado patológico puede indicar un incremento del riesgo de progresión del EB (OR 3-8) [534-534]; si la positividad de la técnica se combina con otros marcadores de progresión (por ejemplo, una DBG observada por tres anatomopatólogos digestivos) el riesgo verdadero de progresión sería realmente significativo [535]. Estos hallazgos confirman las observaciones realizadas por diferentes autores [536-538].

#### 2.4.4.2.2 $\alpha$ -metilacil-coenzima A racemasa (AMCAR/P504S)

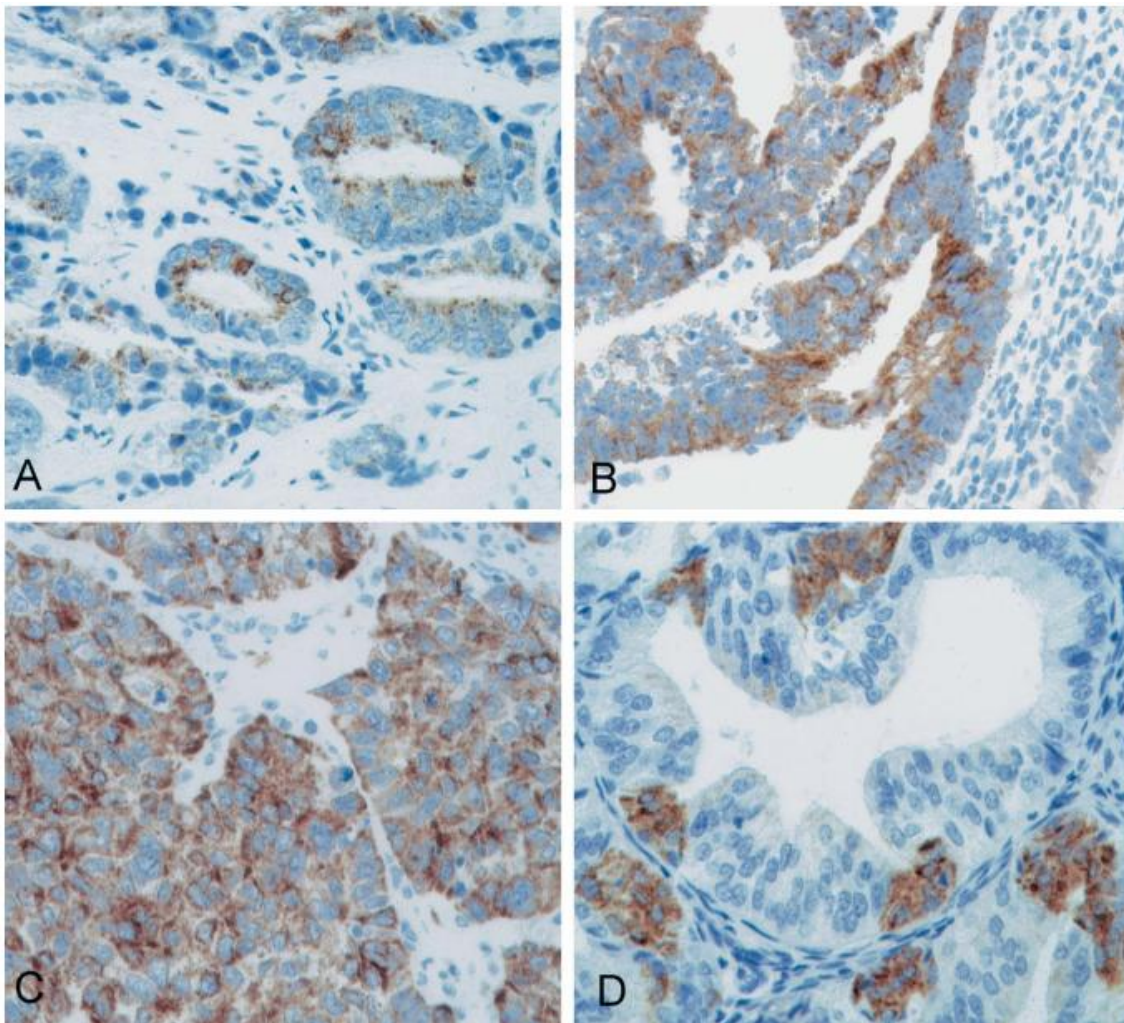
La  $\alpha$ -metilacil-coenzima A racemasa (AMCAR/P504S), pertenece a la familia de la caiB/baiF coA-transferasa. Localizada en el peroxisoma y la mitocondria es una enzima involucrada en la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga. Más específicamente, P504S cataliza la conversión del pristanoil-CoA y C27-ácido biliar-CoAs a su (S)-estereoisómero que entonces puede ser degradado por oxidación del

peroxisoma B [539-540]. Las mutaciones en el gen que codifica la P504S pueden derivar en deficiencia de la AMCAR, una enfermedad caracterizada por el incremento progresivo del ácido pristánico y que condiciona una neuropatía sensorial y motora de aparición en la edad adulta. Esta enfermedad puede acompañarse además de un defecto congénito en la síntesis de ácidos biliares tipo 4 (CBAS4 por sus siglas en inglés), una enfermedad caracterizada por colestasis intrahepática, ausencia de ácido cólico en la bilis, ictericia neonatal y ausencia de conductos biliares. Hasta la fecha ha sido utilizada, principalmente, como marcador de cáncer prostático [541-560]. La expresión de AMCAR, sin embargo, no se limita a la próstata. Investigadores del Proyecto Anatómico Genético del Cáncer del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, usando Señalización de Expresiones Secuenciales (ESTs por sus siglas en inglés) y Análisis Secuenciales de Expresión Genética (SAGE), encontraron niveles variables de expresión de AMCAR en diferentes tejidos sanos (sistema nervioso, colon, riñón, mama, ovario piel, páncreas, elementos celulares sanguíneos y tumores de pared abdominal tipo adenocarcinoma de uraco) [561]. La sobreexpresión de la proteína AMCAR se encontró presente en varios tipos de cáncer tales como colo-recto, próstata, ovario, mama, vejiga, pulmón, carcinoma de células renales, linfoma y melanoma [562-574]. También se encuentra presente en los adenomas de colon y adenocarcinomas pero no en epitelio colónico normal lo que sugiere podría tener un importante papel en el desarrollo de tumores gastrointestinales (Figura 2.25) [575].

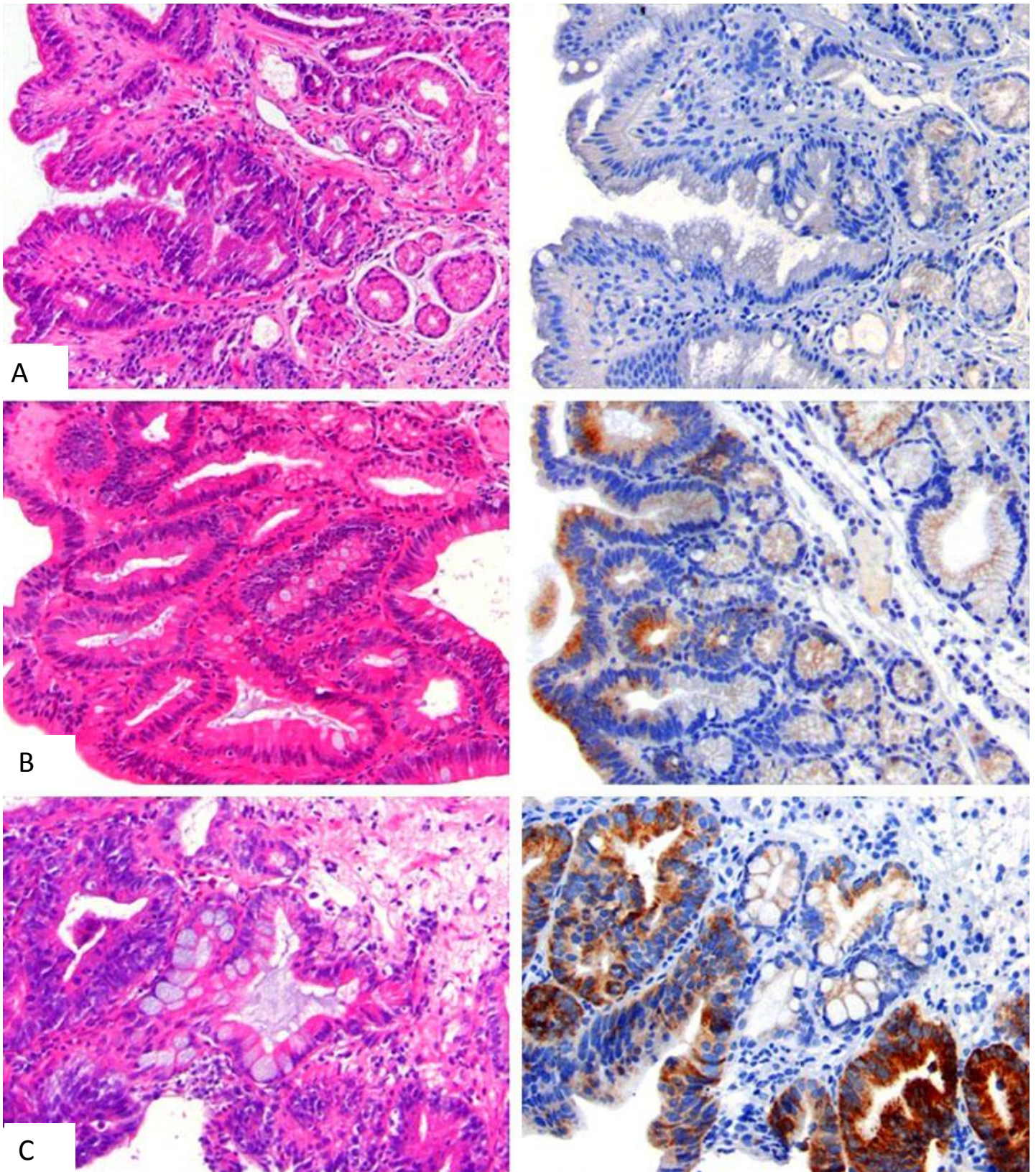
En lo que respecta a su uso en la valoración de la displasia y ACE en pacientes con EB, existen estudios que le confieren una sensibilidad entre el 60-95% para la DAG y del 67-96% para el ACE (Figura 2.26). Estos estudios mostraron una variación muy importante de sus resultados en la valoración de la DBG, con valores que van desde el 11% hasta el 93% de las muestras estudiadas. Estos resultados, tan diferentes entre sí a la hora de valorar la DBG, podrían explicarse por diferentes factores; el primero, la heterogeneidad en cuanto a los criterios de DBG se refiere, en segundo término, conclusiones tomadas en base a tamaños muestrales reducidos pero también es

posible que las diferencias en la interpretación de los resultados de la inmunohistoquímica puedan tener un papel muy importante.

En lo que respecta a la valoración de la ausencia/presencia de displasia, los estudios con los que contamos hasta el momento son bastante heterogéneos; tiende a ser positiva, aunque de forma leve, en tejido sin cambios displásicos, de hecho, algunos autores han encontrado positividad en esta técnica hasta en el 83% de las muestras con EB sin displasia [576-581] Debido a esto, el estudio de la  $\alpha$ -metilacil-coenzima A racemasa (AMCAR/P504S) mediante técnicas de inmunohistoquímica, no puede ser utilizada de forma aislada en el diagnóstico de displasia ni mucho menos, en la valoración de la progresión y malignización del EB.



**Fig 2.25.** Inmunohistoquímica de AMCAR/P504S en diferentes neoplasias. A, Cáncer de próstata. B, Cáncer de colon. C, Cáncer de pulmón. D, Carcinoma de endometrio.



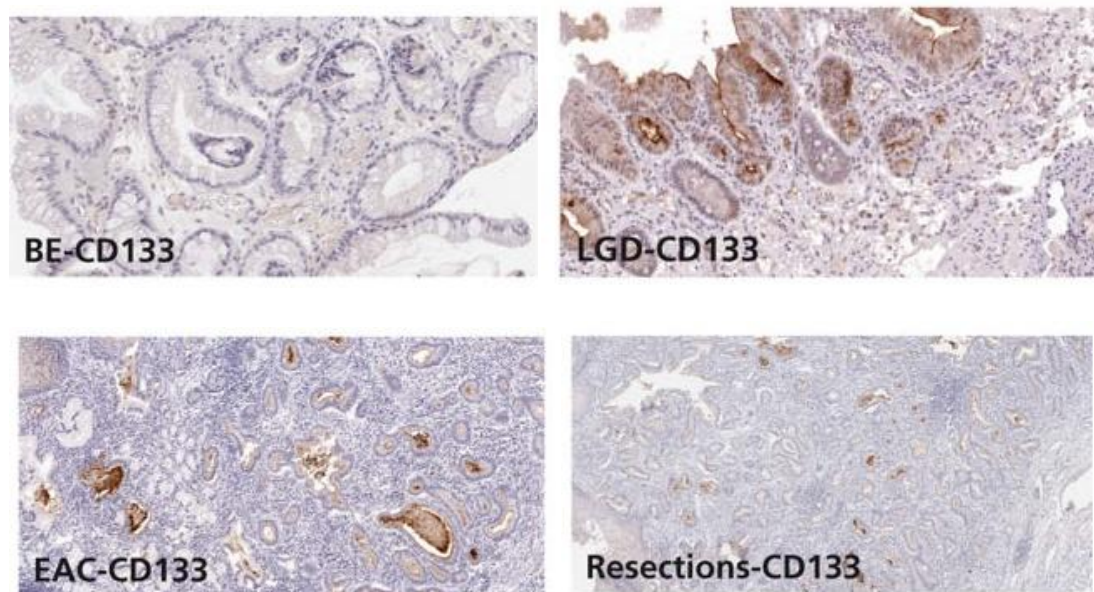
**Fig 2.26.** Tinciones de hematoxilina-eosina y AMCAR/P504S en A) EB sin displasia ni expresión de AMCAR, B) EB con DBG y expresión moderada de AMCAR/P504S y C) EB con DAG y fuerte expresión de AMCAR/P504S.

#### 2.4.4.2.3 CD 133

El CD 133 (también conocido como AC 133) es una glicoproteína transmembrana de cinco dominios que es expresada de forma selectiva en células madre hematopoyéticas y células progenitoras provenientes de la médula ósea fetal y adulta, cordón umbilical y sangre periférica [582-583]. Es un marcador de células madre de una gran variedad de tejidos no hematopoyéticos incluyendo células neuronales y gliales en el cerebro fetal [584] y células de progenitoras neuronales en la piel [585]. Además se ha encontrado presente en células madre de tejido prostático, tejido muscular, riñón, hígado y estroma corneal [586-587].

El CD133 es un marcador expresado por un número limitado de células tumorales llamadas células madre carcinogénicas (CMC) que parecen ser responsables de iniciar el proceso de diferenciación celular tumoral, las metástasis y la recurrencia, además de poseer capacidad auto-replicativa, potencial de diferenciación múltiple, capacidad proliferativa y carcinogénesis. Además de ser consideradas la población celular que da inicio al proceso tumoral, las CMC han demostrado ser las responsables de la resistencia a la quimioterapia y radioterapia de ahí que sean las responsables de la recurrencia tumoral. CD133 ha sido considerado el marcador de CMC para diferentes tipos de neoplasia incluidas de colon, cerebro, páncreas y estómago [588-590]. Hasta la fecha existe poca información sobre el uso de este marcador en el EB. Un estudio ha demostrado su utilidad en el ACE sobre el EB [591], sin embargo, su uso como marcador de progresión en la displasia tiene resultados contradictorios, algunos estudios no lo consideran de utilidad [592] mientras que otros han demostrado que pudiera ser útil en la valoración de esta progresión [593-594]. Un factor que parece influenciar esta diferencia de resultados radica en la cantidad de muestra necesaria para encontrar hallazgos significativos, parece claro, a decir de los autores, que los resultados negativos podrían obedecer a muestras escasas no concluyentes, por lo que,

hasta la fecha, hacen falta mayores estudios que aclaren su utilidad en la valoración de la progresión del EB (Figura 2.27)



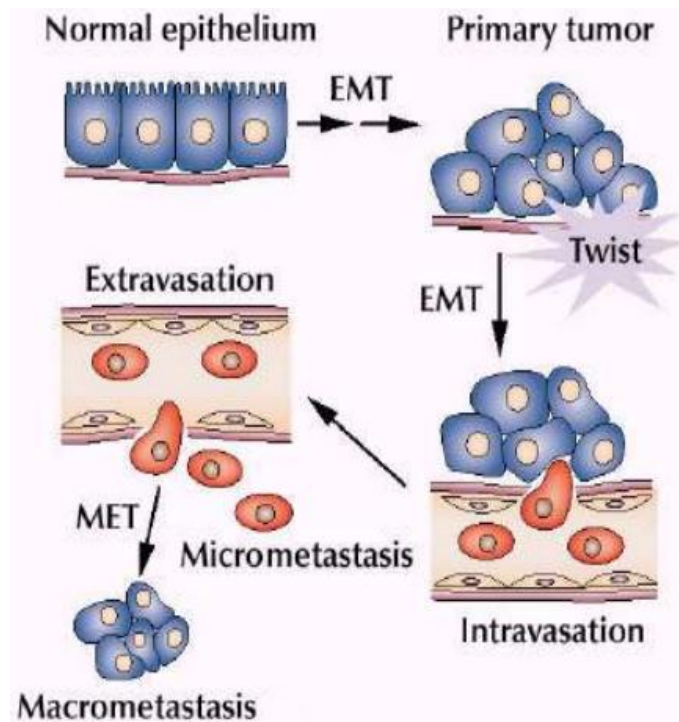
**Fig 2.27.** Ejemplo de tinciones CD133 para EB sin displasia, con DBG y ACE.

#### 2.4.4.2.4 TWIST

Twist1 y Twist2 son los principales reguladores de la embriogénesis. Se ha demostrado que en condiciones patológicas Twist1 favorece la migración metastásica de células cancerosas a través de su capacidad para inducir una transición epitelio-mesenquimal. En este sentido, también se conoce que una gran cantidad de tumores humanos sobre-expresan a Twist1 y/o Twist2, en donde, ambas proteínas anulan la senescencia prematura inducida por los oncogenes a través de la supresión de reguladores clave de las vías dependientes de p53 y Rb (reguladores de la división celular normal). Además, Twist1 y Twist2 cooperan con el gen y las proteínas Ras para transformar a los fibroblastos embrionarios de ratón. Curiosamente, en las células epiteliales, la interacción entre las proteínas Twist y las oncoproteínas mitogénicas



activadas, tales como Ras o ErbB2, da lugar a una completa transición epitelio-mesenquimal. Estos hallazgos sugieren una relación directa entre la falla regulatoria de uno más genes específicos y la adquisición de características invasoras de las células cancerosas [595-596]. (Figura 2.28)

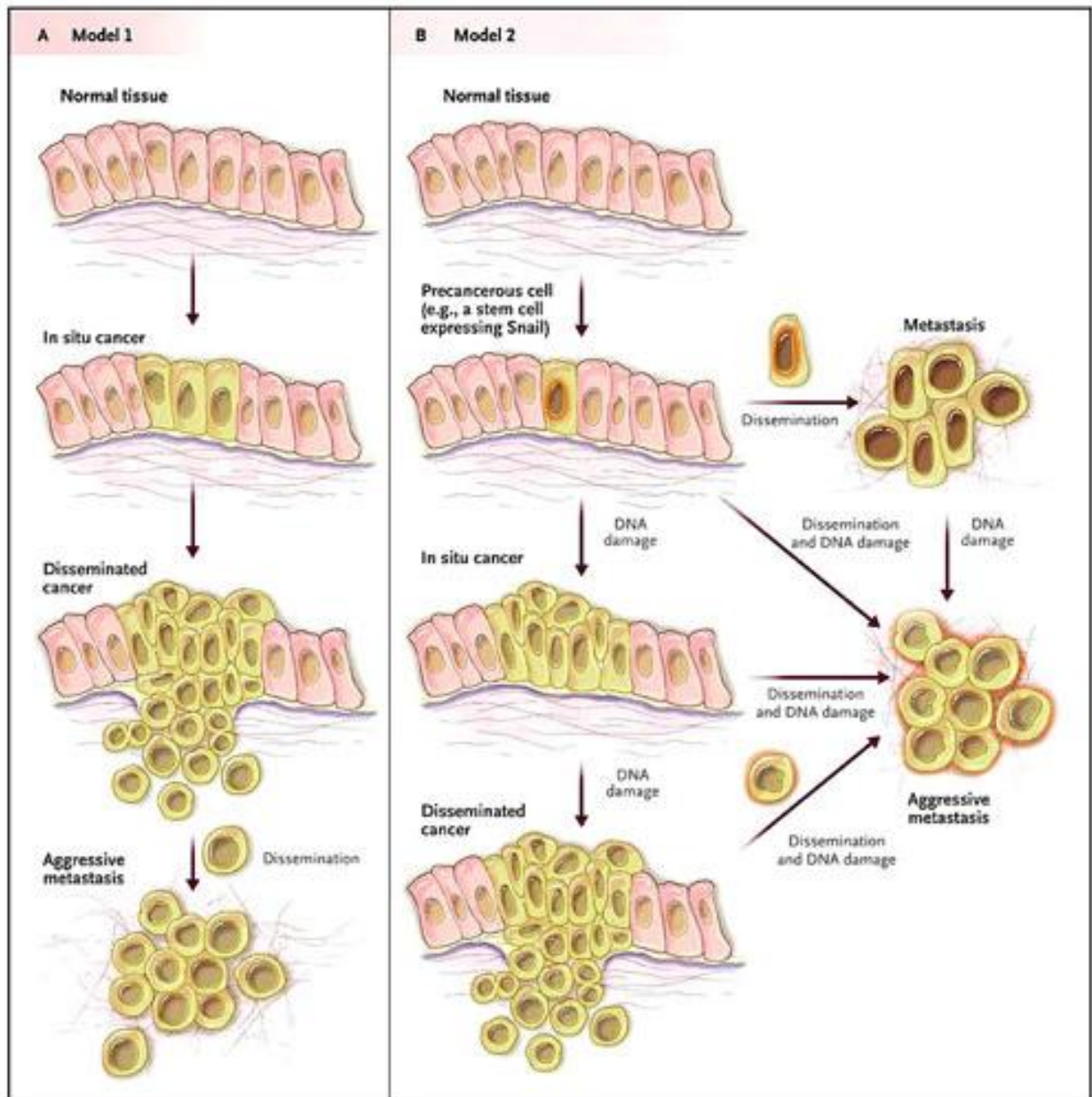


**Fig 2.28.** La expresión de TWIST conduce a la pérdida de contactos célula a célula y a la dispersión celular. Favorece la pérdida de marcadores epiteliales y la ganancia de marcadores mesenquimáticos, lo que deriva en la intravasación de células tumorales para entrar en la circulación y producir las metástasis.

La proteína TWIST posee propiedades oncogénicas, de resistencia a medicamentos, angiogénicas e invasivas [597-598]. Estudios realizados recientemente [599-601], señalan que Twist-1 y las proteínas Snail son relevantes para la transformación neoplásica, lo que sugiere que la capacidad metastásica de algunas células cancerosas puede ser adquirida al comienzo de la conversión maligna. Se cree que la capacidad de las proteínas codificadas por TWIST-1, Snail homólogo 1 (SNAI1) y Snail homólogo 2 (SNAI2) para suprimir la expresión de E-cadherina, una potente molécula de adhesión intercelular, es fundamental en estos procesos, que implican la migración celular. La intensidad en la expresión de E-cadherina está inversamente relacionada con el tamaño y el estadio tumoral.

El modelo clásico de desarrollo del cáncer propone que los factores de transcripción implicados en la promoción de la transición epitelio-mesenquimal están activados en las células cancerígenas que residen en el borde invasivo del cáncer avanzado. Según este modelo, la activación de las proteínas asociadas con la transición epitelio-mesenquimal no ofrece una ventaja de crecimiento en el tumor primario, sino más bien, media el último paso en la progresión tumoral (es decir, la metástasis). En contraste, los resultados de estos estudios indican que la diseminación metastásica se produce continuamente a lo largo del curso de desarrollo del tumor primario, por lo menos en algunos tipos de cáncer (Figura 2.29) [602-604]. En resumen, TWIST promueve la transición epitelio, mesenquimal, disminuye la expresión y acción de la e-cadherina, incrementa la movilidad celular y actúa como factor anti-apoptosis, lo cual conduce, finalmente, a aumentar la supervivencia de las células cancerosas.

TWIST ha sido relacionada con un gran número de procesos tumorales entre los que destacan el cáncer colorrectal y pulmonar [605]. Parece igualmente estar relacionado con la capacidad de progresión de la displasia hacia ACE en el EB aunque la evidencia obtenida hasta el momento es escasa [594] (Figura 2.30)



**Fig 2.29.** En el modelo clásico para el desarrollo del cáncer en humanos, las metástasis corresponden a la etapa final de la cascada tumorigénica (panel A). Sin embargo, estudios recientes apoyan un modelo diferente, que predice que la expresión de proteínas que regulan la transición epitelio-mesenquimal promueve la conversión maligna concomitantemente con la diseminación metastásica (panel B). En este modelo alternativo, la difusión celular del tumor primario se puede producir en cualquier momento durante el desarrollo del cáncer.

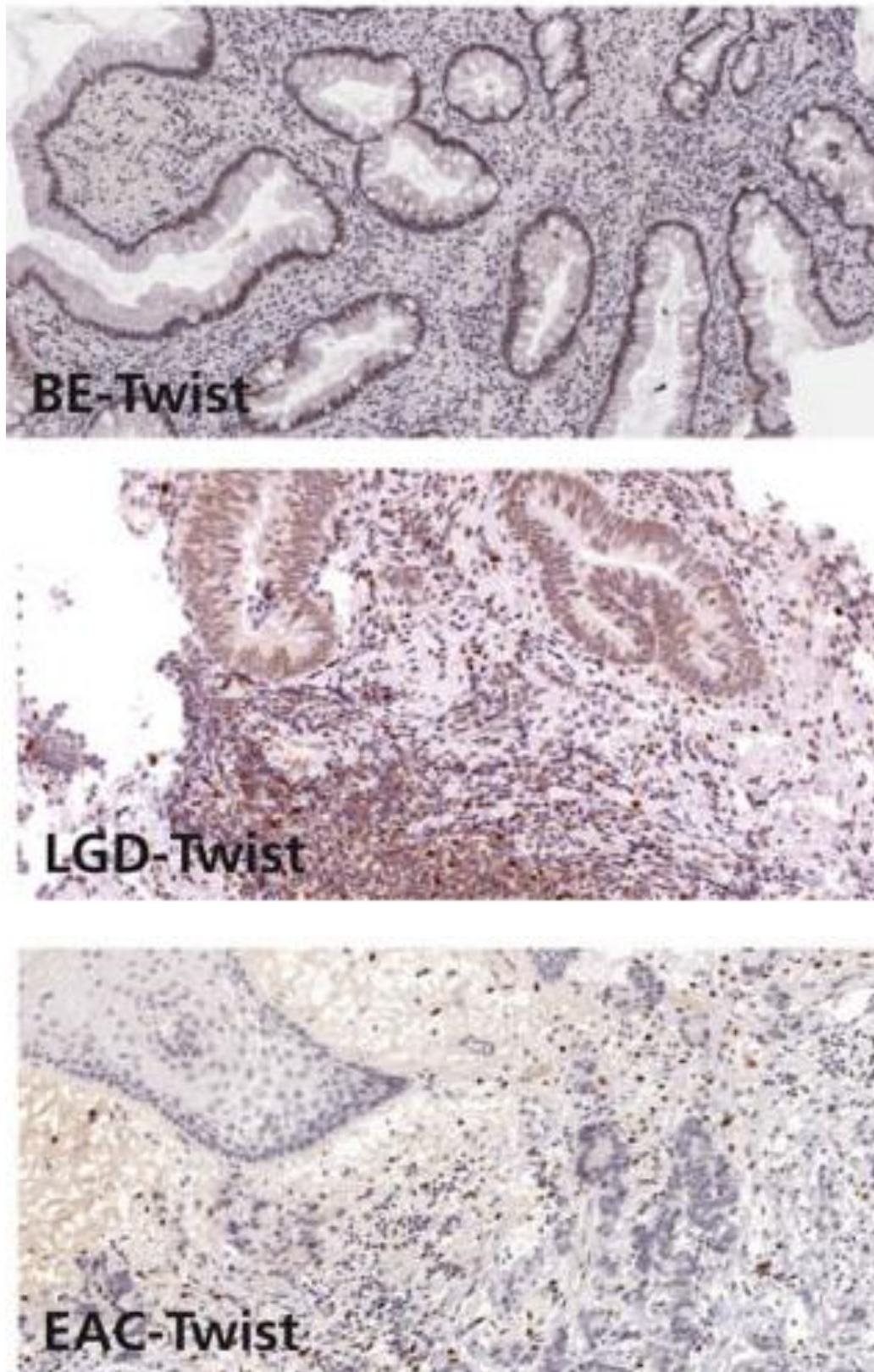


Fig 2.30. Inmunohistoquímica de TWIST en EB sin displasia, DBG y ACE.

## 2.5 Screening y vigilancia endoscópica del Esófago de Barrett

Las recomendaciones acerca de los métodos y periodos de vigilancia en el EB están basadas en el supuesto de que el EB afecta la supervivencia y, por ende, su vigilancia deberá afectar positivamente la mortalidad. Sin embargo, dado que hasta la fecha no existe ningún estudio lo suficientemente grande y potente (en parte por el altísimo costo que supondría a nivel económico y ser, éticamente difícil o imposible de realizar), existe varias corrientes tanto a favor como en contra de los métodos de vigilancia.

### A) En contra de un programa de seguimiento:

- a. No existen estudios aleatorizados que muestren eficacia en la reducción de la mortalidad relacionada al cáncer de esófago en pacientes con EB.
- b. Algunos estudios observacionales y modelos informáticos no muestran un beneficio razonable de los programas de vigilancia [606-607]
- c. La endoscopia entraña un riesgo en su realización, no es un método inocuo.
- d. El diagnóstico de EB puede traer consecuencias en el desarrollo de otros problemas médicos (ansiedad, disminución de la calidad de vida, aumento de los costos de los seguros médicos, etc.) [608-609].
- e. La endoscopia es cara, y más aún cuando se añaden los costos relativos al procesamiento de muestras para su estudio anatomopatológico.
- f. La gran mayoría de pacientes no muestra un beneficio de los métodos de vigilancia.

B) A favor de un programa de seguimiento:

- a. No se esperan estudios aleatorizados que valoren la utilidad real de la vigilancia endoscópica, hacerlos resultaría sumamente caro a la vez que éticamente cuestionable.
- b. Algunos estudios con modelos informáticos muestran un beneficio razonable de la vigilancia endoscópica [610-613].
- c. Los riesgos de la endoscopia programada son mínimos y ningún estudio ha encontrado que los métodos de vigilancia endoscópica disminuyan la supervivencia [614].
- d. El no realizarlos supondría perder la oportunidad de diagnosticar y tratar un cáncer en sus etapas iniciales.
- e. Algunos estudios con modelos informáticos muestra un costo-beneficio razonable al aumentar los años de vida [611-613].
- f. En algunos pacientes, los programas de vigilancia podrían salvarles la vida.

Los diferentes métodos de vigilancia en el EB están destinados, fundamentalmente, a descartar y/o confirmar la presencia de displasia. Esto se basa en considerar al cáncer un proceso que se desarrolla longitudinal en el tiempo a través de una serie de alteraciones genéticas que progresan a medida que los cambios displásicos se hacen más severos. Sin embargo, la progresión real de EB hacia displasia sigue sin estar del todo claro; si tomamos en cuenta los mayores estudios con los que contamos al respecto, el ACE sobre EB se desarrolla aproximadamente en el 4% de los casos con un aumento de la incidencia anual de 0.54 (95% IC 0.32-0.76); si estudiamos la presencia de DAG y ACE, esta incidencia aumenta hasta el 1.73% por año [614].

La displasia en el EB a menudo se presenta de forma parcheada en extensión y severidad [615-616]. Los endoscopistas tradicionalmente han optado por la realización de biopsia aleatorias para identificar la displasia, por lo cual, puede darse el caso de obviar zonas que contengan displasia y, consecuentemente, infravalorar la severidad de la enfermedad. Además, aunque se detecte displasia, zonas de cáncer invasivo pueden pasar desapercibidas. En estudios realizados en pacientes sometidos a esofagectomías por DAG, sin evidencia aparente de masas tumorales, se observó cáncer en hasta el 40% de los casos [617-619]. Cabe también mencionar que un meta-análisis realizado sobre los mismos pacientes, encontró que sólo el 13% presentaban cáncer invasivo, el resto (27%) presentaban una forma más atenuada en forma de carcinoma intramucoso [617]. Otro estudio ha confirmado esta observación con hallazgos de cáncer en un 18% de los pacientes sometidos a esofagectomía por DAG [620]. La realización de numerosas biopsias, de preferencia en aquellas zonas que se observen con alteraciones sospechosas, puede disminuir el riesgo de obviar lesiones displásicas o neoplásicas, sin embargo, no elimina el problema por completo [621-623].

Las biopsia aleatorias han sido, tradicionalmente, la forma más habitual de seguimiento endoscópico del EB, esta modalidad se va reduciendo gradualmente a medida que se dispone de más y mejores aparatos de alta resolución. En estos, se da preferencia para biopsiar aquellas zonas nodulares o con alteraciones en la superficie mucosa [624-625].

Existen varias modalidades de técnicas endoscópicas para la vigilancia del EB. La principal consiste en la endoscopia digestiva alta, de preferencia con aparatos de alta resolución y luz blanca; con ella se debe intentar realizar una inspección cuidadosa y biopsiar aquellas lesiones sospechosas de displasia y/o neoplasia. Otras técnicas se encuentra en desarrollo (cromoendoscopia, ecoendoscopia, microendoscopia confocal, y espectrografía), pero su alto costo y baja disponibilidad hacen que no sean los

métodos de elección para ser utilizados de forma rutinaria en la vigilancia del EB [626-631].

### **Guías clínicas de vigilancia en el EB**

En 2011 la American Gastroenterological Association (AGA) se dio a la tarea de realizar una guía clínica sobre la vigilancia del EB, tomando como referencia los estudios y la evidencia con la que se contaba hasta el momento [632]. También la British Society of Gastroenterology (BDG) se ha manifestado al respecto y viene a complementar las recomendaciones hechas por la AGA [633]. Estas guías clínicas establecen, entre otras cosas:

- a. Se recomienda un screening para EB en aquellos paciente con ERGE que además presenten múltiples factores de riesgo relacionados con adenocarcinoma esofágico (mayores de 50 años, sexo masculino, raza caucásica, ERGE crónica, hernia de hiato, índice de masa corporal elevado o distribución predominantemente abdominal de la grasa corporal).
- b. La AGA no recomienda el screening de EB en la población general con ERGE.
- c. Para pacientes con EB, la terapia antirreflujo para tratar los síntomas de la ERGE así como permitir la curación de la esofagitis está claramente indicada, al igual que en los pacientes con ERGE sintomática sin EB.
- d. El diagnóstico de EB debe ser confirmado, al menos, por otro patólogo, de preferencia que sea experto en patología esofágica.
- e. Se recomienda la vigilancia endoscópica del EB según los siguientes intervalos:
  - EB sin displasia: cada 3-5 años (la BSG lo recomienda cada 2-3 años en casos de EB largos >3 cms).
  - EB con displasia de bajo grado: Cada 6-12 meses.



- EB con displasia de alto grado: Si no se ha realizado tratamiento erradicador, cada 3 meses.
  - La BSG hace una recomendación que no aparece en la AGA. En caso de EB indefinido para displasia, repetir la biopsia a los 6 meses, en caso negativo, el paciente debe ser manejado como EB sin displasia.
- f. La AGA se postula en contra de los biomarcadores para confirmar el diagnóstico histológico de displasia o como método para valorar el riesgo de malignización del EB (la BSG sugiere que la p53 podría utilizarse como un marcador auxiliar a las técnicas convencionales).
- g. La evidencia que apoya el uso de inhibidores de la bomba de protones (IBP) para reducir el riesgo de progresión de displasia en el EB o la aparición de ACE es indirecta y no ha sido apoyada por estudios a largo plazo. El riesgo y potencial beneficio un tratamiento prolongado con IBP debe ser consensuado con cada paciente en el contexto de los medicamentos que consume y su estado de salud, en general.
- h. Si el paciente se encuentra en un programa de vigilancia, siempre se deben obtener biopsias (de preferencia con pinzas de gran capacidad, según recomendaciones de la American Society for Gastrointestinal Endoscopy) [634-635]. Para los pacientes en programa de vigilancia, la AGA recomienda:
- Evaluación endoscópica utilizando endoscopios de luz blanca.
  - Biopsia de los cuatro cuadrantes cada 2 centímetros.
  - Biopsias específicas de cualquier irregularidad en la superficie mucosa, que debe ser remitida al patólogo por separado.
  - Biopsia de los cuatro cuadrantes cada centímetro en paciente con displasia conocida o sospechada.
- i. La AGA se posiciona en contra de la cromoendoscopia o técnicas avanzadas de imagen para la vigilancia rutinaria de pacientes con EB. La BSG sugiere el uso de endoscopios de alta resolución en pacientes en los que se ha detectado

displasia de alto grado a fin de delimitar anormalidades mucosas que pudieran ser candidatas a resección endoscópica.

- j. La AGA no recomienda los intentos para eliminar el RGE como método de prevención del ACE. Se consideran intentos los IBPs a dosis mayores de las habituales, monitorización mediante pHmetría para ajuste de dosis de IBP así como la cirugía antirreflujo.
- k. La AGA no recomienda el uso de aspirina para evitar la aparición de ACE en ausencia de otras indicaciones. Sin embargo, sí recomienda valorar aquellos pacientes que se beneficiarían de su toma, primordialmente tomando en cuenta sus factores de riesgo cardiovascular.
- l. Se recomienda, por encima de la sola vigilancia, la ablación por radiofrecuencia, la terapia fotodinámica así como la resección endoscópica en aquellos pacientes con DAG dentro del EB.
- m. Se recomienda la resección mucosa en aquellos pacientes con displasia asociada a irregularidades mucosas visibles a fin de valorar y descartar la presencia de neoplasia.

## 2.6 Tratamiento del esófago de Barrett

### 2.6.1 Esófago de Barrett sin displasia

El EB sin displasia (EBSO) contempla el mayor número de pacientes en el espectro de la metaplasia intestinal, por tanto, las recomendaciones que se hagan para estos pacientes son muy importantes en la gestión y organización de los servicios de salud. La American Gastroenterological Association (AGA) estableció en el 2011 unas guías clínicas con la mejor evidencia que se tenía hasta ese momento acerca de los beneficios de tratar o no a estos pacientes [632]. En esta guía clínica se recomienda no tratar sistemáticamente a estos pacientes. A este respecto otros autores se han posicionado y realizado estudios que van en contra de esta recomendación [636-637]. El argumento principal de estos autores va en el sentido de considerar que tratar sólo a los pacientes con DAG limita las opciones de tratamiento precoz a la vez que consideran que los riesgos a los que se someten estos pacientes no son mayores de aquellos que ocurren en la resección de pólipos colónicos, estrategia de sobra reconocida como factor protector frente a cáncer colorrectal.

La estrategia mayormente estudiada y discutida es la ablación por radiofrecuencia (RFA), sin embargo, a la fecha, no existen estudios que evalúen su eficacia a largo plazo en pacientes sin displasia. Si bien es verdad que existen estudios que hablan de la desaparición de la displasia en pacientes tratados con RFA, también es verdad que su recurrencia, en las mejores series, ronda el 29% al año además de que no existe garantía de la erradicación del EB al 100%, al quedar glándulas “enterradas” en el tejido quemado que pueden albergar riesgo de transformación neoplásica [638-645]. Estas situaciones ponen en tela de juicio las ventajas del tratamiento sistemático del EB, toda vez que no sabemos, en realidad, cuántos de estos pacientes tratados evolucionarían hacia displasia y finalmente a ACE. Por tanto, y tomando en cuenta la evidencia con la que contamos hasta el momento, parece que la

recomendación del 2011 emitida por la AGA así como la realizada recientemente por la *Benign Barrett's and Cancer Task Force* (BOB CAT) [646], respecto a no tratar a este tipo de pacientes continúan vigentes, al menos hasta que surja nueva evidencia que obligue a una nueva revisión y actualización.

### **2.6.2 Esófago de Barrett con displasia de bajo grado**

Se acepta, en general, que la mayoría de pacientes con DBG no progresarán hacia DAG/ACE. Los mayores estudios realizados hasta el momento, otorgan un riesgo anual del 0.44% para DAG y del 1.83% para DAG y/o ACE [647]. El problema radica en que la DBG entraña una gran variabilidad interobservador, sobre todo en presencia de signos de inflamación. Como ha quedado patente en un estudio alemán, el diagnóstico de DBG resulta muy heterogéneo, a menudo no se observa nuevamente en otras biopsias subsecuentes además de ser frecuentemente sobrediagnosticado por patólogos no expertos [648], en éste estudio, el 73% de los casos inicialmente diagnosticados de EB, tras una revisión por patólogos expertos, fueron desescalados hacia EB sin displasia o Indefinido para displasia.

En casos de DBG localizada, parece claro que un programa de seguimiento, sin tratamiento, ofrece las mejores opciones de riesgo/beneficio. Este seguimiento nos indicará si hay progresión, persistencia o regresión de la misma. En caso de persistencia de la DBG (DBG presente en una segunda endoscopia) [649], existe evidencia de que estos pacientes se encuentran en un riesgo elevado de progresión según demuestra el estudio "SURF" [650]. En estos pacientes los riesgos/beneficios de cada una de las opciones de tratamiento deben ser cuidadosamente evaluados.

Los pacientes con EB y DBG, confirmado por al menos 2 patólogos expertos y características de alto riesgo (multifocalidad del EB, Barrett largo y persistencia de la displasia en 2 muestras repetidas) deben recibir tratamiento, incluyendo terapias ablativas. En estos pacientes, la terapia ablativa (acompañadas de un programa de

seguimiento), disminuyen el riesgo de progresión hacia ACE [651], si bien hay que asumir que, quizá, estamos sobretratando a los pacientes en un intento de disminuir al máximo éste hipotético riesgo de progresión.

Al hilo de las recomendaciones actuales, cada vez contamos con más evidencia surgida de estudio aleatorizados controlados respecto a la durabilidad del tratamiento en casos de DBG. Con el paso del tiempo algunos de los pacientes tratados mantendrán displasia “enterrada” que podría manifestarse, en un segundo término, en forma de cáncer, de ahí que las recomendaciones actuales recomienden tratamientos de grandes áreas (por ejemplo mediante radiofrecuencia) si la opción de tratamiento elegida, inicialmente, ha sido la resección endoscópica.

Cada vez se cuenta con más evidencia en contra de los programas de seguimiento “puro” de la DBG; como se mencionó anteriormente, en el estudio “SURF” [650], los pacientes fueron aleatorizados a la observación (control) vs al tratamiento de la DBG mediante ablación por radiofrecuencia (RFA). En los pacientes tratados con RFA se redujo significativamente el riesgo de progresión hacia DAG/ACE al compararlo con el grupo control. La progresión histológica se redujo del 26.5% (control) al 1.5% (RFA); aún así, de los pacientes tratados con RFA, el 10% presentó recurrencia del EB, de ahí que estos pacientes requieran, además, vigilancia endoscópica permanente. El efecto adverso más frecuentemente descrito fue la estenosis (7.4%). Otros estudios comparten la observación de que la ablación de la DBG, en sujetos seleccionados, disminuye la progresión de la displasia a largo plazo [652-653]. Está claro que la decisión sobre tratar o no a este tipo de pacientes debe ser consensuada con cada paciente, tomando en consideración sus características individuales.

En presencia de lesiones endoscópicamente visibles (nódulos, superficie mucosa irregular, sin signos claros de invasión tumoral), se recomienda la resección de las mismas, ya que muchas de estas lesiones presentan DAG y/o cáncer invasivo en su interior. Los efectos adversos más comunes en este tipo de técnicas de resección son el sangrado, la presencia de escaras (que pueden condicionar estenosis) y perforación

[654]. En caso de visualizar áreas “sospechosas” o con superficie sobre-elevada, dentro del área con EB, la resección endoscópica (RE) no sólo es mandatoria para una mejor valoración histopatológica [632], sino como parte del tratamiento recomendado en caso de objetivarse un cáncer precoz [655]. La RFA destruye el tejido sin obtener material para estudio histopatológico, de ahí que no sea el método de elección en caso de lesiones endoscópicamente visibles, nodulares o sobre-elevadas.

En caso de que la muestra obtenida en un paciente con DBG contenga displasia de alto grado o cáncer, se debe realizar otro tipo de tratamiento complementario (si T1a y alto riesgo quirúrgico, la RFA debería ser considerada).

### **2.6.3 Esófago de Barrett indefinido para displasia**

Las opciones de tratamiento, en caso del EB indefinido para displasia, deben comenzar con el diagnóstico de “indefinido” realizado por, al menos, 2 patólogos expertos.

Si consideramos unos hallazgos “indefinidos” (IND) para displasia, debemos de tener claro que esta clasificación se debe mantener sólo de forma temporal. El seguimiento es obligatorio toda vez de la poca certeza del comportamiento que presentan este tipo de lesiones [656]. Estudios le otorgan a IND un mayor riesgo de progresión hacia formas más agresivas [510, 657], sin embargo, esta situación parece que ocurre, habitualmente, en el primer año tras el diagnóstico [658]. Este riesgo aumentado de progresión ocurre de forma más habitual en pacientes con varias zonas IND (multifocales) [659], sin embargo, de confirmarse el diagnóstico de IND (excluyendo los casos de error por infraestadificación de una DBG) por al menos dos [660] o seis patólogos expertos [661], el riesgo de estos pacientes parece similar a aquellos sin displasia.

Se ha sugerido (aunque aún sin evidencia) que los pacientes con cambios “regenerativos” e infiltrado inflamatorio, reciban dosis altas de inhibidores de la

secreción ácida antes de una nueva biopsia [33, 657]. No está claro el intervalo en el cual deben realizarse estas biopsias de control, sin embargo, si tomamos en cuenta que el mayor riesgo de progresión se obtiene en el primer año tras el diagnóstico de IND, realizar biopsias a los 6 y 12 meses parece razonable. De esta forma, todos los pacientes con IND deben ser biopsiados en el año siguiente a su diagnóstico para detectar neoplasia. En caso de observarse alguna lesión susceptible de resección, ésta debería realizarse para mejor estadificación histopatológica, de lo contrario, no se recomienda realizar resecciones mucosas en caso de EB IND para displasia.

#### **2.6.4 Esófago de Barrett con displasia de alto grado/carcinoma in situ**

Un diagnóstico de DAG conlleva serias implicaciones tanto en el tratamiento como en el pronóstico, de ahí que, a fines prácticos, se le considere análoga de una lesión maligna. Aproximadamente uno de cada dos pacientes con DAG, desarrollará ACE en el plazo de 5 años [662]. Otros estudios van a favor de esta observación, objetivando progresiones del 13% cuando la DAG es localizada mientras que se eleva hasta el 40% en casos de DAG multifocal, con una media de 42 y 23 meses, respectivamente [663-664].

Los resultados de piezas quirúrgicas producto de esofagectomías en pacientes con DAG son muy variables en cuanto al porcentaje de pacientes con carcinoma en el momento de la resección y van desde el 0% hasta el 73% [663, 665-681]. Esto hace que el riesgo, en promedio, ronde cerca del 40%. Este riesgo puede ascender hasta cerca del 80% en caso de que se observen lesiones a simple vista o estemos ante una DAG multilocular [682-683].

Hasta la fecha no existen estudios aleatorizados controlados que comparen la terapia endoscópica frente a la esofagectomía en los casos de DAG y carcinoma intramucoso (CIM). Ambas opciones de tratamiento pueden alcanzar tasas de supervivencia aceptables en casos de displasia de alto grado y carcinoma precoz sin

afectación de estructuras ganglionares [684-689]. El US National Cancer Institute ha publicado recientemente sus resultados sin encontrar diferencias en la supervivencia en pacientes con DAG o carcinoma estadio T1N0 tratados con esofagectomía o terapia endoscópica [663, 690-691]. Otro estudio publicado recientemente apoya la idea de que la terapia de erradicación endoscópica logra similares resultados en cuanto a supervivencia a mediano y largo plazo (36.7% vs 42.8% a 5 años de seguimiento) [692]. Si bien existen otros estudios al respecto [690-691, 693], la gran posibilidad de sesgos hace que, hasta el momento, no existan recomendaciones claras sobre la mejor opción de tratamiento. Una revisión reciente realizada por la Cochrane [694] ha insistido sobre la urgencia de realizar estudios de calidad a este respecto, si bien es consciente de la dificultad de que esto ocurra, debido a la heterogeneidad tanto en el tipo de procedimientos quirúrgicos como endoscópicos disponibles en los diferentes centros así como en las limitaciones inherentes al diagnóstico histopatológico; un punto clave a este respecto consiste en la elección de los pacientes para uno u otro brazo de tratamiento, situación que no deja de ser difícil y con gran posibilidad de sesgo a la hora de interpretar los datos, sobre todo en cuanto a supervivencia se refiere.

Los factores que pueden influir nuestra decisión sobre el tratamiento de elección (esofagectomía vs tratamiento endoscópico) incluyen: el estadio de la enfermedad (DAG o CIM); concurrencia de un EB de segmento corto o largo; lesión unifocal ó multifocal; la presencia de invasión vascular y el grado de diferenciación [663]. La terapia endoscópica ha demostrado erradicar la DAG con bajas tasas de recurrencia a los 3 años [695-697]. En caso de recurrencia de la displasia/carcinoma, estos pacientes se podrían manejar de forma quirúrgica sin incrementos muy importantes de la mortalidad relacionada a la realización de un segundo tratamiento sobre un esófago ya previamente manipulado [698-699]. Se recomienda el tratamiento quirúrgico de primera en caso de sospecha de carcinoma invasivo dentro de la DAG, también parece claro que éste debería ser el abordaje de los pacientes con grados T1b o mayores [700].



Una vez establecido que la terapia endoscópica representa, hoy día, una opción muy válida de tratamiento en caso de DAG [701], acompañada de un estricto protocolo de vigilancia, tratamiento precoz de la recurrencia y cirugía (esofagectomía) precoz; queda por definir el mejor tratamiento endoscópico.

En caso de DAG y/o cáncer precoz (intramucoso), se aceptan como tratamientos válidos a la resección mucosa endoscópica (RME) y la ablación mucosa (AM). No existen, hasta el momento, estudios controlados aleatorizados que evalúen un beneficio claro del tratamiento combinado respecto al aislado en cada una de las modalidades. Sin embargo, se acepta por consenso [701] que la combinación de ambos puede resultar más eficaz (basado en estudios prospectivos con pequeños tamaños muestrales) [702-704].

La RME de lesiones focales (tanto DAG como CIM), deben realizarse intentando siempre alcanzar un R0. Una correcta realización de las mismas puede alcanzar unas tasas de éxito de hasta el 82.5-95% además de ser muy útil a la hora de evaluar la presencia de un carcinoma invasivo [689, 705-706]. Sin embargo, puede asociarse con lesiones metacrónicas además de no lograr, en muchos casos una erradicación sostenida de la displasia, con tasas de recurrencia en torno al 14% a los 12 meses y del 21.5% a los 5 años [663, 703, 707-709]. El empleo de técnicas de ablación que traten la totalidad del epitelio de Barrett ha demostrado disminuir estas tasas de recurrencias, con buenos resultados a largo plazo [710-714].

Las técnicas de ablación incluyen la ablación por radiofrecuencia (RFA), terapia fotodinámica (PTD), coagulación con argón-plasma (APC), electrocoagulación multipolar (MPEC), ablación laser y la crioterapia. Tanto la RFA como la PDT alcanzan una profundidad de tratamiento bastante aceptable a la vez que se pueden emplear para grandes superficies, incluso de forma circunferencial; ambas son muy efectivas en la erradicación del EB [715-722]; sin embargo, en la actualidad la tendencia es hacia una mayor utilización de la RFA dados sus menores efectos secundarios y a ser un método relativamente fácil de realizar, con una curva de aprendizaje relativamente

rápida [723]. Los estudios realizados hasta el momento han objetivado similares tasas de éxito en la erradicación del EB tanto al utilizar PDT como RFA, PDT ó RME, también con similares tasas de recurrencia. [722]. Dado que la MPEC y el APC presentan mayores riesgos de perforación, omisión en el tratamiento de glándulas enterradas y mayor riesgo de estenosis, se reservan para tratar pequeñas lesiones residuales de metaplasia como tratamiento complementario a otras modalidades ablativas [724].

### **3. HIPÓTESIS**

Dadas las características del presente trabajo, se desprenden dos hipótesis. La primera de ellas es que ha habido un aumento de la incidencia y prevalencia tanto en el EB como en el ACE en nuestra Área Sanitaria. La segunda es que, a medida que en el EB se producen cambios histológicos en el sentido displasia de bajo grado, alto grado y finalmente ACE, estos cambios pueden ser observados y valorados mediante el uso de los marcadores inmunohistoquímicos CD 133, p504s y TWIST, por lo que serían de utilidad a la hora de identificar aquellos pacientes con mayor riesgo de desarrollo de displasia y/o adenocarcinoma esofágico a efectos de una vigilancia más estrecha y tratamiento más precoz.

### **3.1 Hipótesis nula (H0)**

No existe un aumento de prevalencia e incidencia en el EB y ACE en el Área Sanitaria Virgen Macarena de Sevilla durante el periodo de estudio. Tampoco existen diferencias significativas respecto a la valoración de la progresión de la displasia en pacientes con EB y ACE mediante el uso de las técnicas de inmunohistoquímica CD 133, p504s y TWIST.

### **3.2 Hipótesis alternativa (H1)**

Existe un aumento de la incidencia y prevalencia del EB y ACE en el Área Sanitaria Virgen Macarena de Sevilla. Existen, además, diferencias significativas respecto a la valoración de la progresión de la displasia en pacientes con EB y ACE mediante el uso de los biomarcadores inmunohistoquímicos CD 133, p504s y TWIST.

## **4. OBJETIVOS**

#### **4.1.Objetivos sobre el comportamiento del Esófago de Barrett y el Adenocarcinoma Esofágico en el Área Sanitaria Virgen Macarena**

El (EB) es una condición adquirida definida por la presencia de metaplasia intestinal en el esófago distal, habitualmente como resultado de la enfermedad por reflujo gastro-esofágico (ERGE) en donde el epitelio normal de tipo escamoso es remplazado por epitelio de tipo columnar. Si bien se conoce que la prevalencia de los síntomas del reflujo gastro-esofágico (RGE) en la población adulta en general, en países de occidente, es de alrededor del 20% en los que tienen un episodio de pirosis diario, y del 7% en los que manifiestan un episodio de pirosis semanal, la prevalencia del EB en la población general no puede ser estimada de la información precedente, debido a que muchos pacientes no tienen una historia previa de reflujo gastro-esofágico [48-50, 725].

La prevalencia del EB en el sur de Europa, según estudios obtenidos desde servicios de endoscopia, se ha incrementado de forma alarmante en los últimos años, pasando de 6.51/100 000 hab a 76.04/100 000 hab (1985-2001 respectivamente) [54]. La tasa más alta la tiene España con una prevalencia cercana al 12%, si tomamos en cuenta una población aproximada de 4,5 millones, tendríamos un total de 540 000 personas afectadas de EB; a esta alta prevalencia le siguen Italia con el 1.5% y Alemania con el 1.3% de la población con ERGE afecta de EB [55]. En Inglaterra esta prevalencia ha aumentado desde el .08-2% en el periodo 1987-1996 [31] hasta el 4% en 2004 [56].

Hasta la fecha no está claro el porqué unas personas con diagnóstico de ERGE desarrollan EB y otras no, aunque parece que ciertos factores (genéticos, edad avanzada, sexo masculino, obesidad, el consumo de tabaco y alcohol) podrían aumentar este riesgo [130, 726-740].

El EB es un marcador aceptado de riesgo en el desarrollo de ACE. Se estima

que su presencia incrementa el riesgo de ACE unas 30 veces, mientras que la ERGE sin EB sólo lo incrementa 3.1 veces [100]. El riesgo de desarrollo de ACE sobre un EB ronda el 0.32% anual, con incidencias que varían desde el 0.1% al 0.59%, según diferentes estudios [101, 105-107, 112, 741].

En este primer estudio, que sirve como base para la presente tesis doctoral, se establecieron los siguientes objetivos:

1. Primario:

- a. Analizar el comportamiento del EB y del ACE en nuestra Área sanitaria durante el periodo de estudio.

2. Secundarios:

- a. Estudiar los factores de riesgo asociados al EB en nuestra población de referencia.
- b. Analizar el comportamiento histológico del EB a lo largo del periodo de seguimiento.
- c. Evaluar la supervivencia y causas de defunción en este tipo de pacientes.

## 4.2 **Objetivos del uso de biomarcadores TWIST, P504S y CD 133 en la valoración de la progresión del Esófago de Barrett**

Debido al riesgo de progresión de la displasia de alto grado hacia ACE, situada entre el 10-30% en 5 años, el tratamiento de ésta ha sido clásicamente mediante el empleo de terapias invasivas, tanto endoscópicas (mucosectomía y ablación endoscópica) como quirúrgicas (esofagectomía), por lo que un correcto diagnóstico resulta muy importante. La confirmación del grado de displasia y el riesgo de progresión de la metaplasia-displasia mediante el uso de marcadores inmunohistoquímicos podría ayudar en la toma de decisiones, no solo en cuanto a las opciones de tratamiento sino en cuanto a detectar aquellos pacientes que se beneficiarían de un seguimiento más estrecho.

Con el presente estudio nos proponemos determinar si el uso de los biomarcadores de crecimiento tumoral p504S, CD133 y TWIST podrían tener utilidad en la valoración de la progresión de la metaplasia-displasia del EB hacia ACE, pudiendo ser una herramienta importante en el seguimiento de estos pacientes.

La segunda parte de la presente tesis doctoral pretende establecer la utilidad de estas novedosas técnicas de inmunohistoquímica mediante los siguientes objetivos:

1. Primario:
  - a. Determinar la utilidad del uso de los marcadores inmunohistoquímicos TWIST, CD133 y P504S en la valoración de la progresión de displasia en pacientes con esófago de Barrett y ACE.
2. Secundarios:
  - a. Estudiar la utilidad de estos marcadores como auxiliares en la valoración histopatológica de la displasia y del adenocarcinoma esofágico.



## 5 MATERIAL Y MÉTODOS

Planteamos la realización de un estudio unicéntrico, observacional y retrospectivo en la Unidad de Gestión Clínica de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla. Nuestro hospital pertenece al Servicio Andaluz de Salud y cubre un área sanitaria de aproximadamente 400 000 personas. Los datos se obtuvieron mediante la revisión retrospectiva de las bases de datos tanto de Endoscopia como de Anatomía patológica del Área Sanitaria Virgen Macarena, Sevilla. Los estudios de inmunohistoquímica fueron realizados, al completo, por el departamento de Anatomía Patológica del HUVM. El estudio fue concebido en dos partes, la primera un estudio sociodemográfico a efectos de calcular la incidencia del EB y del ACE en nuestro medio y la segunda que determinó la utilidad de diversos marcadores IHQ en la valoración de la progresión de la displasia.

### **5.1 Metodología para valorar el comportamiento del Esófago de Barrett y del Adenocarcinoma esofágico en el Área Hospitalaria Virgen Macarena de Sevilla**

En la primera parte del estudio, que valoró el comportamiento del EB y el ACE en el Área Hospitalaria “Virgen Macarena” de Sevilla, la metodología utilizada fue:

**5.1.1** Criterios de inclusión: Se incluyeron todos los pacientes, con diagnóstico de EB y/o ACE entre enero de 1996 y marzo del 2011 confirmados mediante anatomía patológica. Se estudiaron todas las biopsias/piezas resecaadas, de pacientes con ACE independientemente de la técnica quirúrgica empleada para su tratamiento.

**5.1.2** Criterios de exclusión: Se excluyeron aquellos pacientes con diagnóstico endoscópico no confirmado por anatomía patológica, cáncer de esófago de otra estirpe histológica y cáncer gástrico con extensión esofágica.

El diagnóstico de EB, en nuestra área sanitaria, siempre es confirmado mediante hallazgos sugestivos en la endoscopia digestiva más cambios histopatológicos compatibles en las biopsias de los 4 cuadrantes tomadas cada 2 cms, según las guías clínicas internacionales.

Para la clasificación de la displasia se utilizaron los criterios propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [742] que están basados en los propuestos por el Grupo de Estudio para la Morfología de la Displasia en Enfermedad Inflamatoria Intestinal [236]. Todas las muestras fueron valoradas por un patólogo experto para definir el tipo de EB y los cambios sugestivos de displasia. Cuando se sospechó ACE o existieron dudas sobre el grado de displasia, las muestras fueron valoradas por un segundo patólogo como parte del protocolo habitual.

El periodo de seguimiento se calculó desde el diagnóstico de EB hasta la fecha de última endoscopia con biopsia esofágica. El periodo de supervivencia se estableció desde el diagnóstico inicial del EB hasta la fecha de última consulta o defunción.

Para el estudio de las características socio-demográficas se revisó al completo la base de datos del Área de Endoscopia del HUVM. Los pacientes que cumplieron criterios de inclusión fueron divididos, inicialmente, en dos grupos: (1) EB y (2) ACE. Se valoraron aspectos demográficos tales como sexo, edad, tabaquismo (considerando como positivo un consumo según Índice Tabáquico >10), etilismo (considerando como positivo una ingesta de >15 Unidades/semana hombre y >12 Unidades/semana mujeres), tiempo de seguimiento (meses) y supervivencia (meses) de cada uno de los grupos.

Posteriormente los pacientes fueron divididos en cuatro subgrupos según el comportamiento histológico observado y documentado mediante AP a lo largo del

seguimiento:

- Grupo 1: “EB sin displasia” (EBSA)
- Grupo 2: “EB con displasia estable” (EBDE). Aquellos cuyo análisis histopatológico mostraba displasia, sin progresión y/o regresión de la misma a lo largo del seguimiento,
- Grupo 3: “EB con progresión de la displasia” (EBPD). Aquellos cuyas alteraciones histopatológicas iniciales variaron a lo largo del seguimiento en la secuencia metaplasia-displasia de bajo grado (DBG)- displasia de alto grado (DAG)- ACE.
- Grupo 4: “ACE”, sin diagnóstico previo de EB.

Se estudiaron aspectos socio-demográficos (sexo, edad, tabaquismo y etilismo), la longitud del EB en la endoscopia, supervivencia y causas de defunción en cada uno de los grupos.

En lo que respecta a la valoración de la extensión del EB, dado que la mayor parte de los resultados obtenidos se recabaron en fecha previa a la implementación de los criterios de Praga C&M [43-44], la extensión del EB se calculó en centímetros desde la unión esófago-gástrica hasta el extremo más proximal del desplazamiento en la unión escamo-columnar, definiendo un EB corto (< 3cms) y uno largo (>3 cms).

Una vez obtenidos los datos respecto a las características socio-demográficas de cada uno de los subgrupos, se realizó un análisis comparativo multivariante de cada uno de ellos, a efectos de identificar posibles factores de riesgo que influyeran en el comportamiento histopatológico de EB y del ACE.

### **5.1.3 Análisis estadístico**

Todos los datos obtenidos fueron recogidos por los investigadores principales

usando Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp, Redmond, WA).

Se analizaron variables cualitativas y cuantitativas que se resumen en la tabla 5.1. Las variables cuantitativas se expresaron como media y desviación estándar (DE), y las variables cualitativas como número absoluto y porcentaje. El análisis estadístico de las variables cuantitativas para grupos independientes se realizó con el test paramétrico de la t de Student y el test no paramétrico de la U de Mann Whitney. Para cuantitativas no dicotómicas el análisis de la varianza (ANOVA). Para el estudio estadístico de las variables cualitativas empleamos el test de chi-cuadrado de Pearson ( $\chi^2$ ).

Se valoró la *Odds Ratio* (OR) de cada uno de los factores de riesgo en los diferentes grupos y se analizó la supervivencia mediante curvas de Kaplan Meier y el test de log-Rank.

Todos el análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico SPSS (Versión 19, IBM ®, Chicago, IL) considerándose como estadísticamente significativos valores de  $P < 0.05$ .

Variable	Naturaleza	Variable categórica	Tipo	Unidades
<b>Parámetros sociodemográficos</b>				
<i>Edad</i>	Cuantitativa continua		Numérico	Años
<i>Sexo</i>	Categórica	1=Hombre 2=Mujer		
<i>Tabaquismo</i>	Categórica	0=No Fumador 1=Fumador/ex fumador		
<i>Alcohol</i>	Categórica	0=No bebedor 1=Bebedor		
<i>IMC</i>	Cuantitativa Continúa		Numérico	Kg/m <sup>2</sup> sc
<b>Parámetros endoscópicos</b>				
<i>Longitud del Esófago de Barrett</i>	Categórica	1=Corto (<3 cms) 2=Largo (>3 cms)		
<i>Categoría histológica</i>	Categórica	1=Esófago Barrett sin displasia 2=Esófago de Barrett con displasia estable 3=Esófago de Barrett con progresión de la displasia 4=Adenocarcinoma de Esófago		
<b>Parámetros de seguimiento</b>				
<i>Tiempo de seguimiento</i>	Cuantitativa continua		Numérico	Meses
<i>Tiempo de supervivencia</i>	Cuantitativa continua		Numérico	Meses
<i>Muertes</i>	Categórica	0=No 1=Si		

**Tabla 5.1.** Características de las variables analizadas en la parte del estudio sobre el comportamiento del Esófago de Barrett y del Adenocarcinoma Esofágico en el Área Hospitalaria "Virgen Macarena" de Sevilla.

## **5.2 Metodología para valorar el uso de los biomarcadores TWIST, P504S y CD 133 en la valoración de la progresión del Esófago de Barrett**

En la segunda parte del estudio, relativa al uso de los biomarcadores TWIST, P504S y CD 133 en la valoración de la progresión del EB, la metodología utilizada fue:

### **5.2.1 Criterios de inclusión**

Tomando como punto de referencia el estudio previo, se incluyeron pacientes de cada uno de los subgrupos según el comportamiento histopatológico observado. Las diferentes técnicas de IHQ fueron realizadas en aquellos casos cuyas piezas quirúrgicas/biopsias endoscópicas fueran recuperables y tuvieran material suficiente para la realización de las mismas. En aquellos subgrupos con un número alto de pacientes, se seleccionaron de forma aleatoria 20 de ellos para su inclusión en esta parte del estudio.

### **5.2.2 Criterios de exclusión**

Se excluyeron aquellos pacientes en los que no fue posible obtener las biopsias/piezas quirúrgicas, desde el Banco de muestras de Anatomía patológica. También se excluyeron aquellas muestras tejido insuficiente para la realización de las diferentes técnicas de IHQ así como aquellas que presentaron errores en el procesamiento.

Una vez analizado el tamaño de la muestra necesario, los pacientes fueron categorizados según las características histopatológicas observadas. El Grupo I fueron muestras de mucosa normal, obtenidas de pacientes seleccionados de forma aleatoria

por otros motivos diferentes al EB. El Grupo II fueron pacientes con diagnóstico de EB no complicado; se excluyeron de este grupo aquellos pacientes cuyos cambios histológicos progresaron durante el seguimiento. El Grupo III fueron pacientes con diagnóstico de EB con DBG en alguna de las muestras. El Grupo IV fueron pacientes con DAG en algunas de las muestras obtenidas endoscópicamente; dado que, en este caso, el número de pacientes resultó muy pequeño, se seleccionaron 10 casos de pacientes intervenidos quirúrgicamente por ACE; a efectos de disminuir este sesgo, se tomaron muestras de tejidos con DAG alejados de la masa tumoral principal. El Grupo V se constituyó de pacientes sometidos a esofagectomía por ACE.

### **5.2.3 Metodología empleada para las tinciones inmunohistoquímicas**

Una vez seleccionadas las muestras y obtenidos los bloques de parafina desde el Banco de Tejidos de AP, se realizaron cortes de 4 micrómetros en estos bloques, tanto para realizar un nuevo estudio de Hematoxilina-Eosina (H&E) (a fin de confirmar y descartar la presencia de displasia), como para la realización de las diferentes técnicas de IHQ. Estos cortes fueron montados en portaobjetos de alta adherencia electrostática positiva SuperFrost® Plus (Thermo Scientific) cuya atracción electrostática une los cortes de tejido recién congelados y las preparaciones citológicas.

Las tinciones de H&E fueron procesadas mediante el uso del teñidor automático Leica® ST5010 XL según técnicas habituales mientras que para la IHQ se utilizó el sistema automatizado de teñido Ventana Benchmark® ULTRA.

Para el estudio de la racemasa (p504s) se utilizaron los anticuerpos comercialmente disponibles (AMARC/p504s® Monoclonal Rabbit Anti-Human AMACR Clon 13H4 peso molecular 54 kDa de Master Diagnóstica® Madrid). Se realizaron los procedimientos recomendados por el fabricante para la recuperación de los



anticuerpos (preparación del antígeno a temperatura media por 28 minutos y posteriormente a 95°C por 8 minutos y luego 20 minutos a 100°C). Cada una de estas preparaciones viene prediluida para, posteriormente, ser incubadas 1 hora a temperatura ambiente. Una vez comprobada la correcta aplicación del primer anticuerpo, se aplicó el segundo anticuerpo, Ventana OmniMap anti-Rabbit/HRP, dejándolo 20 minutos a temperatura ambiente.

Para el estudio del CD133 se utilizó el anticuerpo monoclonal del tipo IgG1k (CD133 Clon AC133, Mouse mAb, peso molecular 95 kDa, Miltenyi Biotec®, Germany). El procedimiento de tinción y valoración fue el mismo que el realizado para el P504, salvo que la titulación y dilución del primer anticuerpo se realizó manualmente a una escala 1/10.

Para el estudio inmunohistoquímico del TWIST se utilizó un anticuerpo IgG1 de ratón comercialmente disponible de Abcam® (clon Twist2C1a, peso molecular de 28 kDa). La recuperación óptima de los anticuerpos se realizó mediante técnica Standard de CC1® para el acondicionamiento celular durante 48 minutos (8 minutos a 95°C; 40 minutos a 100°C). Se realizó una titulación manual a 1/10 por 30 minutos a temperatura ambiente para posteriormente aplicarse el segundo anticuerpo (Ventana OmniMap anti-Mouse/HRP) dejándolo incubar 20 minutos a temperatura ambiente.

Se realizaron controles, según especificaciones de cada uno de los fabricantes, para garantizar una correcta realización de cada una de las técnicas empleadas. Se utilizó el sistema de detección Ventana ChromoMAP DAB para visualizar las reacciones inmunohistoquímicas. Las muestras que no cumplieron los requisitos de calidad, fueron desechadas y descartadas del estudio.

#### 5.2.4 Valoración Inmunohistoquímica

Se utilizó el sistema de calificación rápida (Q-score) de Allred [743] basado en la intensidad y proporción de la tinción (Tabla 5.2) Cada caso fue valorado y consensuado por dos patólogos con la ayuda de un microscopio multicabezal.

La intensidad se valoró y puntuó como: 0= Negativa, 1= Tinción débil, 2= Tinción moderada y 3= Tinción fuerte. La proporción de células con tinción positiva se valoró y puntuó como 0= Sin tinción, 1=<1% teñidas, 2=1-10% teñidas, 3=11-33% teñidas, 4=34-66% teñidas y 5=67-100% teñidas. El score (Q-score) se obtuvo de la suma de la intensidad y proporción de las tinciones; de esta suma se pudo categorizar cada uno de los casos como: Negativa (Score 0), Tinción débil (score 1-3), Tinción moderada (Score 4-6) y Tinción fuerte (score 7-8).

Se estudiaron las diferencias en la Intensidad, Proporción así como el Q-score de cada uno de los grupos y se compararon con el resto a fin de encontrar diferencias estadísticamente significativas.

Posteriormente y dado que las tinciones débiles pero positivas podrían conducir a errores en su interpretación y, como consecuencia, sesgar las observaciones realizadas, endurecimos los criterios de positividad a las diferentes técnicas IHQ utilizando el Q-score como base; de esta forma, los pacientes fueron divididos en 2 grupos según el comportamiento del tejido a la tinción:

- Grupo 1 (Tinción negativa) con score Negativo (0) y Débil (1-3)
- Grupo 2 (Tinción positiva) con score Moderado (4-6) y fuerte (7-8)

Se analizaron las diferencias entre cada uno de los grupos a efectos de encontrar valores de significancia estadística.

La segunda parte del estudio inmunohistoquímico incluyó un análisis utilizando a cada paciente como su propio control. Se procesaron mediante las diferentes técnicas

IHQ las diferentes zonas (mucosa normal, EBSD y EB con displasia, además de las zonas de ACE) de las piezas quirúrgicas extraídas mediante esofagectomías de aquellos pacientes con diagnóstico de ACE. De esta forma se buscaron diferencias en la expresión IHQ en cada una de las diferentes tinciones/zonas estudiadas.

### 5.2.5 Análisis estadístico

Para el cálculo del tamaño de muestra se utilizó la fórmula basada en la proporción. Se estimó una población de 400 000 personas, el margen de error fue del 20% para enfermedad maligna (10% para enfermedad benigna), con un nivel de confianza del 95% y un nivel de heterogeneidad del 50%.

Las variables estudiadas se resumen en la tabla 5.3 Para las variables categóricas, las diferencias entre los grupos se estudiaron mediante el empleo de la Chi cuadrado ( $\chi^2$ ) si menos del 20% de las casillas contenían valores menores a 5 ( $n < 5$ ); en los casos en que esto no se cumplió ( $>20\%$  de las casillas con valores  $< 5$ ), se utilizó el test exacto de Fisher. Para el análisis de variables cuantitativas se utilizó el test de ANOVA. Finalmente, para la comparación de proporciones entre grupos relacionados (siendo cada paciente su propio control) se utilizó la Q de Cochran.

Todos el análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico SPSS (Versión 19, IBM ®, Chicago, IL) considerándose como estadísticamente significativos valores de  $P < 0.05$ .

Proporción de muestra teñida	Score	Intensidad de la tinción	Score
No hay tinción	0	No hay tinción	0
1%	1	Débil	1
1-10%	2	Moderada	2
11-33%	3	Fuerte	3
34-66%	4		
67-100%	5		

Suma de la proporción e intensidad	
<u>Score</u>	<u>Interpretación</u>
0	Negativa
1-3	Débil
4-6	Moderada
7-8	Fuerte

**Tabla 5.2.** Score de Allred para la interpretación de resultados de las tinciones inmunohistoquímicas.

Variable	Naturaleza	Variable categórica	Tipo	Unidades
<b>Parámetros sociodemográficos</b>				
<i>Edad</i>	Cuantitativa continua		Numérico	Años
<i>Sexo</i>	Categórica	1=Hombre 2=Mujer		
<i>Consumo de tabaco</i>	Categórica	0=No Fumador 1=Fumador/ex fumador		
<i>Consumo de alcohol</i>	Categórica	0=No bebedor 1=Bebedor		
<i>Índice de masa corporal (IMC)</i>	Cuantitativa continua		Numérico	kg/m <sup>2</sup> sc
<b>Inmunohistoquímica</b>				
<i>Intensidad de la tinción</i>	Categórica	0=Negativa 1=Débil 2=Moderada 3=Fuerte		
<i>Proporción de la tinción</i>	Categórica	0=Negativa 1=<1% 2=1-10% 3=11-33% 4=34-66% 5=67-100%		
<i>Q-Score</i>	Categórica	1=Negativa 2=Débil 3=Moderado 4=Fuerte		
<i>Q-Score (modificado)</i>	Categórica	0=Negativa 1=Positiva		

**Tabla 5.3.** Características de las variables analizadas en la parte del estudio sobre el uso de los biomarcadores TWIST, P504S y CD 133 en la valoración de la progresión del Esófago de Barrett. Kg/m<sup>2</sup>sc (kilogramo/metro cuadrado de superficie corporal).

## **6 RESULTADOS**

El análisis de la base de datos de Gestión de Endoscopia reveló 102 230 exploraciones desde enero de 1996 a marzo del 2011 de las cuales 38 929 correspondieron a endoscopias digestivas superiores (38%). El diagnóstico endoscópico de EB se realizó en 850 exploraciones (2.2% respecto al total de endoscopias digestivas superiores) confirmándose, mediante anatomía patológica que 649 de ellas (76,3%) eran verdaderos casos de EB lo cual da una prevalencia total, respecto al número de endoscopias digestivas altas, del 1.7%. Estas exploraciones se correspondieron con 338 pacientes.

La revisión de la base de datos de AP nos permitió obtener 92 pacientes con ACE sin diagnóstico previo de EB en ese mismo intervalo de tiempo. La muestra total de pacientes fue de 430. (Figura 6.1)

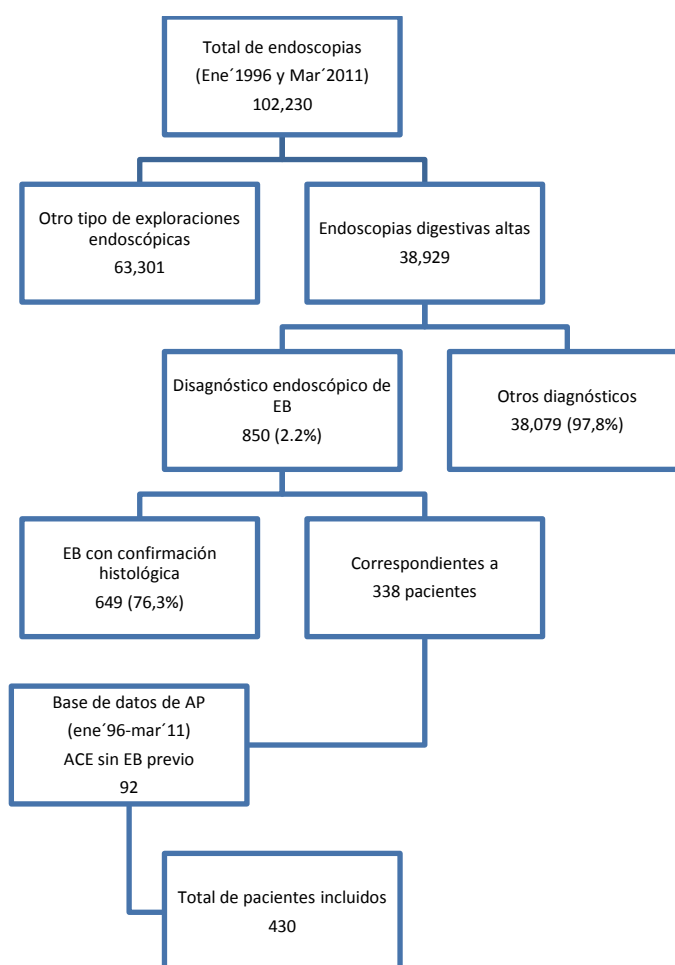


Fig. 6.1. Diagrama de flujo de la selección de los pacientes.

## **6.1 Resultados respecto al comportamiento del Esófago de Barrett y del Adenocarcinoma esofágico en el Área Hospitalaria Virgen Macarena de Sevilla**

### **6.1.1 Tasas de incidencia del EB y ACE**

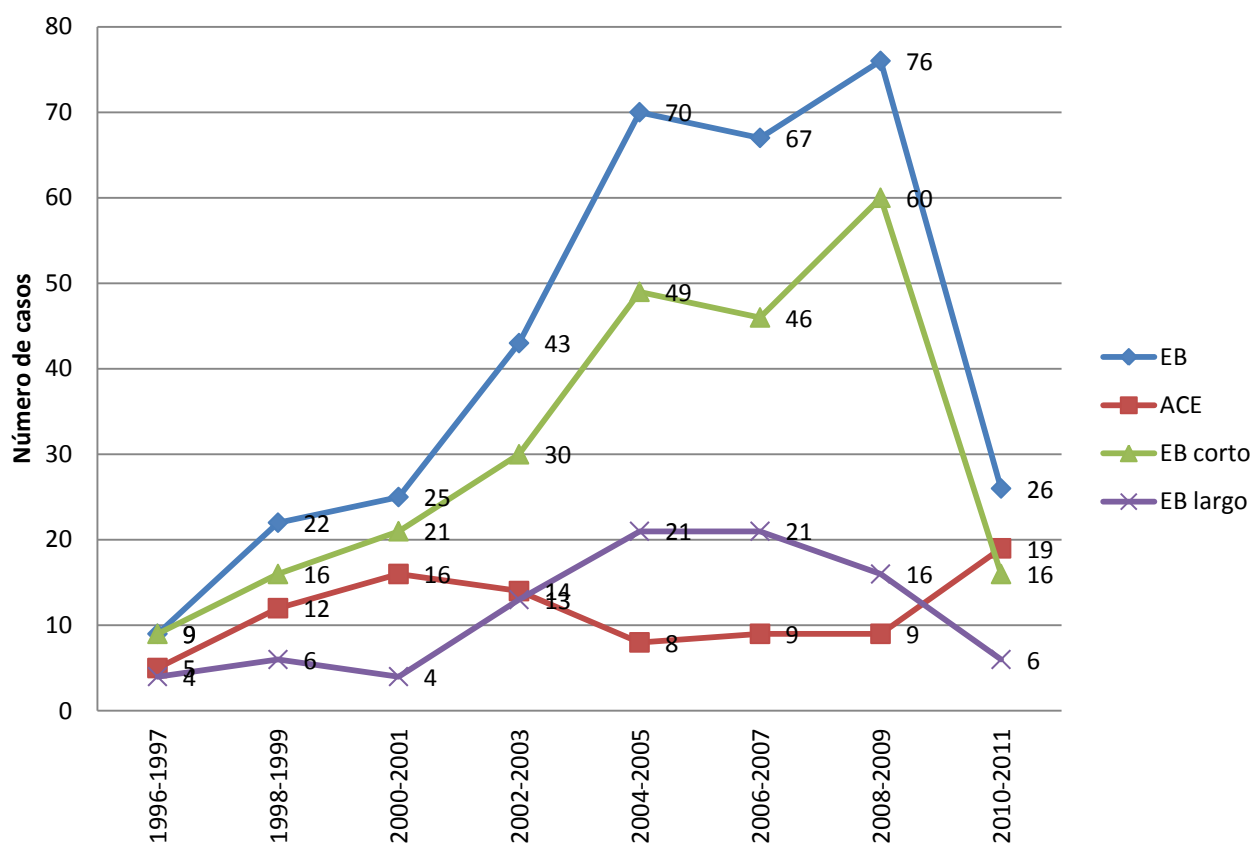
Según los diferentes periodos de tiempo estudiados y tomando en cuenta nuestra población de referencia aproximada (400 000 hab), el mayor número de casos de EB se observa en el intervalo del 2008-2009 y de ACE en 2010-2011. La mayor tasa de incidencia (TI) para EB se obtuvo entre enero del 2008 y diciembre del 2009 (19/100 000 personas/año), y para ACE entre enero del 2010 y diciembre del 2011 (4,75/100 000 personas/año). La mayor parte de los pacientes con EB presentaban un EB corto (250 casos, 74%). (Figuras 6.2 y 6.3).

Se calculó también la TI por grupos de edad (Figura 6.4 A); para ello se tomó en cuenta la Memoria 2012 del Hospital Universitario Virgen Macarena. Se consideró como numerador el número de casos nuevos por año y como denominador una población estimada de 400 000 personas mayores de 15 años. Como se puede observar, el grupo más afectado fue el de la franja de edad de 50-59 años para el EB con una TI de 20/100 000 personas año mientras que en el caso del ACE, la franja con mayor tasa de incidencia fue la comprendida entre los 70-79 años (6,5/100 000 personas-año). Se observa además que, mientras la TI en el caso del EB aumenta de forma progresiva conforme se progresa en edad, y disminuye a partir de la séptima década de la vida, la de ACE aumenta de forma lineal hasta la octava década de la vida, para, a partir de entonces, empezar a disminuir.

En el análisis del comportamiento histológico por grupos de edad (Figura 6.4 B), como era de esperar, el mayor número de casos se corresponde con EB sin displasia siendo la población principalmente afectada aquella en la franja de edad de los 50-59 años (TI 16,5/100 000 personas-año). Por otro lado, cuando el EB presentó displasia, la incidencia también aumenta de forma lineal con un máximo de aparición en la misma franja que el EB sin displasia, esto es, en la década de los 50



a los 59 años, sin embargo, a partir de esta edad se diferencian dos escenarios, mientras que la TI va disminuyendo gradualmente en aquellos pacientes con displasia de comportamiento benigno (con estabilidad de los cambios histológicos o desaparición de la displasia), la TI en la displasia “agresiva” (progresión de los cambios histológicos) va aumentando de forma paralela de forma muy similar a la observada en el caso del ACE, con un pico máximo a los 60-69 años (2/100 000 años persona) aunque también se mantiene alta de los 70-79 años (1,75/100 000 personas-año).



**Fig.6.2.** Número de casos de EB, ACE EB corto y EB largo por intervalo de tiempo. Los números corresponden a los casos nuevos en cada periodo y se representan en números absolutos.

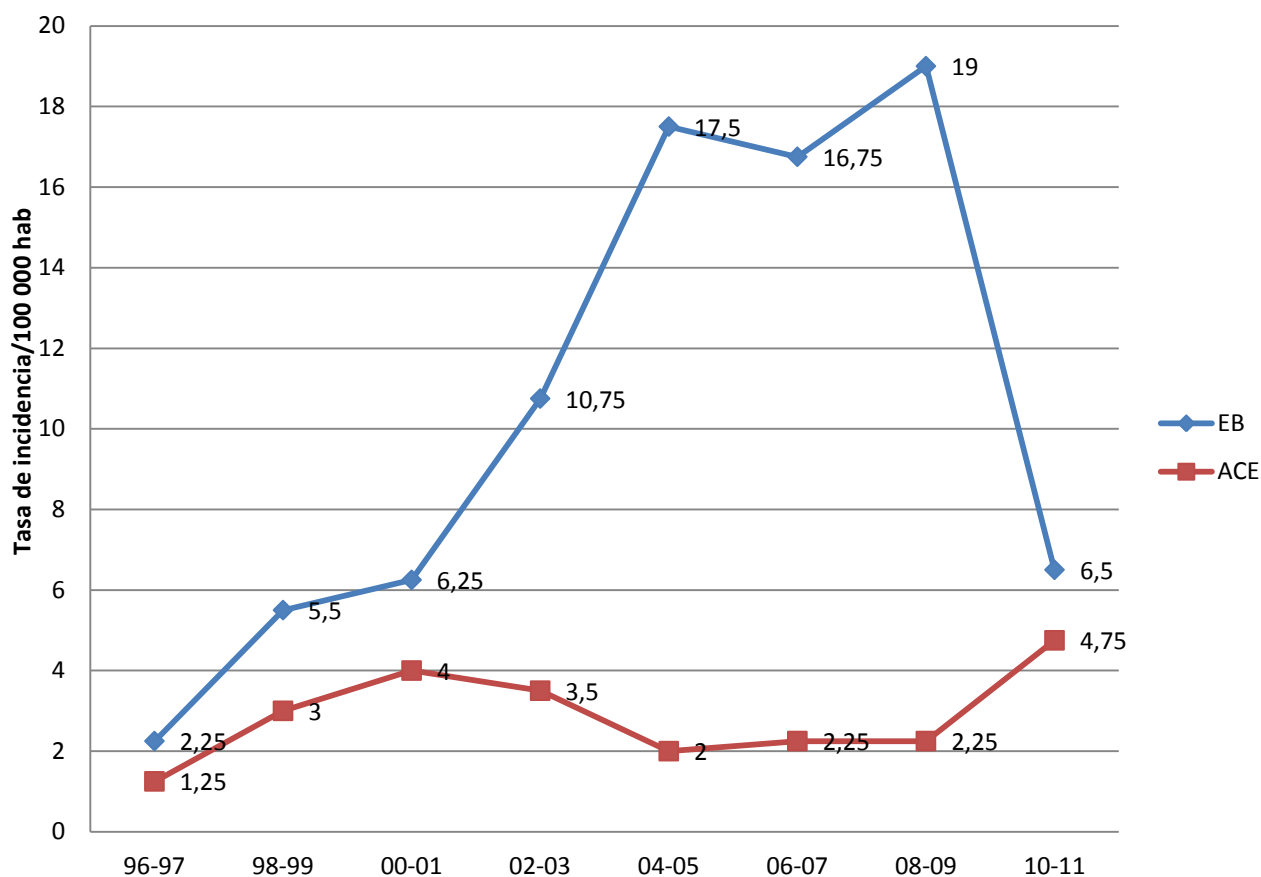


Fig.6.3. Tasa de incidencia de EB y ACE en los diferentes intervalos de tiempo.

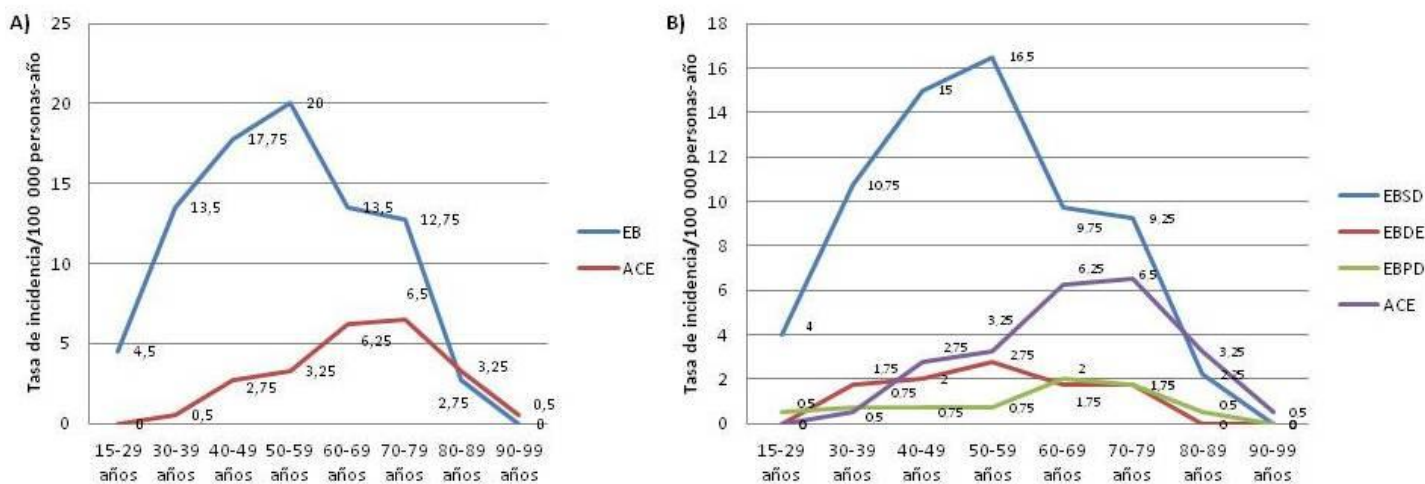


Fig.6.4. A) Tasa de incidencia total de EB y ACE. B) TI según el comportamiento histológico observado durante su seguimiento, Por grupos de edad /100 000 personas año. Cada intervalo representa una franja de edad de 10 años. EBSD (Esófago de Barrett sin displasia), EBDE (Esófago de Barrett con comportamiento histológico estable), EBPD (Esófago de Barrett con comportamiento histológico hacia la progresión de la displasia), ACE (Adenocarcinoma esofágico).

## 6.1.2 Características sociodemográficas por grupos

### 6.1.2.1 Grupo EB vs ACE

Las características sociodemográficas de los grupos EB y ACE se resumen en la Tabla 6.1. Se estudiaron un total de 430 pacientes, la mayor parte de ellos con EB (79%) corto (74%) mientras que 92 pacientes (21%) presentaron ACE sin diagnóstico previo de EB. La mayoría fueron hombres, tanto en el EB como en el ACE (75% y 88% respectivamente), valores estadísticamente significativos respecto a las mujeres ( $p < 0,05$ ). La media de edad fue de 53 años en el EB y de 67 en el ACE ( $p < 0,05$ ).

La mayoría de pacientes, tanto en el EB como en el ACE, presentaba antecedentes de consumo de alcohol (52% y 81% respectivamente) y tabaco (63% y 76%, respectivamente), valores que resultaron estadísticamente significativos en el caso del alcohol [ $p < 0,05$  (IC 95% 1,4-9,5)], mas no en el tabaco [ $p = 0,16$  (IC 95% 0,7-4,1)].

El seguimiento en el grupo de EB tuvo una media de 30 meses (0-175) y en el ACE de 23,9 meses (1-140), siendo este valor estadísticamente significativo ( $p = 0,01$ ). La supervivencia del EB fue estadísticamente superior respecto al ACE (92 vs 24 meses,  $p < 0,05$ ) La mortalidad global para el EB fue del 6,2% mientras que para el ACE del 89% ( $p < 0,05$ ) (Tabla 6.1, Figura 6.5).

	Total	Esófago de Barrett	Adenocarcinoma esofágico	p
Número de pacientes (N)	430	338	92	
<b>Parámetros sociodemográficos</b>				
Sexo				
<i>Hombre (%)</i>	335 (77.9)	254 (75.1)	81 (88)	0.008*
<i>Mujer (%)</i>	95 (22.09)	84 (24.8)	11 (12)	
Edad	56 (19-92)	53.1 (19-88)	66.6 (31-92)	0.005*
Consumo de tabaco				
<i>Sí (%)</i>	169 (39)	114 (34)	25 (27)	0.16
<i>No (%)</i>	91 (21)	83 (25)	8 (9)	
<i>Desconocido (%)</i>	170 (40)	141 (42)	59 (64)	
Consumo de alcohol				
<i>Sí (%)</i>	144 (33)	119 (35)	25 (27)	0.001*
<i>No (%)</i>	114 (27)	108 (32)	6 (7)	
<i>Desconocido (%)</i>	172 (40)	111 (33)	61 (66)	
<b>Parámetros endoscópicos</b>				
Tipo de Barrett				
<i>Corto (&lt;3cms) (%)</i>		247 (73)	---	
<i>Largo (&gt;3 cms) (%)</i>		91 (27)	---	
<b>Parámetros de seguimiento</b>				
Vigilancia (meses) (min-máx)		30.48 (0-175)	23.9 (1-140)	0.01*
Supervivencia (meses) (SD) (min-max)	57.8	91.83 (±41.9) (0-210)	23.9 (±27.3) (1-140)	<0.001 *
Muertes (%)	103	21 (6.2)	82 (89.1)	<0.001 *

**Tabla 6.1.** Los resultados se muestran en números absolutos y porcentaje. SD (desviación standard). \* Estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ).

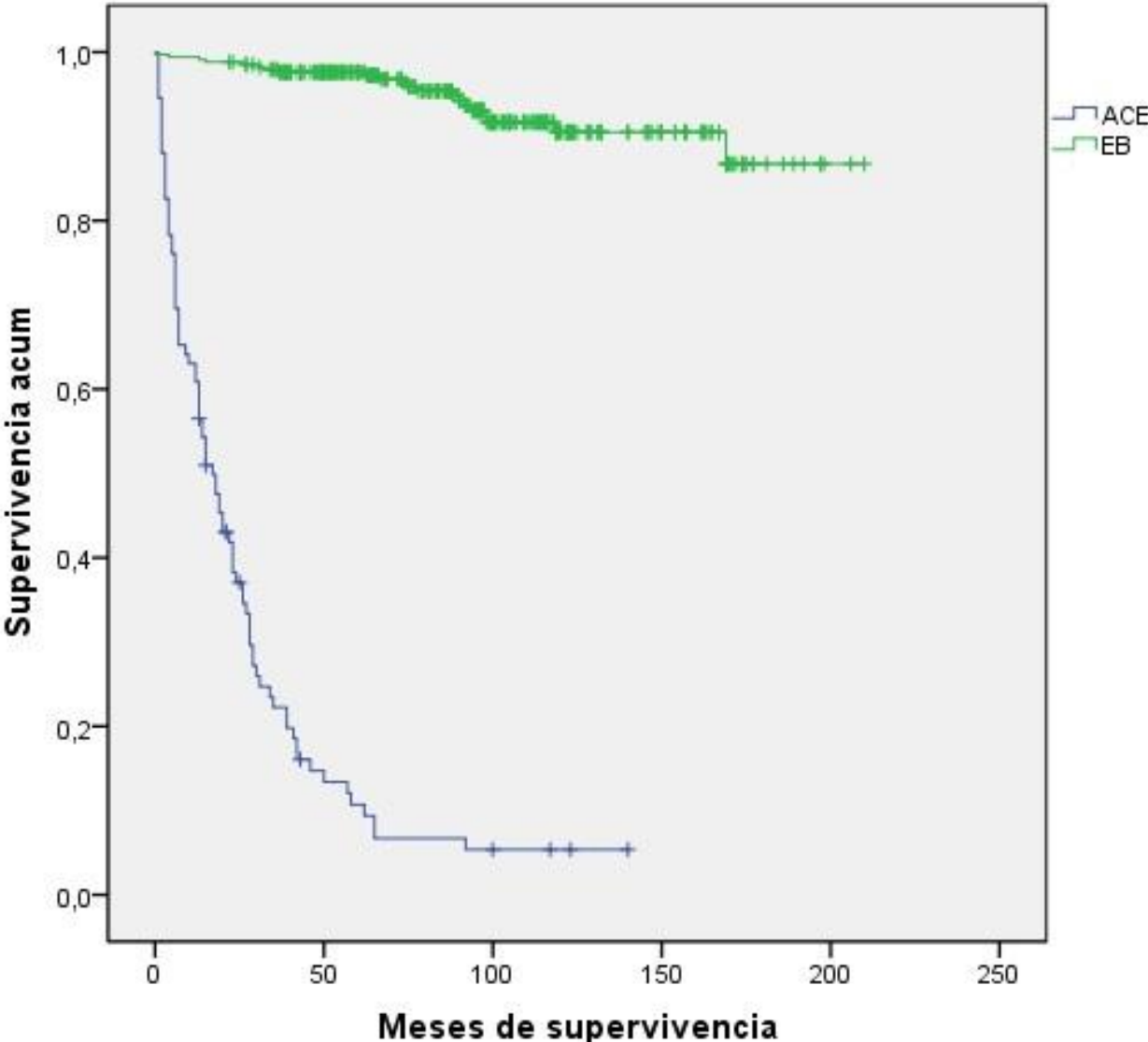


Fig. 6.5. Curva de Kaplan-Meier de mortalidad según grupo de estudio.

### **6.1.2.2 Análisis por Subgrupos.**

Las características demográficas de cada uno de los subgrupos se resumen en la Tabla 6.2. La mayor parte de pacientes presentaban EBSD 270 (62,7%) y eran predominantemente del sexo masculino en todos los grupos. La población más joven correspondía a EBSD ( $\bar{x}$  =53 años) mientras que el grupo ACE presentaba la mayor edad ( $\bar{x}$  =66.6 años). Se pudo obtener el IMC (índice de masa corporal) en 23 pacientes con EB (el 7% de la población estudiada) y de 11 pacientes con ACE (12%). Se observó que los pacientes con EB y displasia presentaban un IMC mayor (28,09 kg/m<sup>2</sup>sc) respecto al EBSD (25,11 kg/m<sup>2</sup>sc) y al ACE (23,6 kg/m<sup>2</sup>sc).

En nuestro estudio, hubo mayor proporción de pacientes con EB corto en los grupos EB sin displasia y EBDE respecto al grupo EBPG con valores estadísticamente significativos [ $p < 0.01$  y  $p = 0.014$  (IC 95% 2.2-8.6) y 0.27 IC (0.09-0.7) respectivamente]. También observamos una mayor proporción de consumo de alcohol en el grupo ACE respecto a los grupos EBSD y EBDE ( $p = 0.003$  y  $p = 0.044$  respectivamente).

La mayor supervivencia se observó en el grupo EBPD (115.3 meses), diferencia estadísticamente significativa respecto al resto de los grupos ( $p < 0.01$ ). (Tabla 6.3 y Figura 6.6). La mortalidad fue estadísticamente superior en el ACE respecto al resto de grupos ( $p < 0,001$ ).

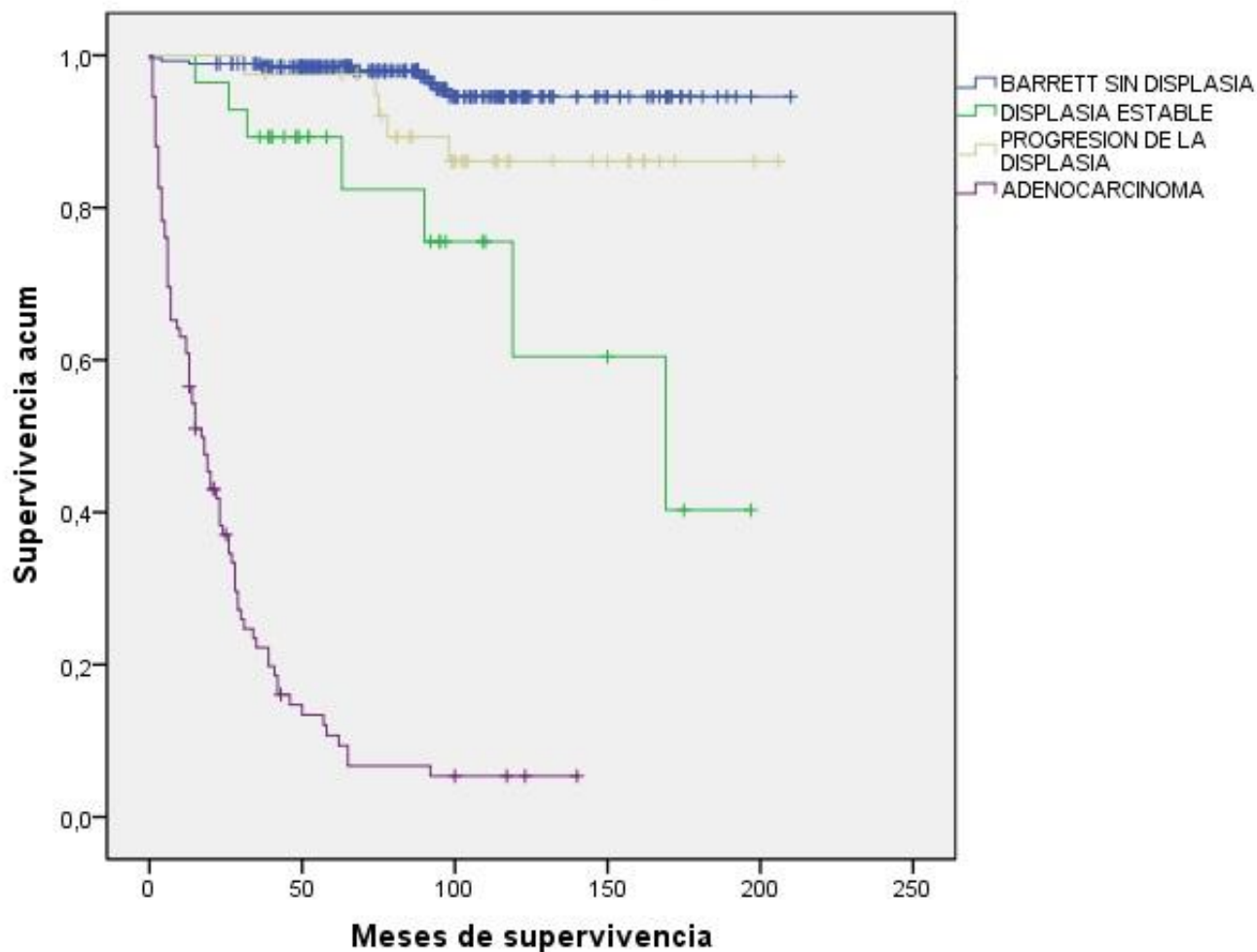
	EB sin displasia	EB con displasia estable	EB con progresión de la displasia	ACE
Nº pacientes (%)	270 (63)	28 (7)	40 (9)	92 (21)
<b>Parámetros sociodemográficos</b>				
Edad media	52.5	59	53.3	66.6
Sexo				
<i>Hombre (%)</i>	199 (74)	22 (79)	33 (83)	81 (88)
<i>Mujer</i>	71	6	7	11
IMC (N)(Media)	(11)(25,11)	(10)(28,09)	(2)(27,91)	(11)(23,6)
Consumo de tabaco				
<i>Sí (%)</i>	134 (50)	7 (25)	3 (7.5)	22 (24)
<i>No (%)</i>	77 (29)	5 (18)	1 (2.5)	8 (9)
<i>Desconocido (%)</i>	59 (22)	16 (57)	36 (90)	62 (67)
Consumo de alcohol				
<i>Sí (%)</i>	110 (41)	6 (21)	3 (7.5)	25 (27)
<i>No (%)</i>	101 (37)	6 (21)	1 (2.5)	6 (6.5)
<i>Desconocido (%)</i>	59 (22)	16 (58)	36 (90)	61 (66)
<b>Parámetros endoscópicos</b>				
Tipo de Barrett				
<i>Corto (%)</i>	211 (78)	21 (75)	18 (45)	No aplica
<i>Largo</i>	59	17	22	
<b>Parámetros de seguimiento</b>				
Vigilancia (meses)(min-max)	27,5(0-175)	18(0-152)	58,9(5-174)	23,9 (1-140)
Supervivencia (meses)(min-máx.)	89,8(0-210)	77,8(15-197)	115,3(31-206)	23,9(1-140)
Muertes (%)	9 (3.3)	7 (25)	5 (12.5)	82 (89)

**Tabla 6.2.** Características sociodemográficas por subgrupos. Los resultados se muestran en números totales y porcentaje. SD (desviación standard). IMC (Índice de masa corporal, expresado en kg/m<sup>2</sup>sc)

	EB sin displasia			EB con displasia estable		EB con progresión de la displasia
	<u>EBDE</u>	<u>EBPD</u>	<u>ACE</u>	<u>EBPD</u>	<u>ACE</u>	<u>ACE</u>
<b>Parámetros sociodemográficos</b>						
<i>Sexo</i>	0.575	0.232	0.005*	0.685	0.208	0.394
<i>Edad</i>	0.115	0.986	<0.001*	0.4	0.075	<0.001*
<i>Consumo de tabaco</i>	0.718	0.636	0.170	0.551	0.254	0.973
<i>Consumo de alcohol</i>	0.886	0.364	0.003*	0.383	0.044*	0.791
<b>Parámetros endoscópicos</b>						
<i>Tipo de EB</i>	0.703	0.01*	N/A	0.014*	N/A	N/A
<b>Parámetros de seguimiento</b>						
<i>Vigilancia</i>	0.456	0.01*	N/A	0.01*	N/A	N/A
<i>Supervivencia</i>	0.399	0.01*	<0.001*	0.001*	<0.001*	<0.001*
<i>Muertes</i>	0.01*	0.09	<0.001*	0.183	<0.001*	<0.001*

**Tabla 6.3.** Comparación de los valores de “p” en los diferentes parámetros estudiados por subgrupos según comportamiento histológico observado. EBSD Esófago de Barrett sin displasia; (EBDE) Esófago de Barrett con displasia estable; (EBPD) Esófago de Barrett con progresión de la displasia; (ACE) Adenocarcinoma esofágico. \*Estadísticamente significativo (p<0.05).



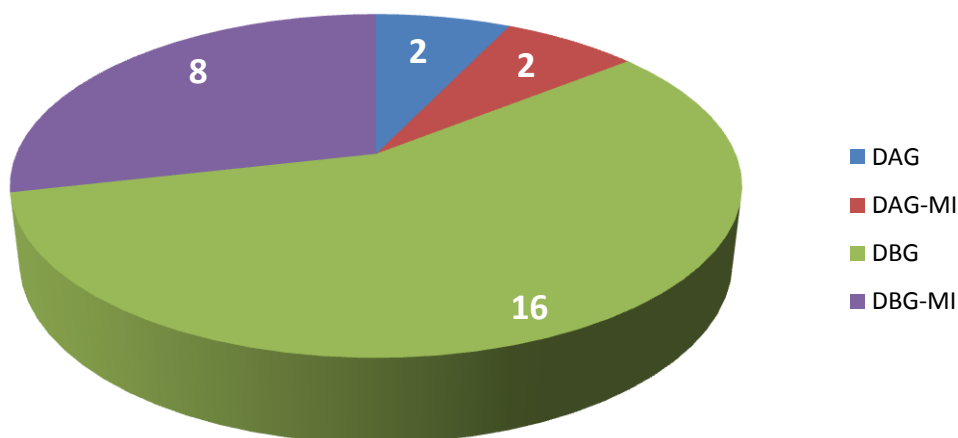


**Fig. 6.6.** Curva de Kaplan-Meier de mortalidad por subgrupo según comportamiento histológico observado durante el seguimiento.

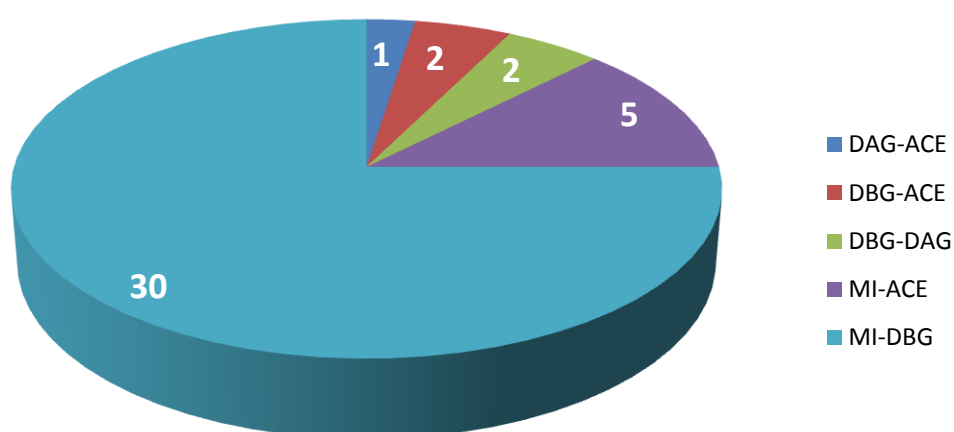
El comportamiento histológico de los pacientes con displasia estable y con evolución de la displasia, durante el tiempo de seguimiento, se ilustra en la figura 6.7. De los 338 pacientes con EB (270 sin displasia, 28 con displasia estable y 40 con progresión de cambios histológicos), 8 (2.4%) evolucionaron a ACE durante el seguimiento, de estos, 2 (25%) fallecieron por complicaciones relacionadas a la enfermedad neoplásica; el primero de ellos debutó con DAG y falleció 31 meses más tarde y el segundo debutó con EB sin displasia, con cambios histológicos evolutivos hacia ACE, siendo éxitus a los 60 meses del diagnóstico inicial del EB.

Las principales causas de muerte observadas en el EB fueron las relacionadas con enfermedad cardiovascular y el cáncer no esofágico (Tabla 6.5).

### A) EB con displasia estable



### B) EB con progresión de la displasia



**Fig. 6.7.** Comportamiento histológico de los grupos A) Esófago de Barrett con displasia estable y B) Esófago de Barrett con progresión de la displasia. MI (metaplasia intestinal), DBG (Displasia de bajo grado), DAG (Displasia de alto grado), ACE (Adenocarcinoma de esófago). Resultados mostrados en números absolutos.

	Total	EB sin displasia	EB con displasia estable	EB con progresión de la displasia	Adenocarcinoma esofágico
<b>Causa de la muerte</b>					
<b>Enfermedad cardiovascular (%)</b>	23 (22)	0	7 (100)	1 (20)	15 (18)
<b>Enfermedad neoplásica (%)</b>	7 (7)	6 (67)	0	1	0
<i>Adenocarcinoma de vejiga</i>		2 (22)			
<i>Adenocarcinoma de páncreas</i>		1 (11)			
<i>Hepatocarcinoma</i>		1 (11)		1 (20)	
<i>Cáncer de próstata</i>		1 (11)			
<i>Enfermedad de Hodgkin</i>		1 (11)			
<b>Enfermedad hepática (cirrosis alcohólica descompensada) (%)</b>	4 (4)	3 (33)	0	1 (20)	0
<b>Complicaciones relacionadas al ACE (sepsis, fallo multiorgánico, etc) (%)</b>	69 (67)	0	0	2	67 (82)
<b>Total</b>	103	9	7	5	82

**Tabla 6.5.** Causas de muerte en los diferentes subgrupos.

## **6.2 Resultados respecto al uso de los biomarcadores TWIST, P504S y CD**

### **133 en la valoración de la progresión del Esófago de Barrett**

El cálculo de tamaño de muestra mínimo se estableció al comparar la proporción de pacientes en dos grupos (patología benigna vs maligna). En el caso de patología maligna quedó establecido en 25 pacientes (para un margen de error del 20%, heterogeneidad del 50% y un nivel de confianza del 95%), sin embargo, a efectos de aprovechar al máximo los insumos con los que contábamos, se decidió incluir 34 casos (con lo que el margen de error se redujo al  $\pm 17\%$ , manteniendo la heterogeneidad del 50% y el nivel de confianza en el 95%). En el caso de la patología benigna, el número mínimo de casos fue de 88; sin embargo, igualmente y a efectos de aprovechar al máximo las tinciones, se incluyeron 253 casos (con lo que el margen de error se redujo al  $\pm 6\%$ , con una heterogeneidad del 50% y un nivel de confianza del 95%).

Las características generales de los pacientes incluidos se describen en la tabla 6.6. Como se puede observa, se incluyeron 71 pacientes en el grupo control ("Mucosa normal"), 110 en el grupo Esófago de Barrett sin displasia ("EBSD"), 72 en el grupo "EB con displasia" y 34 en el grupo "ACE". No se observan diferencias estadísticamente significativas en las variables comparadas (Sexo, edad, Consumo de alcohol o tabaco ni en el IMC).

	Mucosa normal	EB sin displasia	EB con displasia	ACE	p
<b>Nº muestras</b>	71	110	72	34	
<b>Parámetros sociodemográficos</b>					
Sexo					
<i>Hombre (%)</i>	50 (70,4)	79 (71,8)	57 (79,2)	27 (79,4)	0,519
<i>Mujer</i>	21	31	15	7	
Edad (media) (min-máx)	62,85 (37-92)	61,48 (30-91)	62,04 (28-86)	64,12 (32-87)	0,702
Consumo de tabaco					
<i>Si (%)</i>	29 (40,8)	46 (41,8)	23 (31,9)	11 (32,4)	0,291
<i>No</i>	16	26	15	4	
<i>Desconocido</i>	26	38	34	19	
Consumo de alcohol					
<i>Si (%)</i>	18 (25,4)	31 (28,2)	15 (20,8)	11 (32,4)	0,081
<i>No</i>	27	41	23	4	
<i>Desconocido</i>	26	38	34	19	
IMC					
<i>Válidos (%)</i>	14	34 (31)	29	9	0,523
<i>Media (min-máx)</i>	25,8 (15-35)	27,83 (15-35)	27,57 (15-35)	23,79 (15-30)	

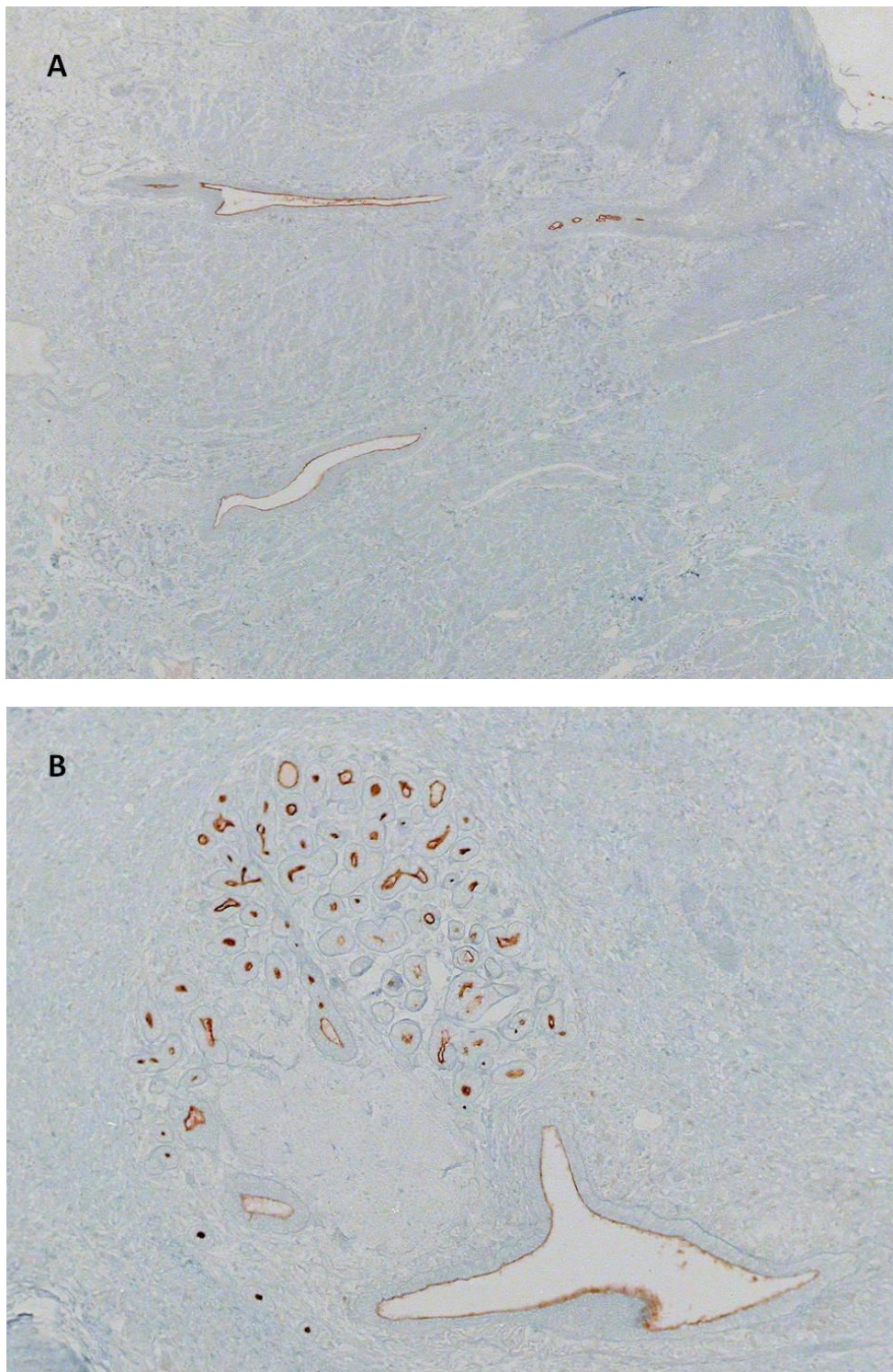
**Tabla 6.6** Características sociodemográficas por grupos según el tipo histológico observado. Los resultados se muestran en números absolutos y porcentaje. \*Estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ )

## 6.2.1 Características de las tinciones.

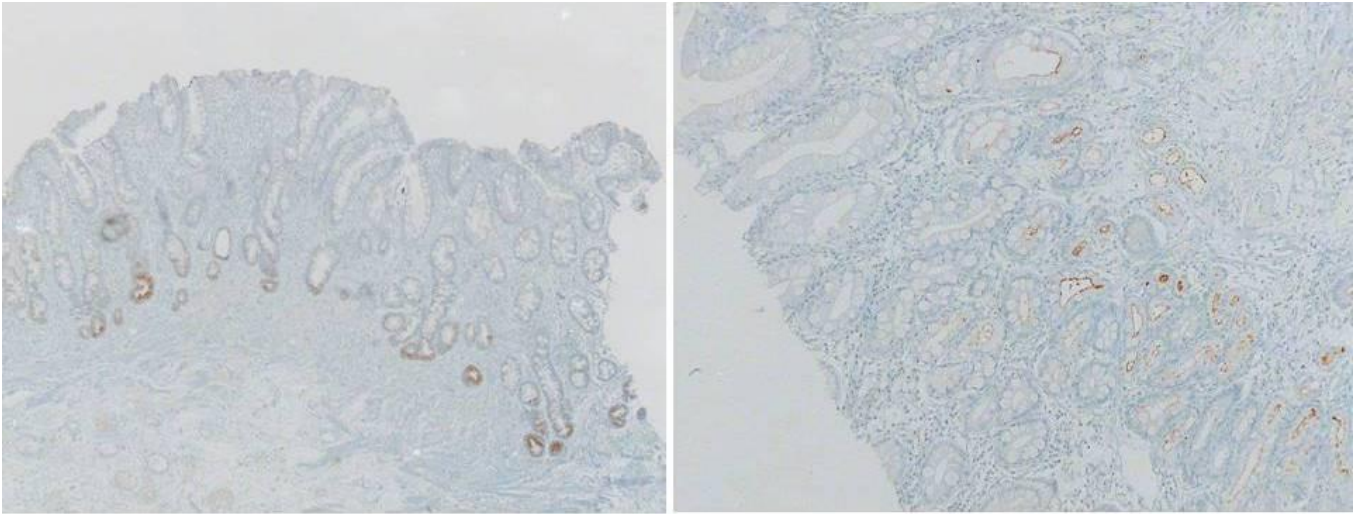
### 6.2.1.1 CD 133

La tinción CD 133 se observó, principalmente, en la zona apical, tanto de la membrana como del citoplasma en el caso de tejido tumoral. Ésta tinción también resulto francamente positiva en las glándulas submucosas de los pacientes con EB así como en zonas necróticas y detritus celulares (Figura 6.8). En los caso de EB sin displasia, la inmunorreacción se observó predominantemente en la base de las glándulas, mientras que en los casos de displasia y ACE, ésta reacción adoptaba un

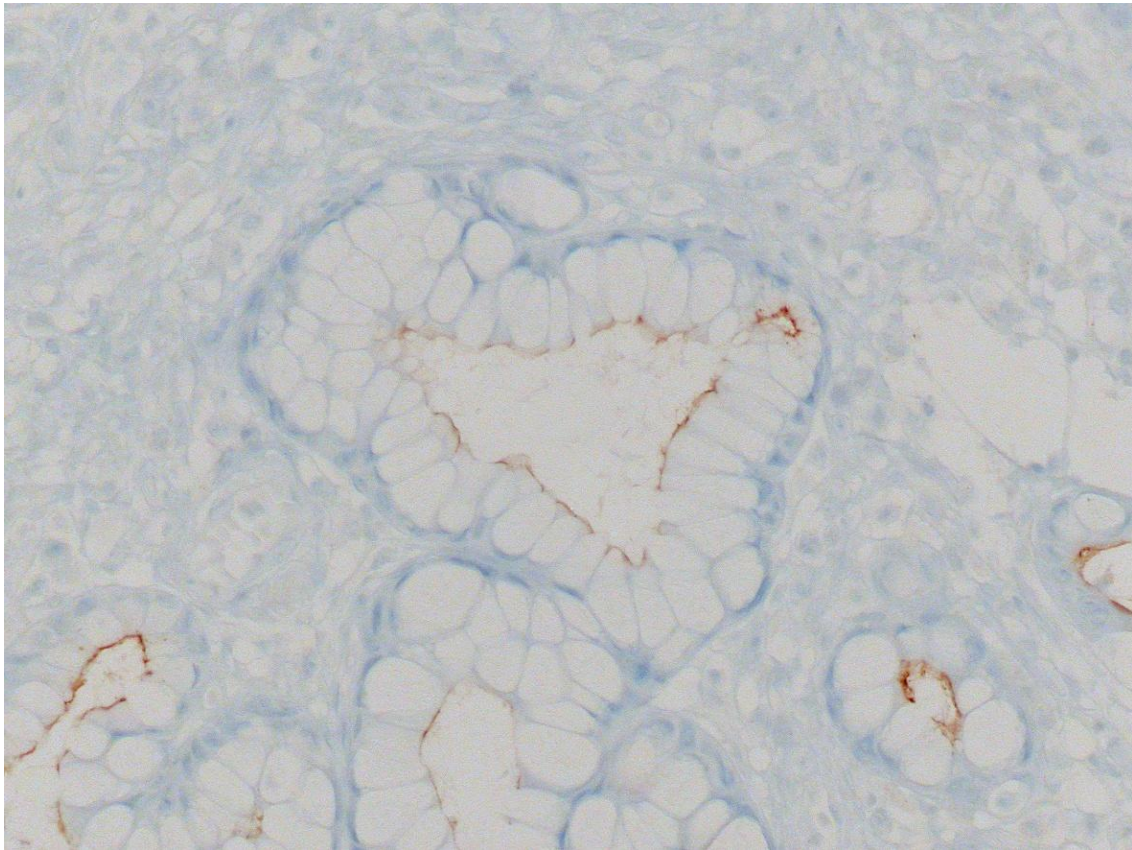
patrón más difuso afectando segmentos más amplios de la longitud glandular. (Figuras 6.9-6.13).



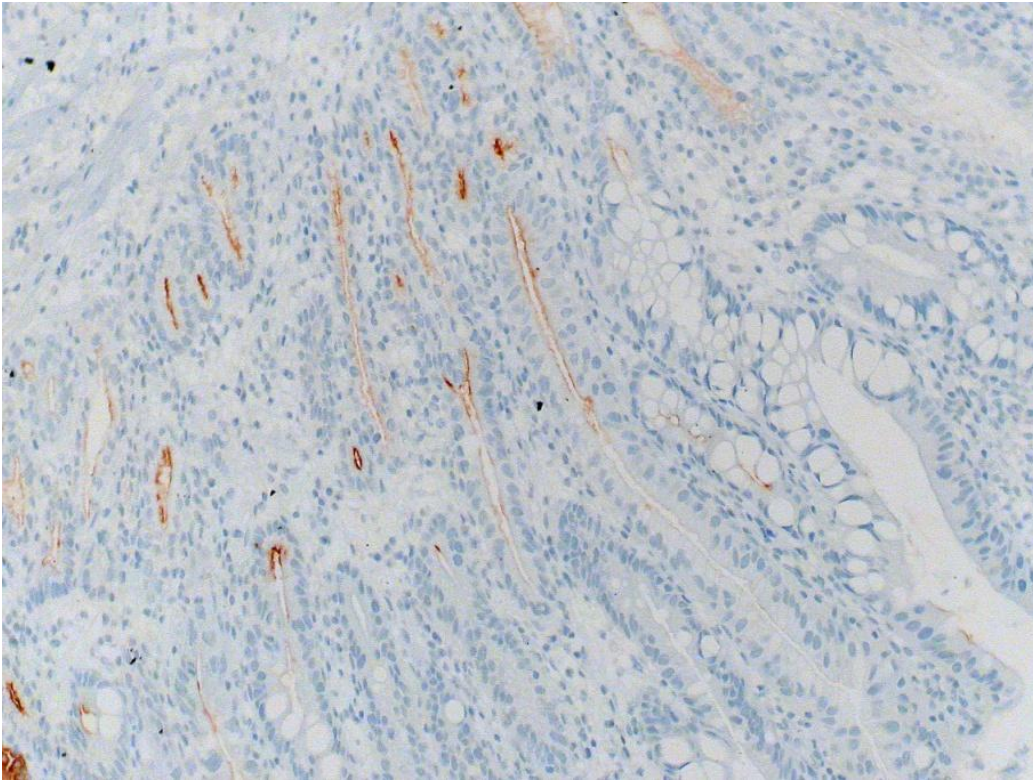
**Fig 6.8.** Imágenes obtenidas mediante la técnica IHQ CD 133. La imagen A se corresponde a una inmunorreacción positiva frente a éste Ac en la superficie luminal de las células que tapizan los conductos excretores de las glándulas submucosas, mientras que en B se observa una reacción positiva tanto en la glándula submucosa como en el epitelio que recubre el conducto excretor adyacente.



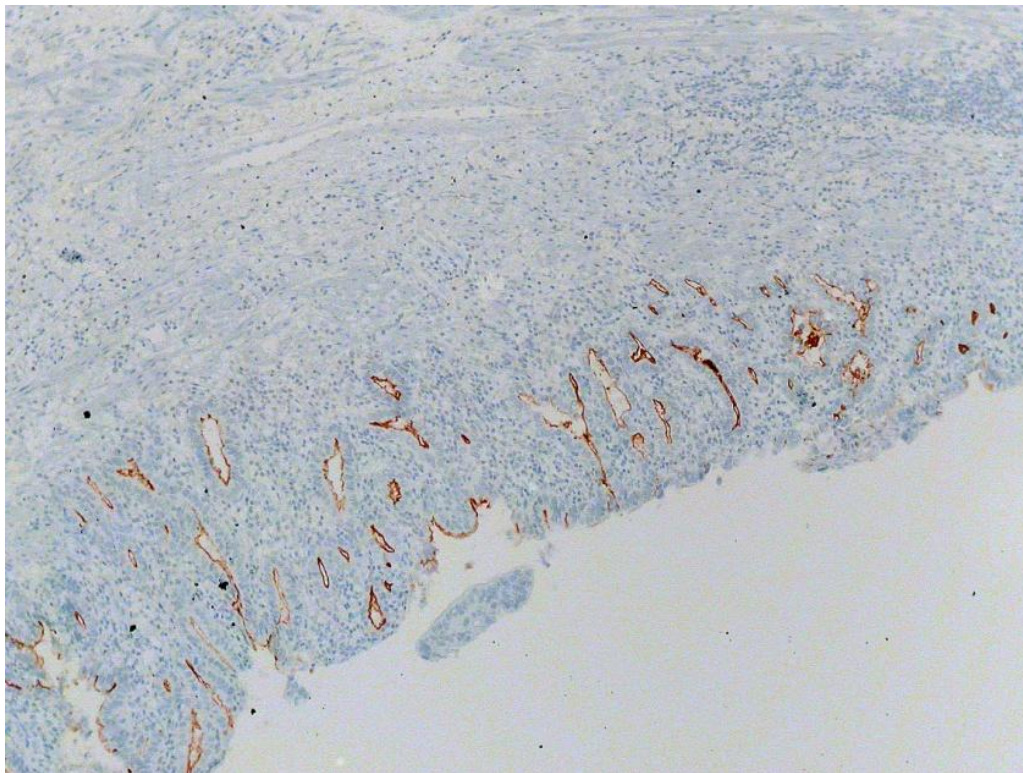
**Fig 6.9.** Imágenes obtenidas mediante la técnica inmunohistoquímica CD 133. Se observan las características células caliciformes del Esófago de Barrett, en ambos casos, sin signos de displasia. En ambas imágenes se aprecia el patrón de tinción característico de ésta técnica, esto es, críptica luminal en la base de las glándulas.



**Fig. 6.10.** Mediante zoom de gran aumento se realiza una mayor aproximación a la base de la glándula con metaplasia intestinal de Barrett sin displasia. Se aprecia una tinción lineal de la superficie del polo luminal de la célula submucosa.

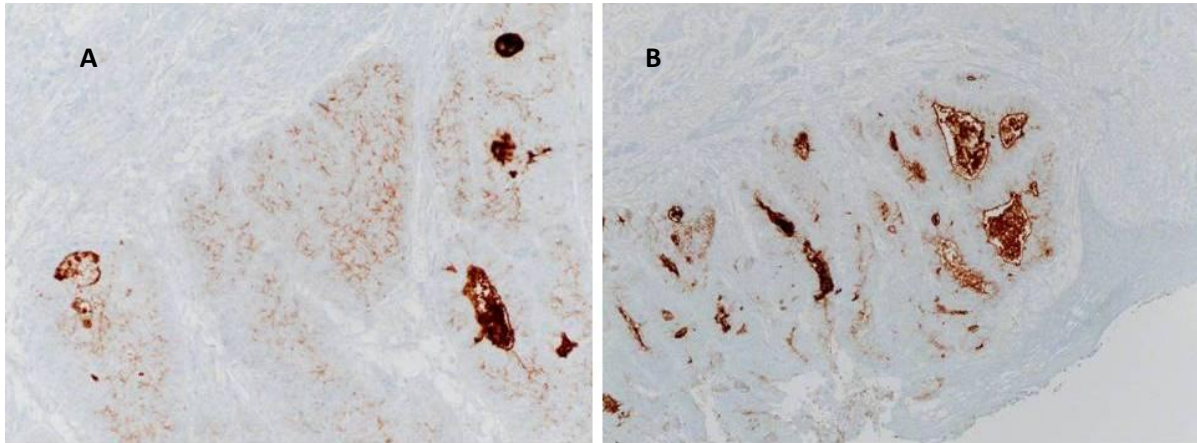


**Fig 6.11.** En esta imagen se observan glándulas con metaplasia intestinal de Barrett sin displasia, adyacentes a glándulas con displasia de bajo grado que muestran una inmunorreacción positiva a CD 133. Nótese que el patrón característico luminal de esta tinción afecta a gran parte de la longitud de la glándula submucosa, en el caso de la displasia, mientras que en las zonas sin displasia adyacentes, la tinción es negativa ó afecta únicamente a la base de la glándula.



**Fig. 6.12.** En esta imagen se observa un foco de displasia de alto grado adyacente a un foco de adenocarcinoma invasivo mediante técnica IHQ CD 133. Nótese que la tinción, de patrón luminal, afecta prácticamente la totalidad de la glándula en un corte longitudinal, desde su base hasta la superficie.

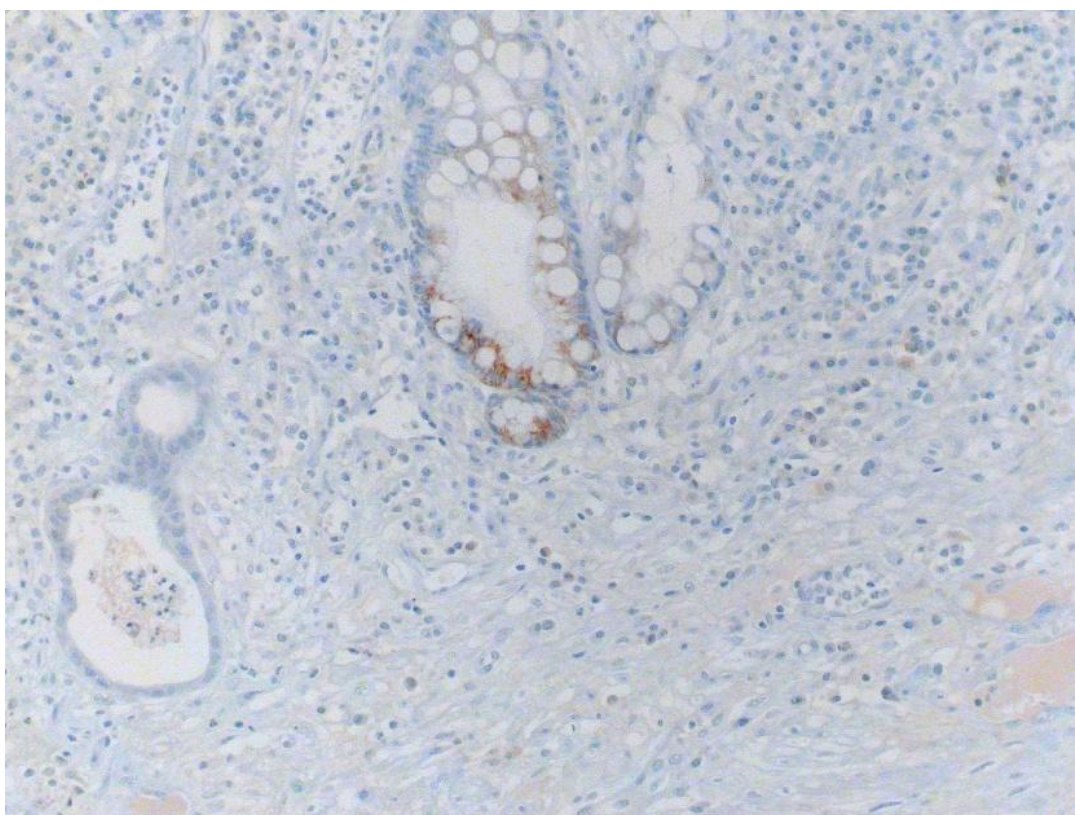




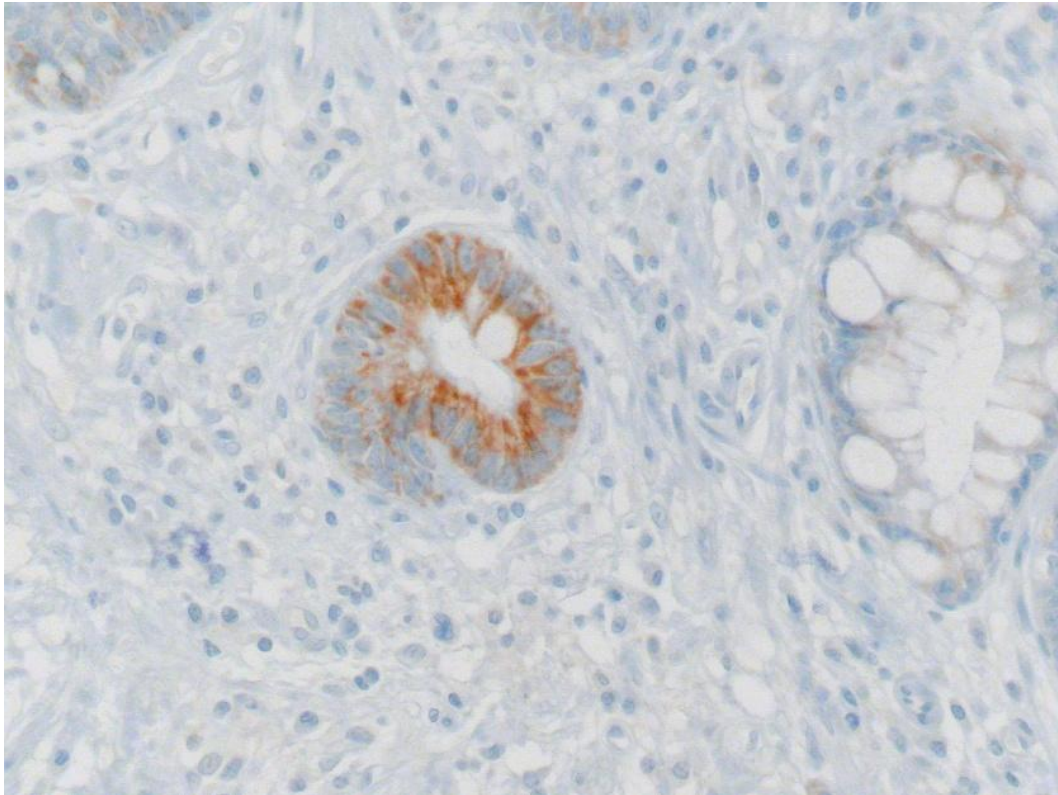
**Fig.6.13.** Imágenes realizadas mediante técnica IHQ CD 133. (A) Se observa una ACE adyacente a zonas glandulares con tinción luminal y glandular. Las zonas correspondientes al ACE muestran un patrón sólido, con tinción irregular de las células que se muestran apelotonadas unas junto y le dan un aspecto pseudoestratificado. (B) En esta imagen se observa un foco de ACE invasivo por debajo del epitelio escamoso adyacente. El patrón de tinción es, como en la imagen A, de distribución luminal e intraglandular. Se observa una tinción intensa que afecta a amplios segmentos de la glándula, de predominio en las zonas que corresponden a cortes longitudinales. El interior de la glándula también presenta una inmunorreacción positiva que puede estar en relación con tejido necrótico y/o detritus celulares inespecíficos.

### 6.2.1.2 p504s

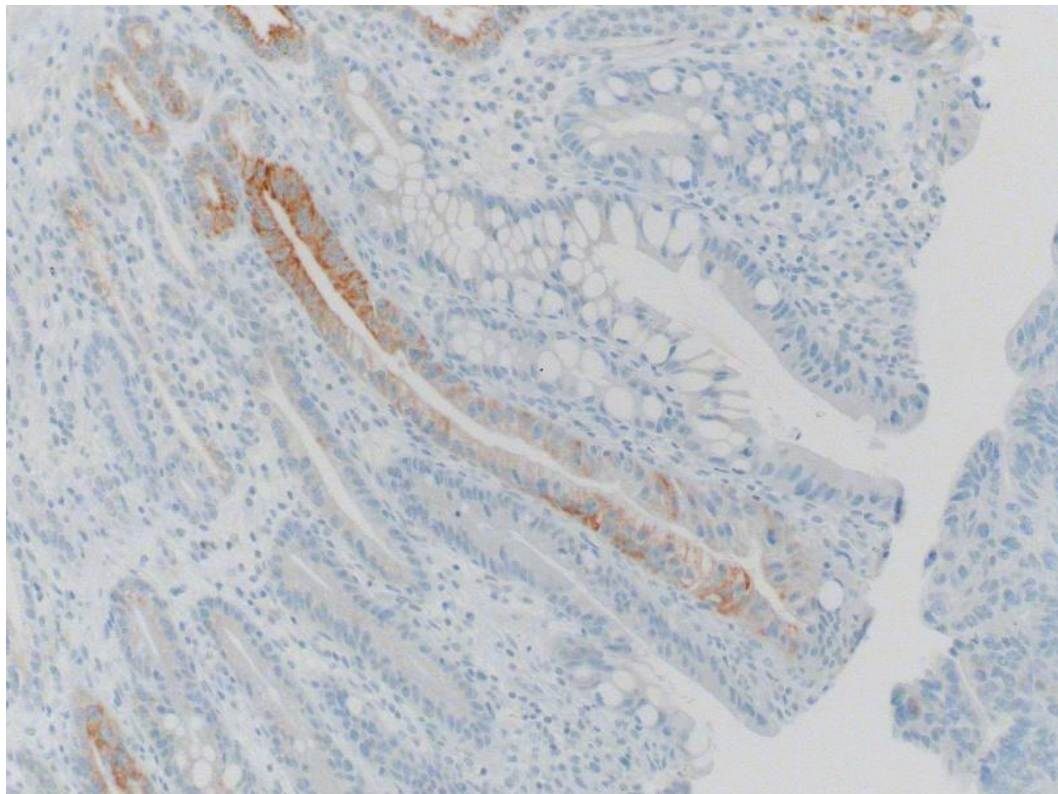
En el caso de p504s, la tinción fue de tipo granular localizada a nivel del citoplasma celular. Al igual que en el caso de CD 133, cuando se estudiaron los casos de EB sin displasia, observamos que la inmunorreacción resultaba positiva en la base de las glándulas y a medida que progresaban los cambios hacia displasia y carcinoma, el patrón se iba extendiendo afectando amplias zonas de forma parcheada y en amplios segmentos de la longitud glandular. (Figuras 6.14-6.19).



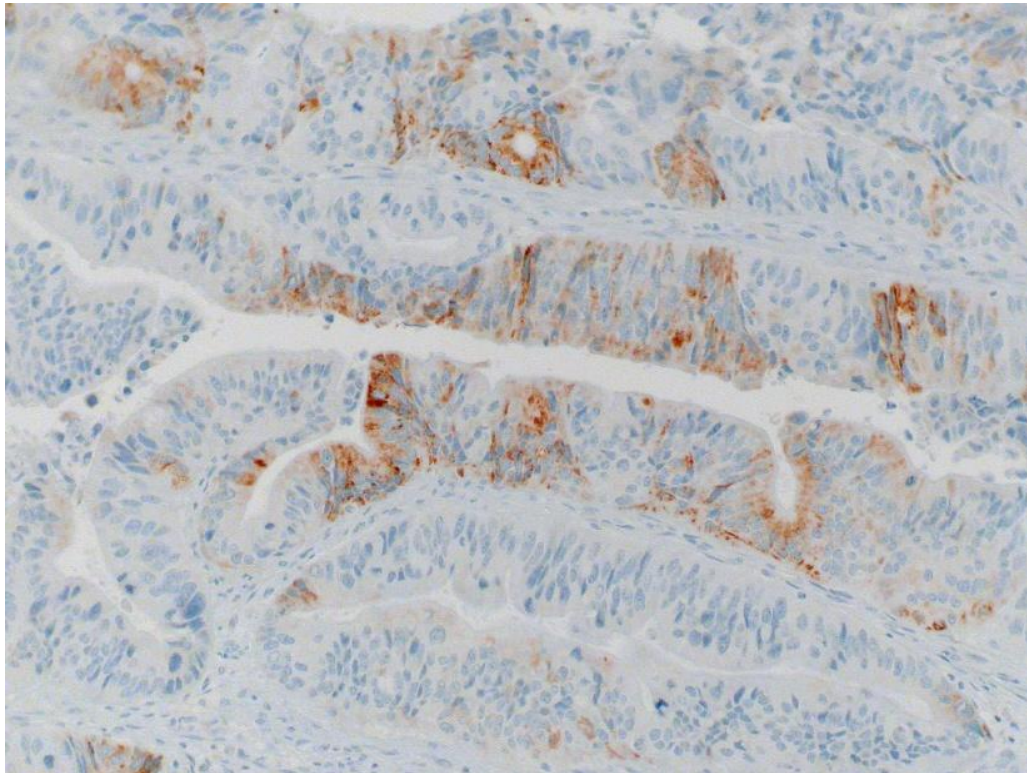
**Fig 6.14.** Imagen obtenida mediante la técnica IHQ p504s (alfa-metil-coenzima A racemasa) y que presenta hallazgos histológicos compatibles con metaplasia intestinal de Barrett sin displasia. Mediante ésta técnica se aprecia un patrón de tinción granular citoplasmática que, al igual que en el caso del CD 133, tiende a circunscribirse a la base de la glándula.



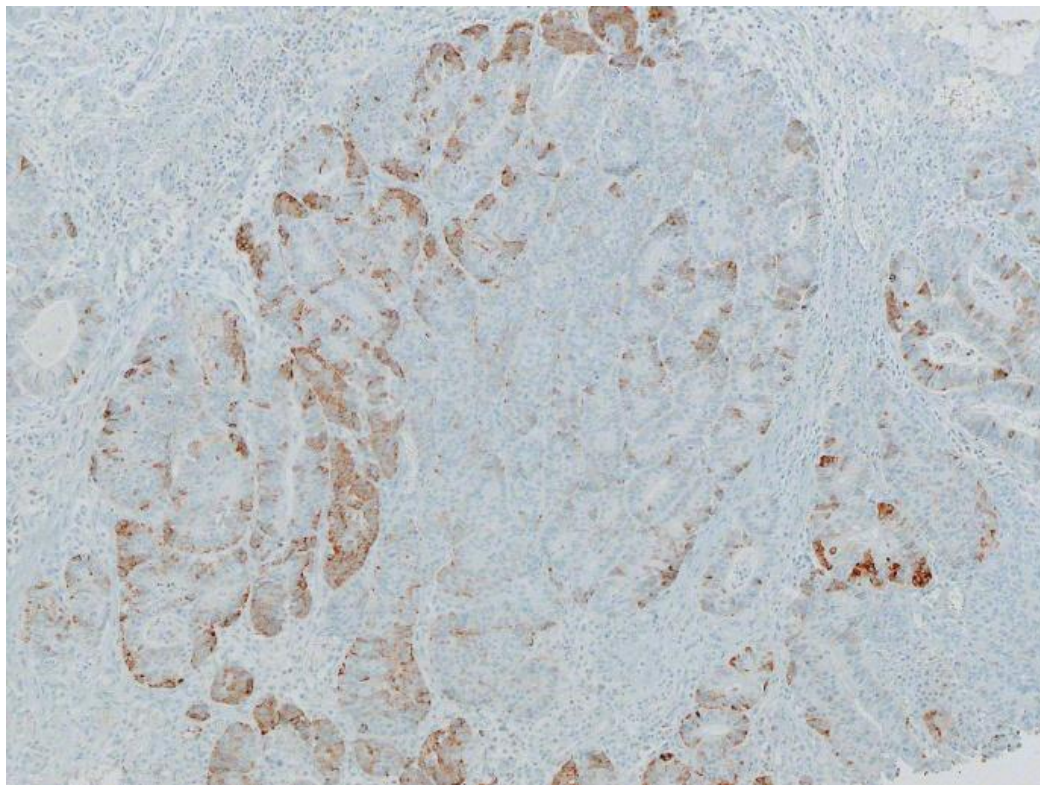
**Fig 6.15.** En esta imagen, también obtenida mediante la técnica IHQ p504s, se observa una glándula con displasia de bajo grado adyacente a otra que presenta células caliciformes compatibles con metaplasia intestinal de Barrett sin displasia. Nótese como, en el caso de metaplasia intestinal sin displasia, la inmunorreacción es muy débil lo cual, a efectos prácticos, puede interpretarse como negativa.



**Fig 6.16.** En esta imagen se observan glándulas con metaplasia intestinal de Barrett sin displasia, con las células caliciformes características, adyacentes a glándulas con displasia de bajo grado e inmunorreacción positiva a p504s. Nótese el patrón de tinción característico de esta técnica, del tipo citoplasmático granular, que afecta a gran parte de la longitud de la glándula submucosa, en el caso de la displasia, mientras que en las zonas sin displasia adyacentes la tinción es negativa.



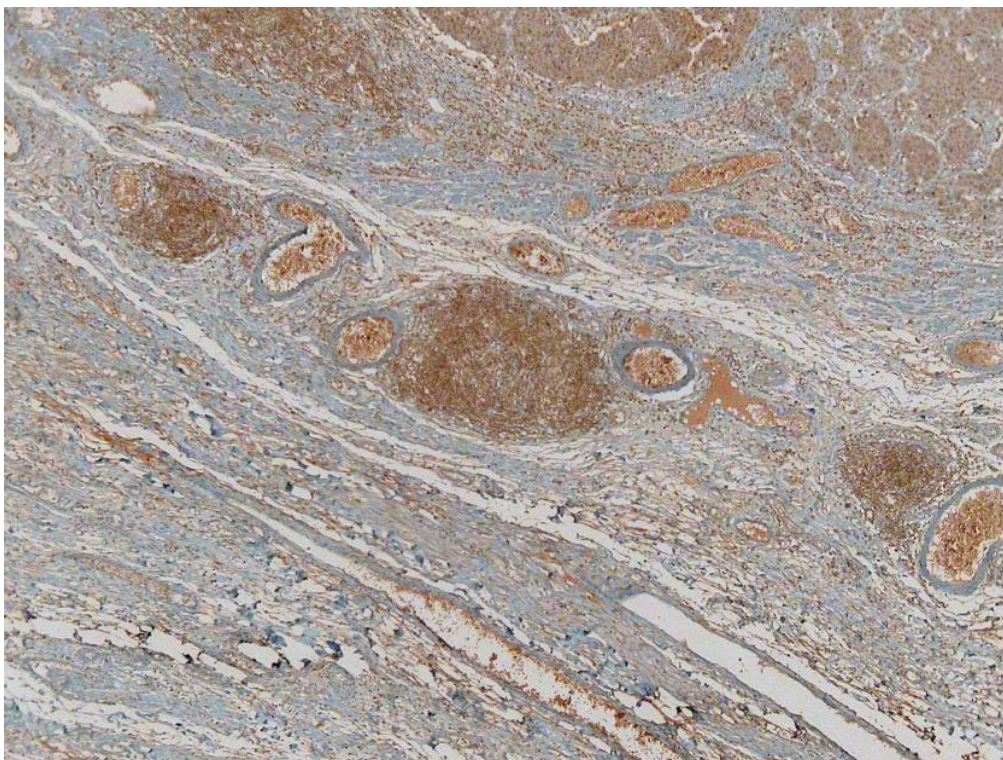
**Fig 6.17.** En esta imagen se observan amplias zonas desestructuradas compatibles histológicamente con displasia de alto grado sobre una metaplasia intestinal de Barrett. Nótese como la inmunorreacción al p504s es fuertemente positiva y afecta a amplias zonas celulares.



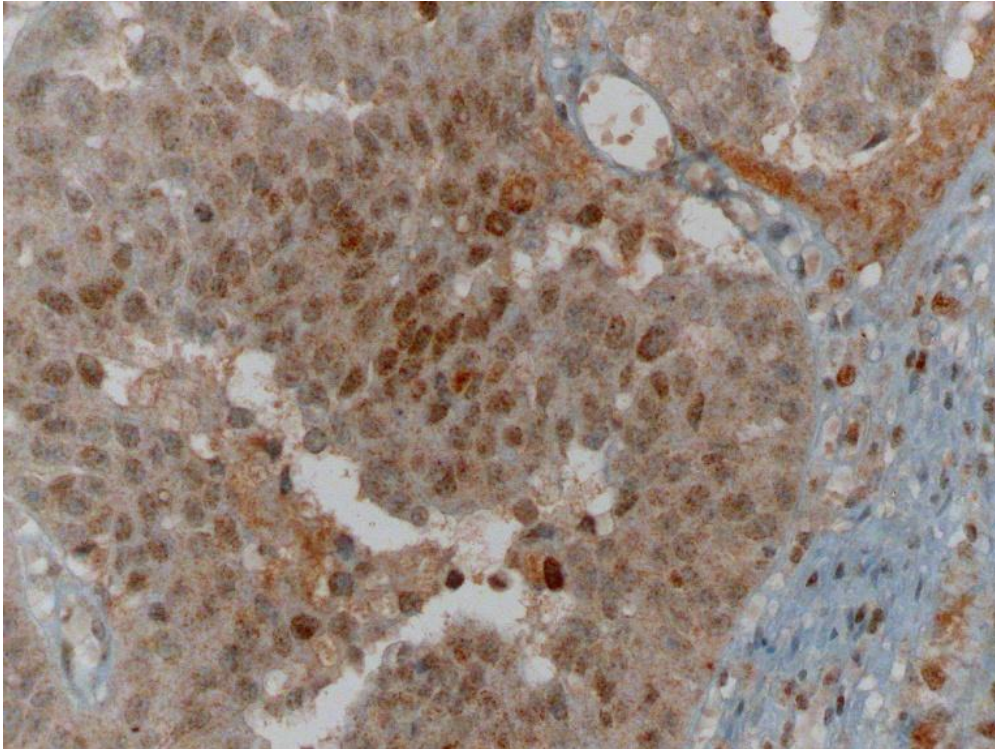
**Fig 6.18.** Imagen correspondiente a un adenocarcinoma esofágico invasivo. Se observa una inmunorreacción fuertemente positiva a p 504s con un patrón parcheado que, aunque parcheado, afecta a amplios segmentos de la longitud glandular.

### 6.2.1.3 TWIST

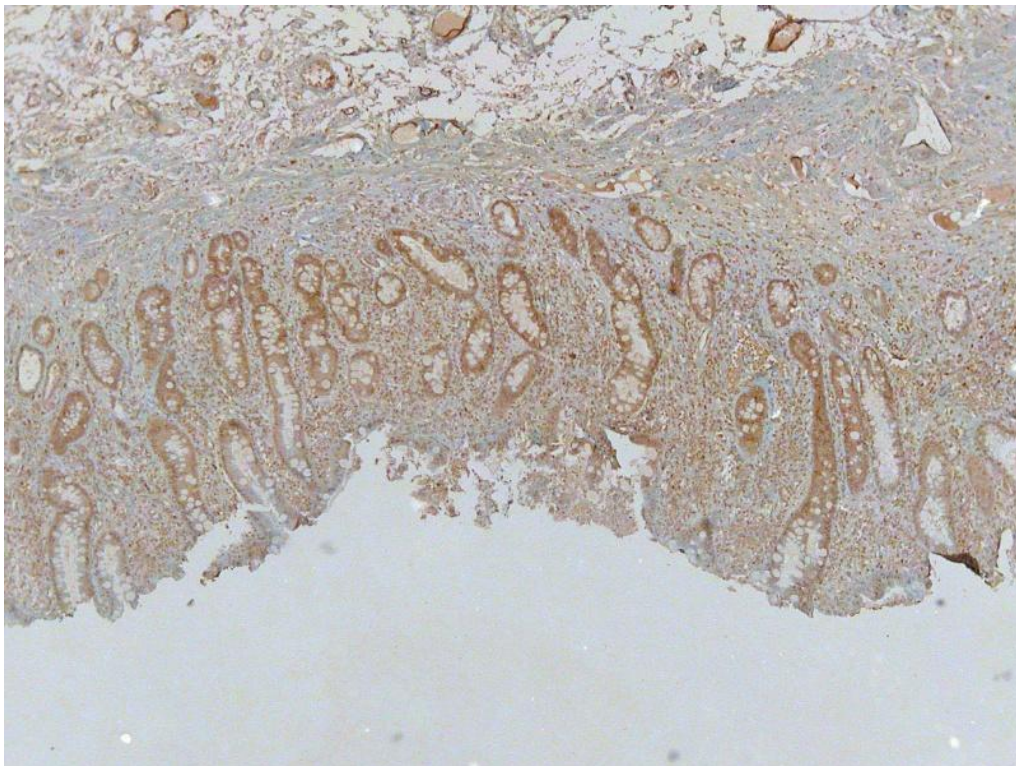
La expresión del TWIST fue muy heterogénea, resultando positiva a nivel nuclear y citoplasmático en una gran variedad de tejidos, desde células del estroma, hasta linfocitos, folículos linfoides y células inflamatorias; lo cual, aunado a la falta de experiencia en el uso de esta técnica IHQ, hace que los resultados sean confusos y muy poco satisfactorios. En las imágenes se pueden observar algunas variaciones en la técnica de procesamiento. Se ensayaron tinciones con Ac concentrados y tiempos de desenmascaramiento prolongado que condicionaron unas tinciones intensas muy inespecíficas, tanto de epitelio de Barrett como de vasos sanguíneos, linfocitos y otros detritus celulares (Figuras 6.20 y 6.21), con menores concentraciones de Ac y tiempos de desenmascaramiento menores, los campos fueron más limpios pero la tinción de los leucocitos (células testigo para considerar un procesamiento técnicamente correcto) fue irregular con lo que los resultados presentaron serias dudas sobre su valoración. (Figuras 6.22-6.24)



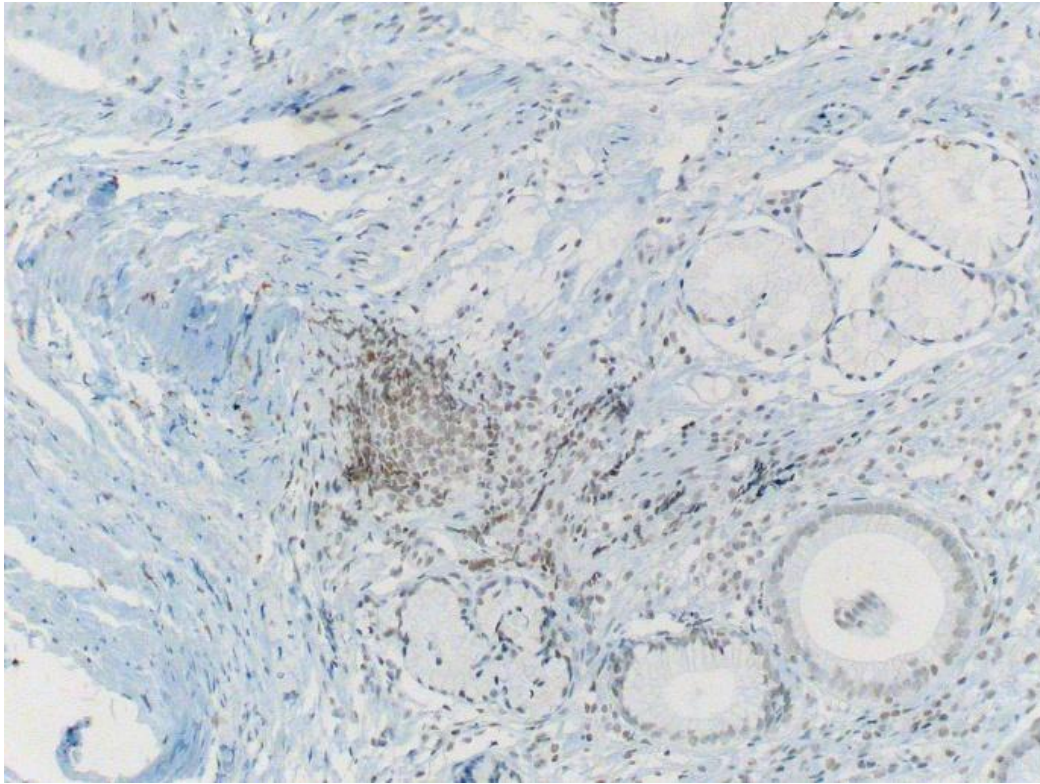
**Fig 6.20.** Esta imagen ejemplifica las dificultades técnicas observadas en la realización de ésta tinción inmunohistoquímica. Al ser el TWIST, una técnica con patrón de tinción intranuclear, su testigo se realiza con linfocitos. En esta imagen se observan folículos linfoides con tinción positiva, pero también resultan positivos detritus celulares, segmentos vasculares y otras células adyacentes. Se utilizó una alta concentración del Ac así como un tiempo de desenmascaramiento prolongado.



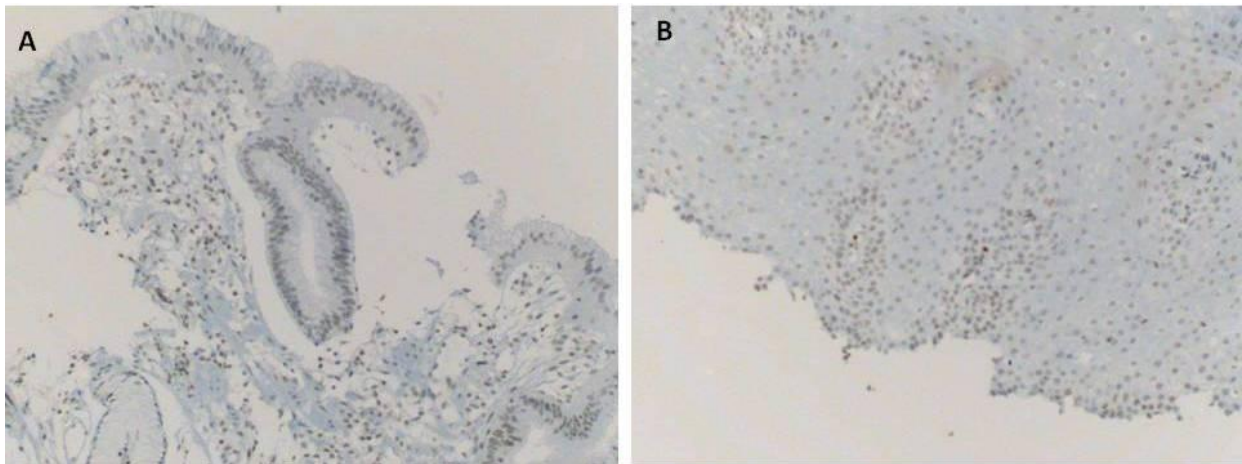
**Fig 6.21.** Mediante zoom de gran aumento se observa, a mayor detalle, cómo concentraciones altas de Ac tiñen una gran cantidad de tejidos de forma inespecífica. En este caso conviven tinciones positivas de células de adenocarcinoma con otras tinciones, también positivas, células no neoplásicas.



**Fig 6.22.** En este caso, correspondiente a una metaplasia de Barrett sin displasia, se observa positividad del TWIST en amplias zonas tisulares.



**Fig 6.23.** Tras variar la técnica de procesamiento histológico (menor concentración de Ac y menores tiempos de desmascaramiento), se conseguía un fondo más limpio, sin embargo, la tinción de los linfocitos (células testigo) era débil e irregular, lo que daba serias dudas sobre su valoración.



**Fig 6.24.** En estas imágenes se observa el patrón de tinción característico del TWIST, es decir, intranuclear. (A) En este caso se observa una débil tinción positiva de una célula de Barrett sin displasia; sin embargo, la tinción resulta inespecífica como en el caso (B) donde se tiñe incluso la zona basal de epitelio escamoso en zonas histológicamente normales.

## 6.2.2 Resultado de las tinciones (Proporción, Intensidad y Q-Score)

### 6.2.2.1 Intensidad

Los resultados en cuanto a la intensidad en la tinción IHQ se ilustra en las figuras 6.25-6.27. En el caso de CD 133 se observó un predominio de “negativo” en los casos de mucosa normal y de EB sin displasia, sin embargo, a medida que progresaron los cambios displásicos también aumento la intensidad hasta hacerse mayormente “moderado” y “fuerte” en los casos de ACE. Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas ( $p<0,001$ ).

La intensidad observada con el uso de p504s, al igual que con CD 133, resultó completamente negativa en el caso de “mucosa normal”, pero se hizo predominantemente “moderada” en los casos de EB sin displasia y EB con DBG. La tinción fue más “fuerte” en los casos de DAG y ACE. Al igual que con el uso de CD 133, las diferencias observadas tuvieron valores estadísticamente significativos ( $p<0,001$ ).

En lo que respecta al TWIST, como ya se explicó anteriormente, los resultados fueron difíciles de interpretar debido a la heterogeneidad de la tinción, como se observa en la figura 6.27, hubo una gran proporción de muestras con intensidad “débil” en los grupos “mucosa normal” y “EB sin displasia”, así mismo hubo numerosos “negativos” en los grupos con displasia incluso en casos de ACE. Aunque se obtuvieron valores estadísticamente significativos ( $p=0,002$ ), estas diferencias resultan confusas y difícilmente interpretables.



### Intensidad CD 133

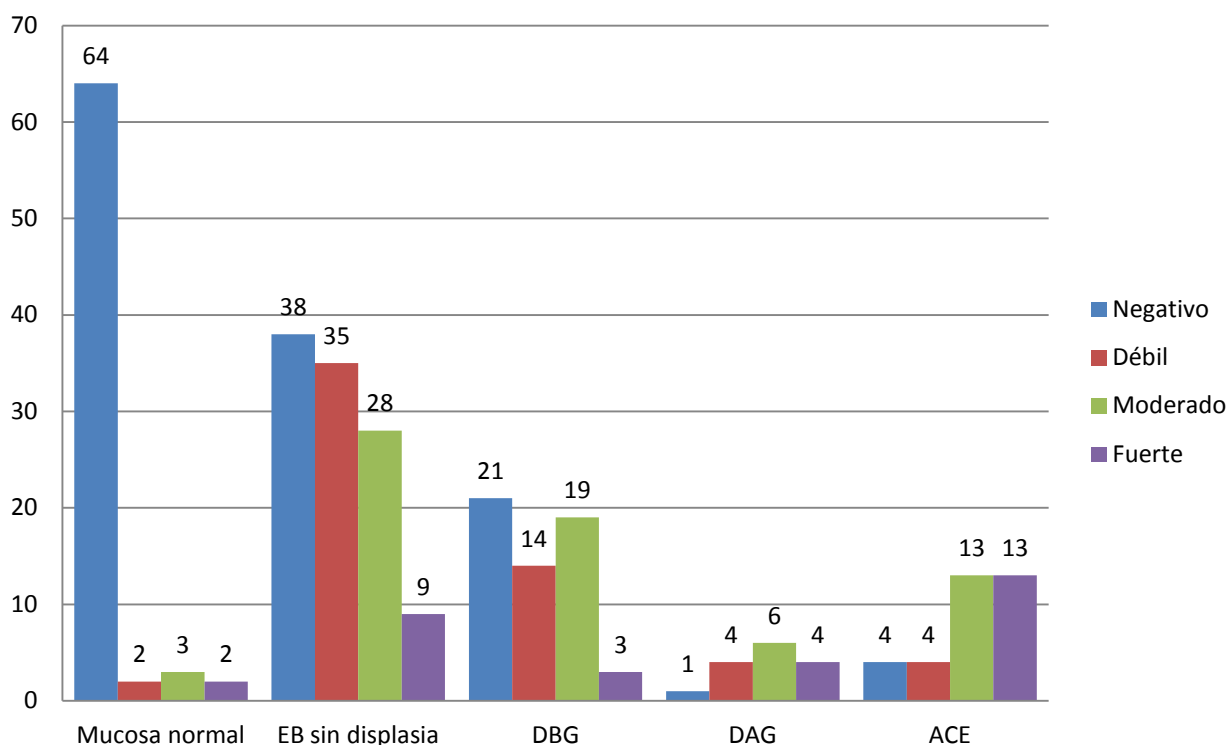


Fig. 6.25. Intensidad del CD 133 por grupos de estudio. DBG (Displasia de bajo grado), DAG (displasia de alto grado), ACE (adenocarcinoma esofágico). Los resultados se muestran en números absolutos.

### Intensidad p504s

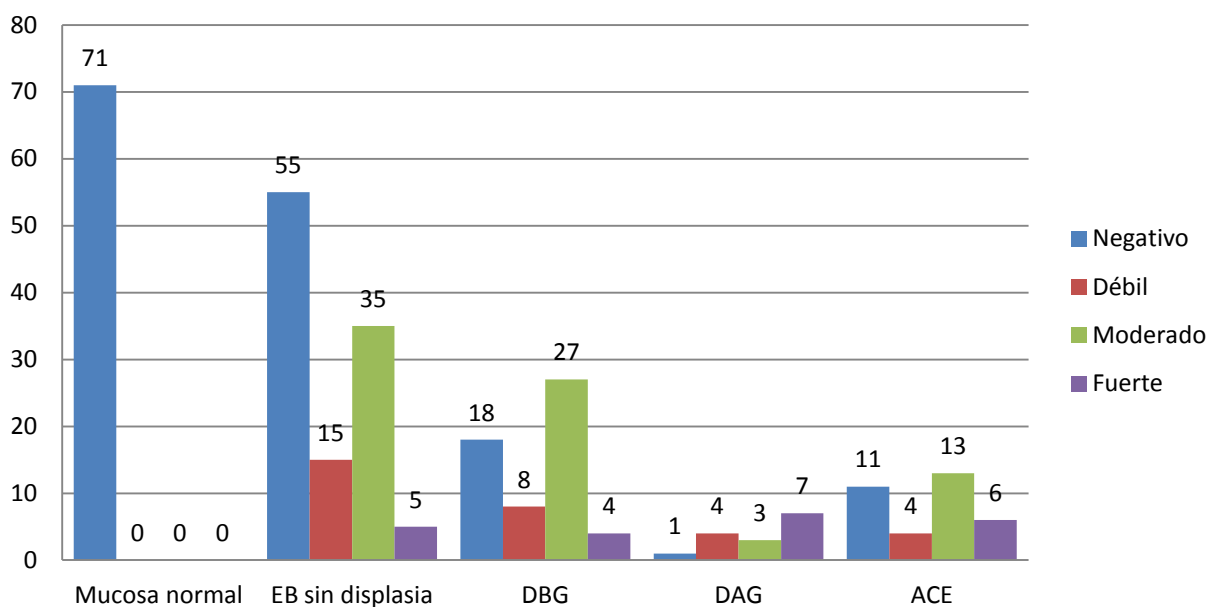
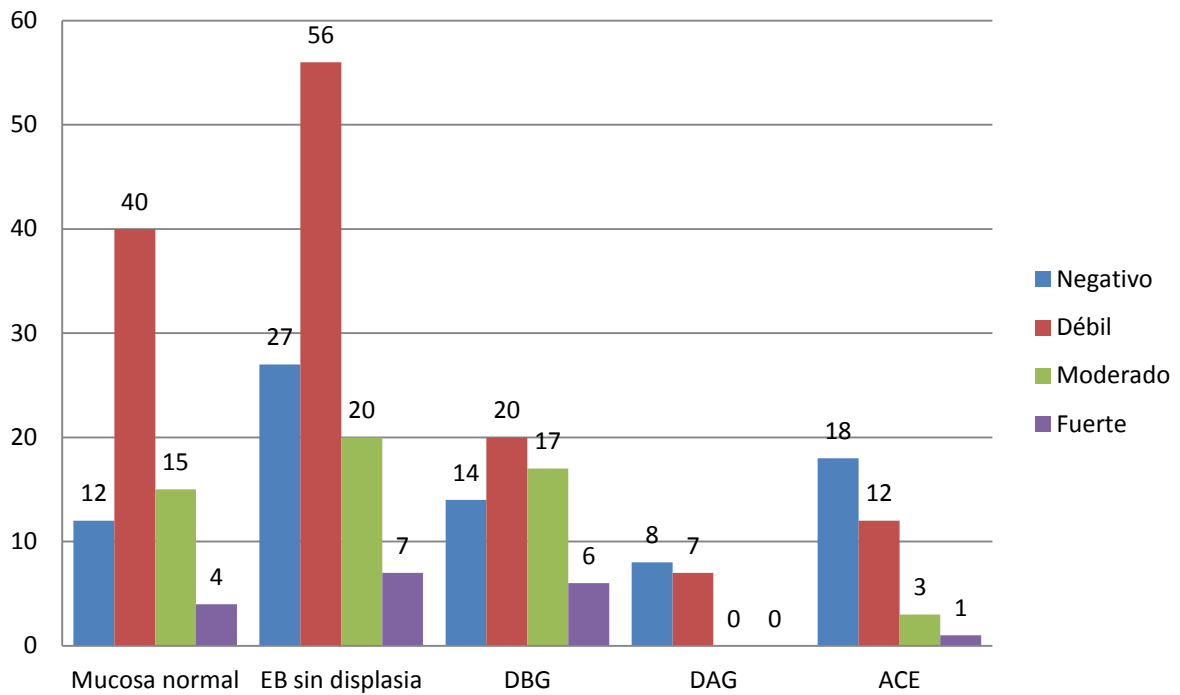


Fig. 6.26. Intensidad de p504s por grupos de estudio. DBG (Displasia de bajo grado), DAG (displasia de alto grado), ACE (adenocarcinoma esofágico). Los resultados se muestran en números absolutos.

## Intensidad TWIST



**Fig. 6.27.** Intensidad de TWIST por grupos de estudio. DBG (Displasia de bajo grado), DAG (displasia de alto grado), ACE (adenocarcinoma esofágico). Los resultados se muestran en números absolutos.

### 6.2.2.2 Proporción

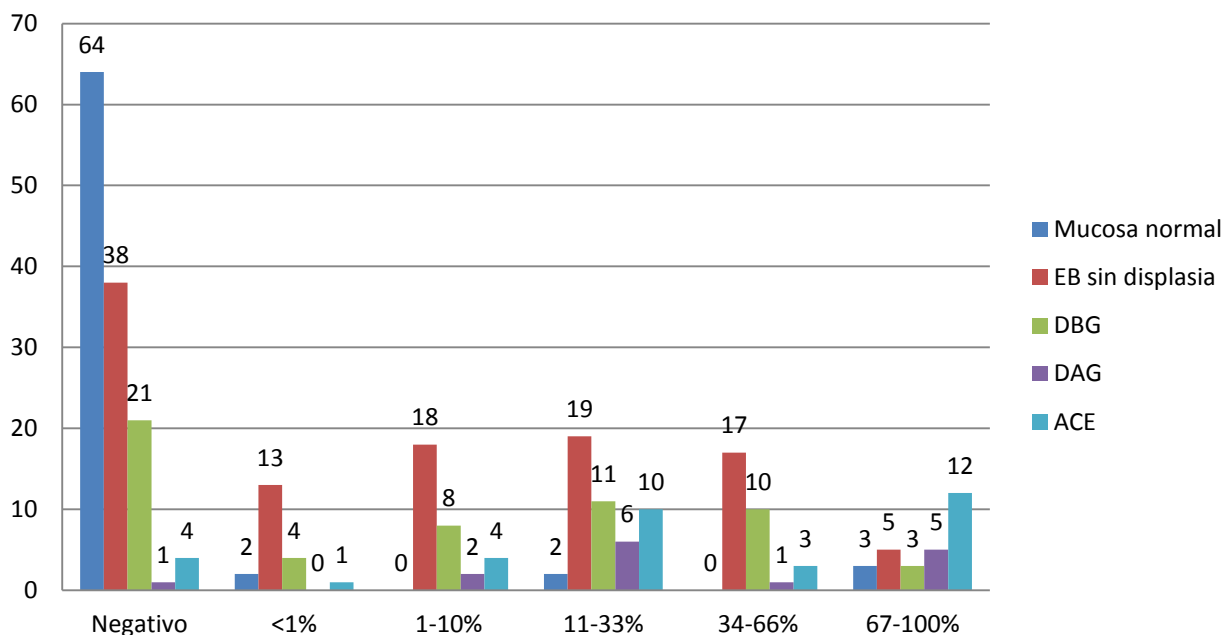
Los resultados, en lo que respecta a la proporción de la muestra teñida, en las diferentes técnicas, se ilustra en las figuras 6.28-6.30.

En lo que respecta a CD 133, la mayoría de los casos con “mucosa normal” y EB sin displasia fueron “negativos” o tuvieron una proporción de muestra teñida <33%. Sin embargo, esta tendencia se revierte a medida que progresan los cambios histológicos, con proporciones >34% en los casos de DBG y DAG y entre el 67-100% en los casos de ACE. Estas diferencias logran valores estadísticamente significativos con una  $p < 0,001$ .

Las proporciones de tinción, en el caso de p540s siguen un patrón similar respecto a CD 133. Todos los pacientes con mucosa normal son negativos a esta tinción mientras que, en los caso de displasia (tanto de bajo como de alto grado) las tinciones son, o negativas o con proporciones entre 1-33% en el caso de la DBG y del 33-66% en el caso de DAG. El ACE, aunque es negativo hasta en 11 casos, la mayor parte de las veces logra proporciones de muestra teñida entre el 33 y el 100% de la muestra. Estas diferencias logran valores estadísticamente significativos con una  $p < 0,001$ .

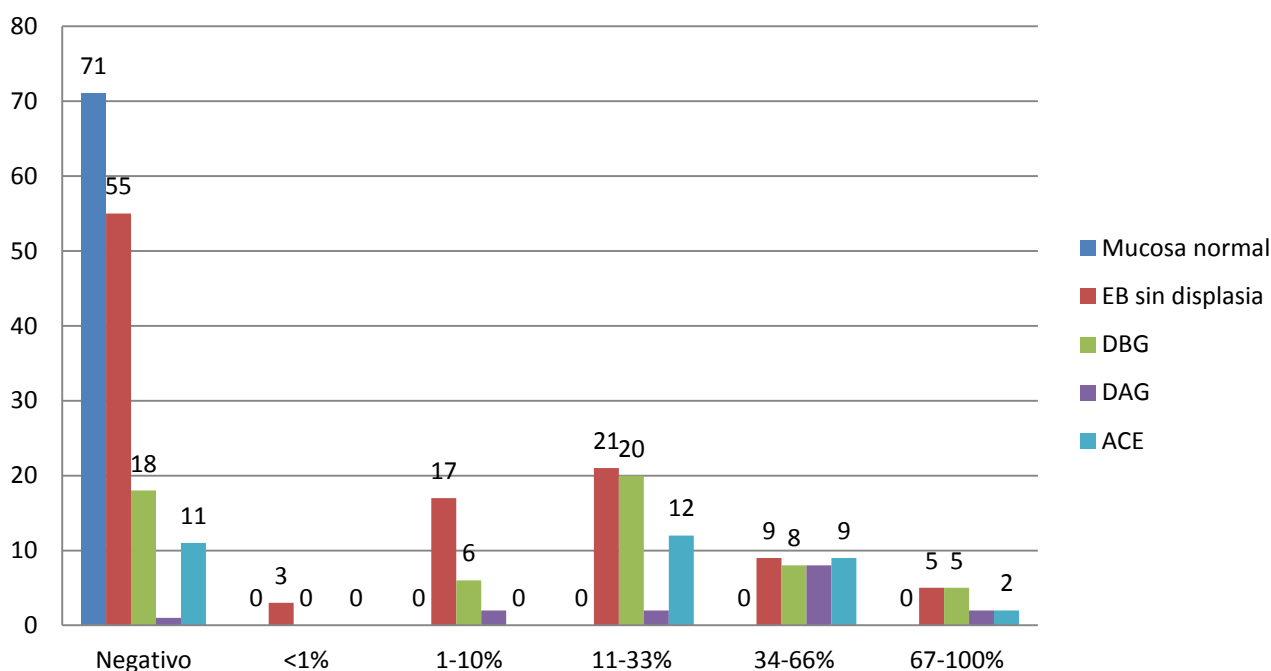
En lo que respecta a TWIST, al igual que en el caso de la valoración de la “Intensidad”, la valoración de la proporción resultó muy dificultosa al no poder distinguir claramente los tejidos teñidos, clínicamente relevantes para nuestro estudio. Como se ilustra en la figura 6.27, los resultados son completamente heterogéneos, con proporción de tinción alta en los casos de “mucosa normal” y “negativa” en casos de ACE. El análisis estadístico logra valores de significancia estadística ( $p < 0,001$ ) pero dado el contexto clínico-patológico, los resultados carecen de validez práctica.

### Proporción CD 133



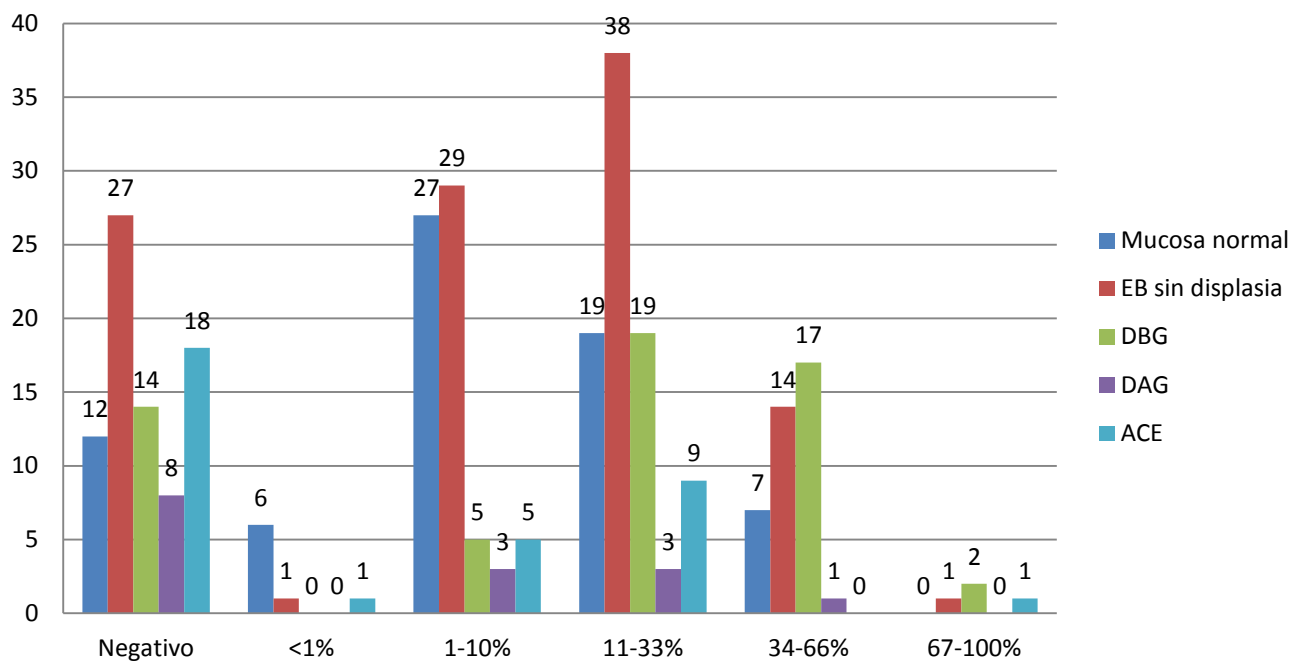
**Fig. 6.28.** Proporción de la muestra teñida mediante el uso de CD 133, dividida por grupos de estudio. DBG (Displasia de bajo grado), DAG (displasia de alto grado), ACE (adenocarcinoma esofágico). Los resultados se muestran en números absolutos.

### Proporción p504s



**Fig. 6.29.** Proporción de la muestra teñida mediante el uso de p504s dividida por grupos de estudio. DBG (Displasia de bajo grado), DAG (displasia de alto grado), ACE (adenocarcinoma esofágico). Los resultados se muestran en números absolutos.

### Proporción TWIST



**Fig. 6.30.** Proporción de la muestra teñida mediante el uso de TWIST, dividida por grupos de estudio. DBG (Displasia de bajo grado), DAG (displasia de alto grado), ACE (adenocarcinoma esofágico). Los resultados se muestran en números absolutos.

### 6.2.2.3 Q-Score

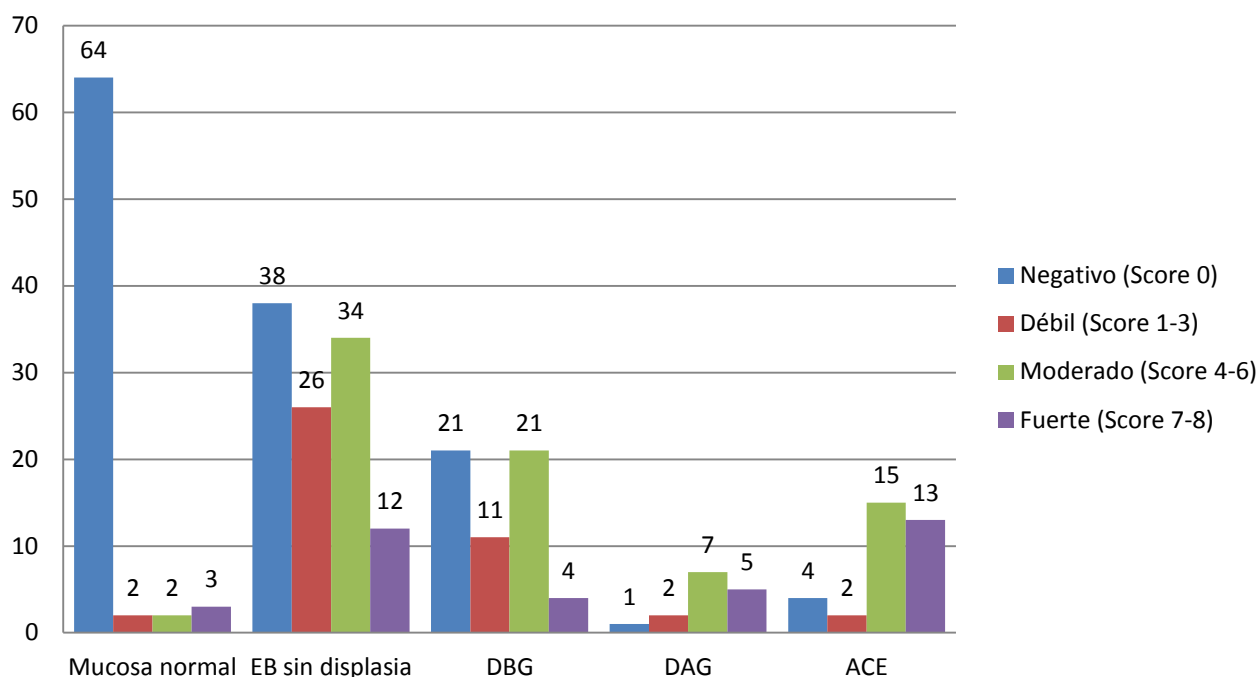
Los Q-Scores observados en cada grupo se resumen en la tabla 6.7, las comparaciones de “p” en la tabla 6.8 y se ilustran en las figuras 6.31-6.33.

Como se puede observar, existen diferencias estadísticamente significativas en el Q-Score al comparar el grupo “*EB sin displasia*” frente al grupo “*EB con DAG*” mediante el empleo del CD 133 ( $p=0,02$ ), esta diferencia también se observa cuando éste mismo grupo (*EB sin displasia*) se compara frente al grupo “*ACE*” mediante el empleo de todas las técnicas IHQ utilizadas ( $p<0,001$ , 0,017 y 0,017 para CD 133, p504s y TWIST, respectivamente).

En el caso del grupo “*EB con DBG*”, se observan diferencias significativas frente al grupo “*DAG*” mediante el empleo de todas las tinciones estudiadas ( $p=0,014$ , 0,006 y 0,026 para CD 133, p504s y TWIST, respectivamente); sin embargo, en el caso del TWIST, esta diferencia involucra unos Q-Scores más altos en el caso del grupo “*DBG*” frente al grupo “*DAG*” (situación que, como se comentó anteriormente, creemos responde a errores en la técnica y/o interpretación de los resultados). El CD 133 también presentó unos Q-Scores más altos en el caso del grupo “*ACE*” frente a la “*DBG*” ( $p<0,001$ ).

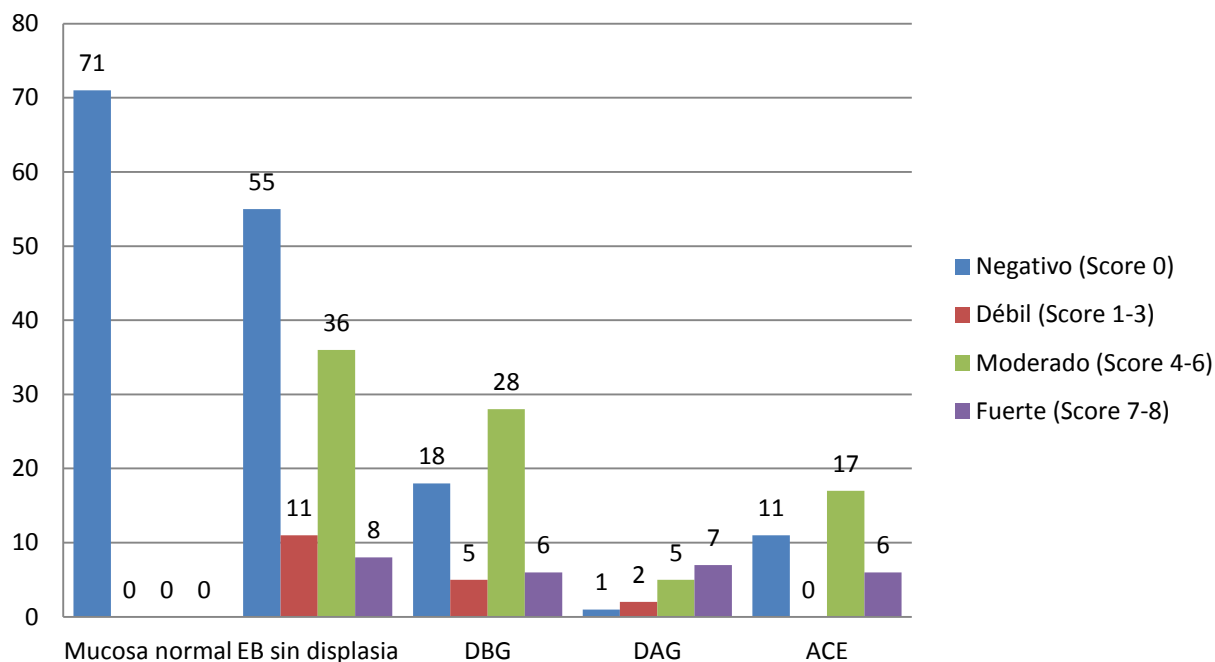
En lo que respecta al grupo “*DAG*” frente al “*ACE*”, sólo se observan diferencias estadísticamente significativas mediante el empleo del p504s ( $p=0,01$ ) a favor de una mayor puntuación en el caso del ACE.

### Q-score CD 133



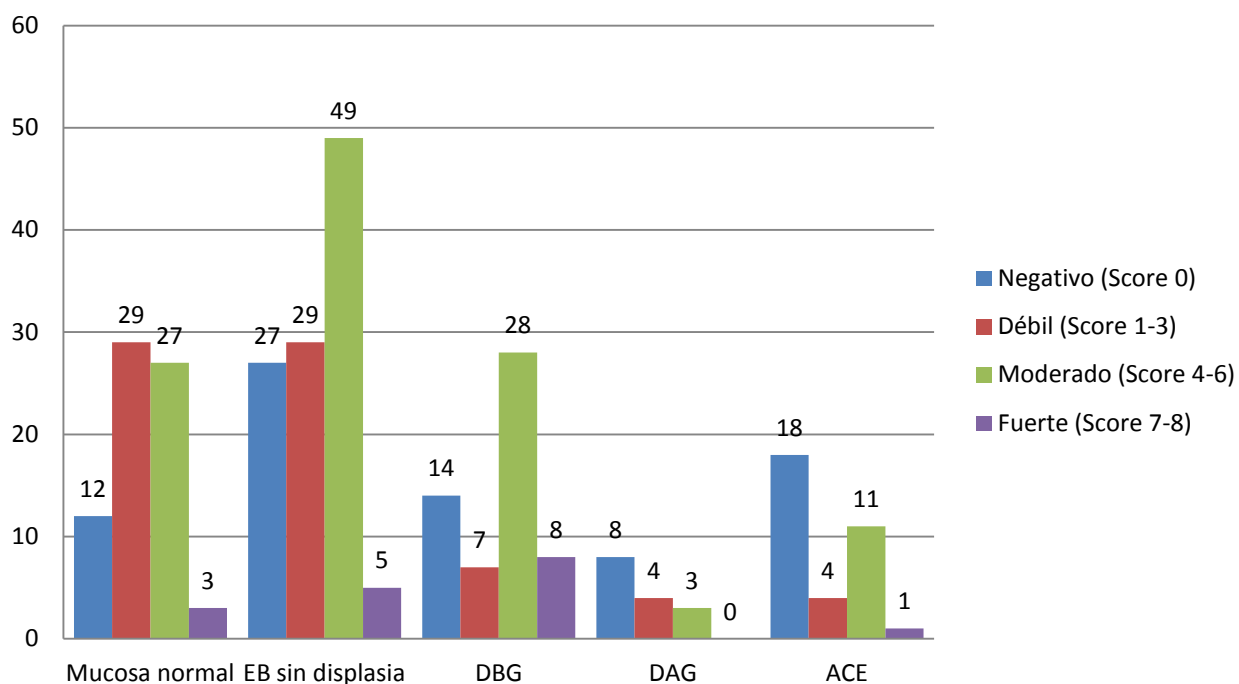
**Fig. 6.31.** Valores del Q-Score de Allred mediante el empleo del CD 133. Por grupos de estudio. DBG (Displasia de bajo grado), DAG (displasia de alto grado), ACE (adenocarcinoma esofágico). Los resultados se muestran en números absolutos.

### Q-Score p504s



**Fig. 6.32.** Valores del Q-Score de Allred mediante el empleo del p504s. Por grupos de estudio. DBG (Displasia de bajo grado), DAG (displasia de alto grado), ACE (adenocarcinoma esofágico). Los resultados se muestran en números absolutos.

## Q-Score TWIST



**Fig. 6.33.** Valores del Q-Score de Allred mediante el empleo del TWIST. Por grupos de estudio. DBG (Displasia de bajo grado), DAG (displasia de alto grado), ACE (adenocarcinoma esofágico). Los resultados se muestran en números absolutos.



Q-Score					
	EB sin displasia (%)	EB con DBG (%)	EB con DAG (%)	ACE (%)	p
<b>CD-133</b>					
Negativo (Score 0)	38 (34,5)	21 (36,8)	1 (6,7)	4 (11,8)	<0,001*
Débil (Score 1-3)	26 (23,6)	11 (19,3)	2 (13,3)	2 (5,9)	
Moderado (Score 4-6)	34 (30,9)	21 (36,8)	7 (46,7)	15 (44,1)	
Fuerte (Score 7-8)	12 (10,9)	4 (7)	5 (33,3)	13 (38,2)	
<b>p504s</b>					
Negativo (Score 0)	55 (50)	18 (31,6)	1 (6,7)	11 (32,4)	<0,001*
Débil (Score 1-3)	11 (10)	5 (8,8)	2 (13,3)	0	
Moderado (Score 4-6)	36 (32,7)	28 (49,1)	5 (33,3)	17 (50)	
Fuerte (Score 7-8)	8 (7,39)	6 (10,5)	7 (46,7)	6 (17,6)	
<b>TWIST</b>					
Negativo (Score 0)	27 (24,5)	14 (24,6)	8 (53,3)	18 (52,9)	0,002*
Débil (Score 1-3)	29 (26,4)	7 (12,3)	4 (26,7)	4 (11,8)	
Moderado (Score 4-6)	49 (44,5)	28 (49,1)	3 (20)	11 (32,4)	
Fuerte (Score 7-8)	5 (4,5)	8 (14)	0	1 (2,9)	

**Tabla 6.7.** Comparación del Q-Score en las diferentes técnicas de IHQ por grupos. Resultados presentados en números absolutos y porcentaje dentro del grupo. \*Estadísticamente significativo con  $p < 0,05$ .

Q-Score						
	EB sin displasia			EB con DBG		EB con DAG
	<u>EB con DBG</u>	<u>EB con DAG</u>	<u>ACE</u>	<u>EB con DAG</u>	<u>ACE</u>	<u>ACE</u>
<b>CD 133</b>	0,713	0,02*	<0,001*	0,014*	<0,001*	0,788
<b>p504s</b>	0,108	<0,001	0,017*	0,006*	0,283	0,01*
<b>TWIST</b>	0,047	0,09	0,017*	0,026*	0,03	0,491

**Tabla 6.8.** Comparación intragrupos del valor de "p" obtenido en el Q-Score según las diferentes técnicas de IHQ utilizadas. \*Estadísticamente significativo con  $p < 0,05$ .

### 6.2.3 Interpretación de los valores del Q-Score de Allred

Una vez realizadas las primeras comparaciones y tras obtener los valores del Q-score de Allred, el siguiente paso consistió en la interpretación de los resultados. Para ello, se consideró como tinciones realmente positivas aquellas cuyo score resultó “moderado” o “fuerte” ( $Q\text{-Score} > 4$ ), valores  $< 4$  fueron considerados como tinciones negativas (Tabla 6.9). Los resultados se ilustran en la figura 6.34 y las comparaciones resultantes se resumen en la tabla 6.9.

Como se puede observar, en el caso del CD 133, éste resulta mayormente negativo en los casos de “Mucosa normal” y “EB sin displasia”, mientras que se vuelve progresivamente positiva a medida que avanzan los cambios histológicos, siendo francamente positiva en los casos de “EB con DAG” y “ACE” (80 y 82% respectivamente); estas diferencias resultan estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ).

En lo que respecta al p504s, vemos que resulta completamente negativo en los casos de “mucosa normal” mientras es predominantemente negativo en los casos de “EB sin displasia”. Al igual que en el caso del CD 133, a medida que progresan los cambios histológicos, estos se acompañan de cambios en las proporciones de positividad a la tinción; de esta forma, ya encontramos que hasta casi el 70% de los casos con DBG son positivos, situación que progresa hasta el 93% en los casos de DAG y del 68% en el ACE; estas diferencias consiguen valores de significancia estadística con una  $p < 0,001$ .

En el caso del TWIST y al igual que en análisis previos, los resultados son confusos al ser altamente positiva en los casos de mucosa normal (42,3%) y altamente negativa en el ACE (64,7%); de esta forma, aunque se logran valores de significancia estadísticas en la comparación de los valores esperados en los diferentes grupos ( $p = 0,011$ ), estos resultados carecen de utilidad para el presente estudio.

### **6.2.3.1 Análisis intragrupos**

Con la finalidad de definir el origen de las diferencias estadísticamente significativas encontradas, se realizó una comparación intragrupos (Tabla 6.9).

La “mucosa normal” muestra diferencias estadísticamente significativas frente al resto de grupos en el CD 133 y p504s; en el caso del TWIST, se logran diferencias significativas frente a la DBG, sin embargo, dados los problemas en la interpretación ya mencionados consideramos estos hallazgos relevantes.

En el caso del “EB sin displasia” (EBS), se observan diferencias significativas respecto a la DBG mediante el empleo del p504s ( $p=0,016$ ). También se logran valores de significancia estadística frente a la DAG y al ACE mediante el CD 133 y p504s.

Los casos con DBG presentaron diferencias estadísticamente significativas en la tinción del CD 133 frente a la DAG y al ACE ( $p=0,013$  y  $<0,001$ , respectivamente). El p504s no consiguió encontrar diferencias al comparar la DBG frente a la DAG y el ACE.

Ninguna de las 3 técnicas IHQ empleadas logró valores de significancia estadística en la comparación de la DAG frente al ACE.

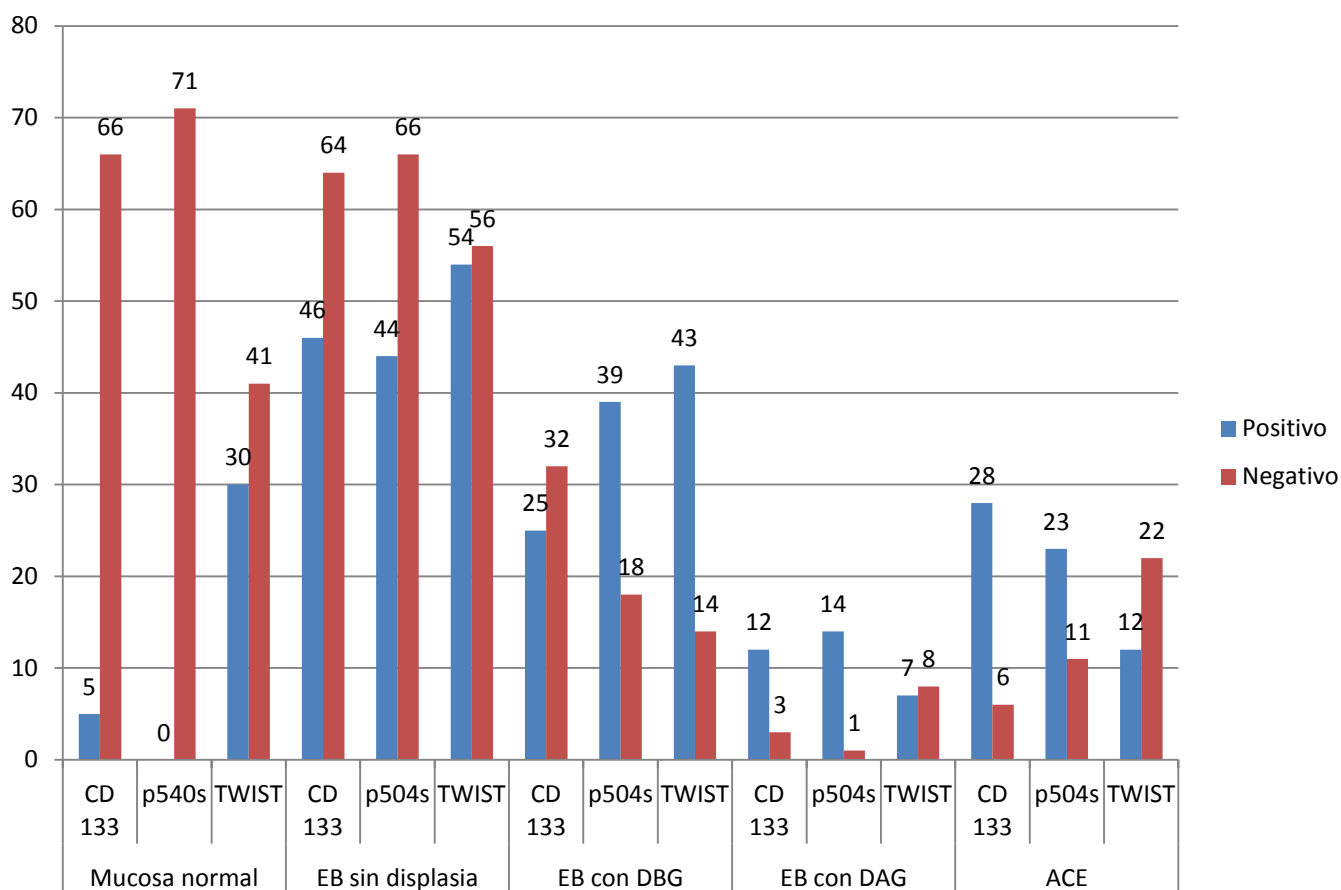


Fig. 6.34. Interpretación de los valores del Q-score de Allred (Negativo/positivo) según la técnica IHQ empleada por grupo de estudio. Los resultados se muestran en números absolutos.

Interpretación IHQ						
	Mucosa normal (%)	EB sin displasia (%)	EB con DBG (%)	EB con DAG (%)	ACE (%)	p
<b>CD 133</b>						
Positivo	5 (7)	46 (41,8)	25 (43,9)	12 (80)	28 (82,4)	<0,001*
Negativo	66 (93)	64 (58,2)	32 (56,1)	3 (20)	6 (17,6)	
<b>p504s</b>						
Positivo	0	44 (40)	39 (68,4)	14 (93,3)	23 (67,6)	<0,001*
Negativo	71 (100)	66 (60)	18	1	11 (32,4)	
<b>TWIST</b>						
Positivo	30 (42,3)	54 (49,1)	43 (75,4)	7 (46,7)	12 (35,3)	0,011*
Negativo	41 (57,7)	56 (50,9)	14	8	22 (64,7)	

Tabla 6.9. Interpretación de los valores del Q-score de Allred considerando como positivos valores >4. \*Estadísticamente significativo (p<0,05).

	Mucosa normal				EBSB			DBG		DAG
	<i>EBSB</i>	<i>DBG</i>	<i>DAG</i>	<i>ACE</i>	<i>DBG</i>	<i>DAG</i>	<i>ACE</i>	<i>DAG</i>	<i>ACE</i>	<i>ACE</i>
<b>CD 133</b>	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,8	0,005*	<0,001*	0,013*	<0,001*	0,845
<b>p504s</b>	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,016*	0,003*	0,005*	0,144	0,445	0,502
<b>TWIST</b>	0,368	0,019	0,107	0,496	0,084	0,034*	0,158	0,003*	0,010*	0,336

**Tabla 6.10.** Interpretación de los valores del Q-score de Allred considerando como positivos valores >4. \*Estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ). EBSB (Esófago de Barrett sin displasia), DBG (displasia de bajo grado), DAG (Displasia de alto grado), ACE (Adenocarcinoma esofágico).

#### 6.2.4 Estudio inmunohistoquímico según propio control

Para esta parte del estudio se incluyeron un total de 27 pacientes sometidos a esofagectomía por ACE durante el periodo de estudio y que nos aportaron un total de 306 muestras. Siendo cada paciente su propio control, se estudiaron las diferencias en las tinciones IHQ de cada una de las zonas histológicas diferenciadas (tejido normal, EBSB, DBG, DAG y ACE). Los resultados se resumen en la tabla 6.11. Se consideraron como “positivas” aquellas tinciones con un Q-Score de Allred >4.

	<i>Mucosa normal</i>	<i>EBSB</i>	<i>DBG</i>	<i>DAG</i>	<i>ACE</i>	<i>p</i>
<b>CD 133</b>						
<i>Positivo (%)</i>	4 (18)	16 (64)	7 (47)	7 (64)	24 (89)	0,001*
<i>Negativo</i>	18	9	8	4	3	
<b>p504s</b>						
<i>Positivo (%)</i>	0 (0)	8 (32)	9 (60)	8 (73)	19 (70)	<0,001*
<i>Negativo</i>	22	17	6	3	8	
<b>TWIST</b>						
<i>Positivo (%)</i>	13 (57)	8 (32)	4 (27)	2 (18)	12 (44)	0,112
<i>Negativo</i>	10	17	11	9	15	

**Tabla 6.11.** Resultado de las diferentes técnicas IHQ en las diferentes zonas histológicas de pacientes sometidos a esofagectomía quirúrgica. En la interpretación de los resultados se considera positivo un Q-Score >4 \*Estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ). EBSB (Esófago de Barrett sin displasia), DBG (displasia de bajo grado), DAG (Displasia de alto grado), ACE (Adenocarcinoma esofágico).

El análisis estadístico pone de relevo diferencias significativas en los grupos en las tinciones CD 133 y p540s (0,001 y <0,001 respectivamente). En el caso del TWIST, no se observaron diferencias entre los diferentes grupos.

Un análisis por subgrupos (tabla 6.12) determina que la tinción de la “mucosa normal” difiere, mediante el CD 133, respecto de los grupos EBSD (0,002) y ACE (<0,001). En el caso del p504s se observan diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos comparados [EBSD (0,014), DBG (0,005), DAG (0,025) y ACE (<0,001)].

En el caso del EBSD, mediante el uso del CD 133, no observamos diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de grupos comparados. Con el p504s se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a la DBG (0,025) y el ACE (0,008).

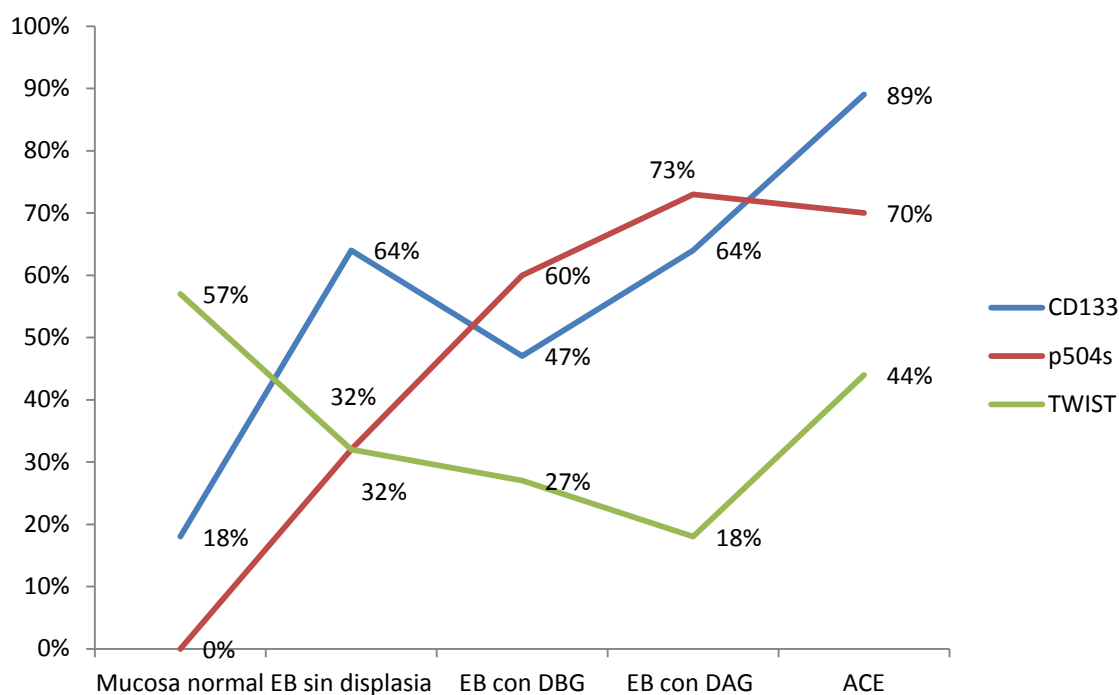
El análisis de la DBG respecto de la DAG no logra un tamaño muestral suficiente para aplicar ningún método estadístico por lo que sólo fue posible compararla respecto del ACE; en este caso, sólo se encontraron diferencias significativas mediante el empleo del CD 133 (0,008). Aunque también se realizó el análisis estadístico del TWIST, como se menciona en la primera parte del estudio, la heterogeneidad de los datos y los posibles errores en la realización de la técnica hacen que estos resultados no sean fiables.

La comparación de la DAG respecto del ACE no obtuvo valores de significancia estadística en ninguna de las tinciones empleadas.

Como se observa en la figura 6.35, mediante el empleo de la Q de Cochran y siendo cada paciente su propio control, se encontraron diferencias en las proporciones de positividad tanto del CD 133 [Q(3)= 22, 292 p<0,001]] como del p504s [Q(3)= 28,091 p<0,001]] a medida que progresan los cambios histológicos en la línea metaplasia-displasia-adenocarcinoma.

	Mucosa normal				EBSB			DBG		DAG
	<i>EBSB</i>	<i>DBG</i>	<i>DAG</i>	<i>ACE</i>	<i>DBG</i>	<i>DAG</i>	<i>ACE</i>	<i>DAG</i>	<i>ACE</i>	<i>ACE</i>
<b>CD 133</b>	0,002*	0,059	0,414	<0,001	0,414	0,655	0,083	NV	0,008*	0,157
<b>p504s</b>	0,014*	0,005*	0,025*	<0,001	0,025*	0,102	0,008*	NV	0,414	0,564
<b>TWIST</b>	0,157	0,059	0,083	0,705	0,655	1	0,257	NV	0,046*	0,564

**Tabla 6.12** Análisis intragrupos de la positividad a las diferentes tinciones IHQ mediante el uso de la Q de Cochran. \*Estadísticamente significativo (p<0,05). EBSB (Esófago de Barrett sin displasia), DBG (displasia de bajo grado), DAG (Displasia de alto grado), ACE (Adenocarcinoma esofágico). NV (No Valorable).



**Fig. 6.35.** Comparación, mediante la Q de Cochran, de la proporción de tinciones positivas en las diferentes técnicas IHQ empleadas a medida que progresan los cambios histológicos en la línea metaplasia-displasia-adenocarcinoma.

## **7 DISCUSIÓN**



## 7.1 Comportamiento del Esófago de Barrett y del Adenocarcinoma esofágico en el Área Hospitalaria Virgen Macarena de Sevilla

### 7.1.2 Incidencia del ACE y del EB

A día de hoy, las enfermedades neoplásicas continúan siendo una causa frecuente de morbi-mortalidad en países desarrollados, quizá sólo por debajo de las enfermedades cardiovasculares como causa de muerte en la población adulta. En este sentido, resultan, por lo menos curiosas, las observaciones realizadas por Simard et al [772] quien, tras revisar el *North American Association of Central Cancer Registry* objetivó un descenso en la prevalencia de la mayoría de los cánceres más frecuentes durante los años 1999-2008, sin embargo, por el contrario, se observó un aumento de siete tipos de cáncer, entre los que se incluían el de páncreas, hígado, tiroides, riñón y el adenocarcinoma de esófago (que no el escamoso). Éste último con un aumento de más de seis veces en las últimas cuatro décadas. Aumento que se corrobora con las observaciones realizadas por otros grupos de trabajo [64,727,744-745].

Si nos remitimos al meta-análisis realizado por Yousef et al [112], en el que se incluyeron 29 estudios realizados desde 1950 hasta el 2006, se puede estimar que la incidencia ACE entre las personas con EB es de 5.3 por 1000 años/persona mientras que si tomamos en cuenta las observaciones de Gilbert et al [773], el EB podría afectar del 1,6 al 6,8% de la población general. Debemos de tomar en cuenta, sin embargo, que las condiciones demográficas y culturales pueden influir en el riesgo de desarrollo de casi cualquier tipo de cáncer, de ahí la importancia de realizar estudios locales que valoren cada uno de los grupos poblaciones de forma individual. Como describe Alcedo et al [64], España se presenta, en el sur de Europa, como el país que más ha visto aumentar la incidencia de EB pasando de una aproximada de 6,5/100 000 habitantes en 1985 al 76,04/100 000 habitantes en 2001. En nuestra serie hemos pasado de tener una tasa de incidencia de EB y ACE de 2,25 y 1,25 por 100 000 habitantes, respectivamente, en 1996 a 6,5 y 4,75, respectivamente, en 2011, si bien, el periodo de

2008 a 2009 muestra una incidencia aún mayor de EB llegando a los 91/100 000 hab. Estos valores representan un aumento de más del 350% en la incidencia de ambas durante los últimos años.

Dada la magnitud observada en el aumento de la incidencia de cáncer de esófago y EB, nos dimos a la tarea de estudiar aquellos factores de riesgo implicados en su desarrollo y evolución. De esta forma, y al igual Corley et al [610], observamos que la mayoría de los casos de ACE fueron diagnosticados *de novo*, es decir, sin mediar antecedente previo de EB. Éste autor, en su serie, observó una incidencia de sólo el 5% de ACE sobre EB previo, en la nuestra, este valor se correspondió al 8% de los casos, dicho de otra manera, en nuestro estudio, el 92% de los casos de ACE no presentaron antecedentes de EB. Esta observación no es de extrañar ya que, en el caso del EB, debemos de entender que tratamos con una condición precancerosa que en la mayoría de los casos es asintomática, de ahí la dificultad de seleccionar grupos de personas, en la población general, que se beneficiarían de programas de screening.

Nosotros creemos que este incremento en la prevalencia e incidencia corresponde a varios factores, en primer lugar, podría ser consecuencia del mayor acceso a medios diagnósticos endoscópicos y a la mejoría de esta tecnología, pero también creemos que pudieran existir otros factores socio-demográficos implicados.

### **7.1.3 Factores de riesgo implicados en la aparición del EB y desarrollo de ACE**

En el caso del ACE y del EB, las últimas dos décadas han dejado numerosos estudios, de todo tipo y tamaño que intentan determinar aquellos factores de riesgo implicados en su desarrollo. Este abordaje resulta especialmente importante ya que, si la modificación de estos factores consiguiera reducir la presencia del ACE en un 10% en la población general, esta acción, por sí sola, sería casi el doble de efectiva que una intervención perfectamente realizada a todos los pacientes con riesgo de malignización sobre un EB.

Existen multitud de publicaciones que han estudiado diversos factores de riesgo implicados en la aparición y progresión tanto del EB como del ACE. Quizá los más amplios y metodológicamente más correctos sean los realizados por el “*Consortio sobre esófago de Barrett y adenocarcinoma esofágico*” (BEACON por su siglas en inglés) [194, 252, 746-757] (Tabla 7.1) En todos estos estudios siguen estando patentes las mismas limitaciones, entre las que se incluyen unos pequeños tamaños de muestra (dada la relativa “rareza” del ACE) y la heterogeneidad en la comparación de los grupos que dificultan asignar valores concretos a cada uno de los factores de riesgo identificados.

Estudio [referencia]	Diseño	País	Resultado estudiado	Periodo de estudio
Population Health Study [222]	Casos y controles	EE.UU.	Cáncer	1986-1989
Larynx, Oesophagus, and Oral Cavity Study [761]	Casos y controles	EE.UU.	Cáncer	1903-1990
United States Multi-Center Study [219]	Casos y controles	EE.UU.	Cáncer	1993-1995
Swedish Oesophageal Cancer Study [228]	Casos y controles	Suecia	Cáncer	1995-1997
United Kingdom Study of Oesophageal Adenocarcinoma in Women [774]	Casos y controles	Reino Unido	Cáncer	1993-1996
Los Angeles County Multi-ethnic Case-Control Study [762]	Casos y controles	EE.UU.	Cáncer	1992-1997
Nebraska Health Study II [775]	Casos y controles	EE.UU.	Cáncer	1988-1993
Nova Scotia Barrett Oesophagus Study [763]	Casos y controles	Canadá	Cáncer	2001-2003
Case-control Australia Cancer 2001e2005 [776]	Casos y controles	Australia	Cáncer	2001-2005
NIH-AARP Diet and Health Study [731]	Cohorte	EE.UU.	Cáncer	1995-2000
Kaiser Permanente Multiphasic Health Checkup Study [777]	Cohorte	EE.UU.	Cáncer	2002-2005
Factors Influencing the Barrett's Adenocarcinoma Relationship Study [135]	Casos y controles	Irlanda	Cáncer/Esófago de Barrett	2002-2004
Epidemiology and Incidence of Barrett's Oesophagus [778]	Casos y controles	EE.UU.	Esófago de Barrett	2002-2005
Study of Reflux Disease [779]	Casos y controles	EE.UU.	Esófago de Barrett	1997-2000
Study of Digestive Health [136]	Casos y controles	Australia	Esófago de Barrett	2003-2006
Cancer Reseach Institute [130]	Multicéntrico	EE.UU.	Esófago de Barrett	2014

Tabla 7.1 Estudios incluidos en el BEACON.

Nuestro trabajo ha presentado limitaciones en cuanto al número de factores de riesgo estudiados implicados en la aparición del EB y su progresión hacia ACE. Al ser un estudio retrospectivo, hemos contado con historias clínicas que reflejan unos datos limitados, además, dado el periodo de estudio, muchos de los pacientes se encontraban fallecidos o ilocalizables al momento de la recogida de datos. A continuación se hace un análisis de los diversos factores que hemos podido rescatar y, por tanto, estudiar.

#### 7.1.3.1 Sexo

En este aspecto, nuestro estudio comparte las observaciones realizadas por la mayoría de autores, entre los que se puede mencionar a Yousef et al [104] quien en su estudio multicéntrico incluye un total de 47 trabajos realizados desde 1950 hasta el 2006. En estos trabajos queda patente la gran incidencia que presenta el sexo masculino respecto al femenino tanto en la aparición de EB como el desarrollo ulterior de ACE, el estudio mencionado otorga una incidencia de ACE sobre EB en hombres, de 10,2/1000 personas-año, mientras que en mujeres rondaba el 4,5/1000 personas-año. Kubo et al [780] en un estudio que incluyó pacientes desde 1973 a 1998 encontró un riesgo de desarrollo de ACE de hasta 8 veces en hombres que en mujeres; más aún, según se describe en el trabajo de Cook et al [781], los hombres no son solo más propensos al desarrollo de EB sino que, una vez que lo tienen, es más probable que éste progrese hacia cáncer.

En nuestro estudio, el 75% de los pacientes con EB fueron hombres mientras que esta proporción se incrementó hasta el 88% en el caso del ACE.

El porqué de esta situación aún es motivo de debate. En la revisión sistemática y meta-análisis realizado por Cook et al [781], se hace un análisis sobre la incidencia de EB, enfermedad por reflujo erosiva (ERE) y no erosiva (ERNE) por sexos. Este estudio, aunque no concluyente en el tema que nos atañe, sí brinda información importante a la hora de intentar responder esta pregunta. En ese estudio se menciona una incidencia mayor en hombres de las 3 situaciones estudiadas (EB, ERE y ERNE) tanto en los

EE.UU como en países europeos; si bien es mayor en los estudios realizados en los EE. UU, lo importante más importante de ese estudio radica en que parece claro que tanto el EB como el ACE son mayores en hombres que en mujeres, independientemente del área geográfica estudiada, situación que nos lleva a pensar que existe algún mecanismo intrínseco al género masculino que le genera mayor predisposición al desarrollo de metaplasia intestinal y, posteriormente, a la aparición de ACE.

Estas teorías han llevado a que, en el año 2005, se publicara un estudio realizado por Lagergren et al [782] que pretendía valorar el papel de los estrógenos como factor protector/riesgo frente al desarrollo de adenocarcinoma esofágico. La hipótesis sobre la que se desarrolló la investigación es que las pacientes con adenocarcinoma (tanto de esófago como de cardias), presentaban algún tipo de alteración hormonal (con afectación particular a los estrógenos), que les confería patrones de fertilidad diferentes. El estudio fue realizado en Suecia y contaba con un grupo control obtenido a partir de una muestra aleatoria de la población general. El análisis de los datos no encontró diferencias significativas, ni la paridad confería riesgo/beneficio ni el número de partos o la edad a la que se tuvieron tuvo ninguna asociación con el riesgo de desarrollo de adenocarcinoma. Una observación adicional y que también merece la pena destacar es que las pacientes en el grupo de “casos” presentaban mayor incidencia de síntomas de reflujo, mayor sobrepeso (IMC >25 kg/m<sup>2</sup>sc) y mayores índices de consumo tabáquico. Sin embargo, como es habitual, no hay nada concluyente a este respecto toda vez que la rareza de cáncer de esófago en las mujeres hace que realizar un estudio epidemiológico sea virtualmente imposible. Más aún, si nos remitimos al estudio de Cheng et al [774] en el que la lactancia confería una disminución del 60% en el desarrollo de ACE, se puede decir que la última palabra, en lo que respecta al papel de las hormonas sexuales en el desarrollo del cáncer de esófago, aún no ha sido dicha.

Por tanto, se puede decir que en lo que respecta al sexo, los hombres son, con diferencia, el sexo más frecuentemente afectado tanto en el caso del EB como del ACE independientemente del área geográfica estudiada. A este respecto, no se ha demostrado que las hormonas sexuales sean un factor protector, pero tampoco existen estudios que lo descarten por completo. Lo que sí parece claro es que existen otros factores que, juntos, pudieran actuar como catalizadores de una condición intrínseca al género masculino, entre los que se pueden destacar la enfermedad por reflujo gastroesofágico, la obesidad central (patrón característico del sexo masculino) así como unos hábitos alimenticios con predominio de carnes rojas frente al consumo de frutas y verduras.

#### 7.1.3.2 Edad

Determinar el riesgo que entraña la edad, en el desarrollo de una enfermedad asintomática como es el caso del EB resulta una situación, por lo menos, difícil. Si consideramos los resultados de Corley et al [76] en uno de los mayores estudios a este respecto realizados en la comunidad, donde se incluyó la de la base de datos del *Kaiser Permanent, Northern California* (KPNC) durante los años 1994-2007, veremos que casi todos los datos con los que contamos a este respecto son obtenidos de forma indirecta, a través de las diversas bases de datos de los servicios de Endoscopia, principalmente. En el estudio de Corley la incidencia de EB ajustada al volumen de endoscopias realizadas fue de 7/100 000 años/persona para la franja de edad de los 21-30 años (la más baja observada), incrementándose paulatinamente alcanzando su máximo en la franja de edad de los 61-70 años (31/100 000 años-persona). En nuestro estudio, ésta franja de mayor incidencia de EB se adelanta en casi una década, con una TI de los 50 a los 59 años de 20/100 000 años-persona mientras que, en el caso del ACE, su pico de mayor incidencia se produce 20 años después, en la franja de los 70-79 años con una TI de 6,5/100 000 años persona.

El porqué de la mayor incidencia entre la 5<sup>a</sup>-6<sup>a</sup> década de la vida se podría explicar por diferentes factores, el primero de ellos y que parece más importante, es el efecto acumulativo del daño ocasionado por los ácidos/bases gástricas y biliares sobre la mucosa esofágica en la ERGE que, eventualmente, conducen a su metaplasia como mecanismo de defensa, sin embargo, esta hipótesis resulta difícil de comprobar dada la ausencia de métodos de screening en la población general y el hecho de tratar con una enfermedad asintomática que ha impedido, hasta la fecha, la realización de estudios de vigilancia en la población general. Si consideramos nuevamente las observaciones de Corley et al [76], nos daremos cuenta de que una de las mayores fortalezas de su estudio es el ajustar la TI en función del volumen de endoscopias realizadas, esto es, eliminar el factor de confusión que trae el hecho de que, a mayor número de endoscopias, se podría esperar una mayor incidencia de EB. En este estudio, además de lo ya descrito, se observa que precisamente la franja de edad con mayor incidencia de EB (de los 60 a los 70 años) es, a la par, la que mayor número de endoscopias ha demandado. Estos resultados son similares a los que nosotros hemos obtenido, donde la mayor incidencia de EB se corresponde a la franja de edad de los 50-59 años mientras que la de ACE se sitúa en los 70-79 años. Resulta pues, muy probable, que la aparición de EB se produzca en franjas de edad más jóvenes (como lo comprobamos en nuestro estudio con un pico de incidencia que se adelanta una década respecto a la observación del referido autor), incluso no sería de extrañar que la aparición real de la metaplasia se produzca incluso en personas menores de 50 años, población que, por su relativa juventud, no suele ser la que más inquietud presenta en cuanto a la realización de pruebas diagnósticas y, por ende, pasan desapercibidos hasta edades más avanzadas.

Otra observación que resulta de interés en nuestro estudio es el análisis del comportamiento histológico según los diferentes grupos de edad. De esta forma hemos podido comprobar que, a medida que la población es más añosa, aumenta el número de casos con cambios histológicos progresivos, hasta alcanzar un pico de incidencia

máximo en los 60-69 años que se mantiene relativamente alto, hasta la década siguiente. Llama la atención que este patrón ascendente es bastante parecido al que observamos en el caso del ACE, situación que nos reafirma el papel de la edad, por sí misma, como factor de riesgo tanto para el desarrollo de displasia como de cáncer de esófago.

Si hay algo que es prácticamente una constante en los estudios sobre epidemiología del EB, es el aumento progresivo de su incidencia de forma directamente proporcional a la edad. Sin embargo, debemos de ser conscientes que, al envejecer, además del factor carcinogénico *per se* del envejecimiento celular, también se adquieren otros hábitos, tanto o incluso más perjudiciales que la edad por sí misma. Si tomamos como referencia la Encuesta Nacional de Salud de España, publicada por el Ministerio de Sanidad, Igualdad y Políticas sociales [783], veremos que es precisamente la franja de edad de los 50-60 años la que presenta uno de los mayores porcentajes en cuanto a consumo de tabaco se refiere (en torno al 34% de los hombres y el 30% de las mujeres), si bien es verdad que, afortunadamente, desde 1993 al 2012, el porcentaje de población que consume tabaco a diario muestra un continuo descenso, fundamentalmente a expensas de un descenso en el consumo del sexo masculino. Otro dato que arroja esta Encuesta es el hecho de que la obesidad (otro factor implicado en la aparición del EB), ha aumentado del 7,4% al 17% en los últimos 25 años, siendo el sexo masculino el mayormente afectado (aproximadamente un 18% de la población masculina, mayor de edad, padece obesidad con un IMC  $>30 \text{ kg/m}^2$ sc), porcentaje que aumenta de forma directamente proporcional a la edad hasta disminuir en torno a los 74 años.

Por tanto, parece prudente considerar que, en lo que respecta a la edad como FR, se puede decir que el EB afecta a segmentos de la población relativamente jóvenes y que aumenta hasta alcanzar su pico de incidencia máxima en torno a los 50-60 años. Esta observación, aunque no plenamente estudiada, puede corresponder a una verdadera alta incidencia en esta franja de edad, aunque hasta la fecha no se puede



descartar que la aparición “real” de la metaplasia se produzca en poblaciones aún más jóvenes, clásicamente reacias a la realización de estudios de control y otras pruebas complementarias. Como explicación, tomamos como base el factor de la edad sobre el envejecimiento celular al que se añadiría la agresión crónica que la ERGE produciría sobre el epitelio esofágico; a esto tendríamos que sumar la aparición, con la edad, de otros malos hábitos higiénico dietéticos que actuarían como FR asociados, tal es el caso del consumo de tabaco o la obesidad, de predominio central, y cuya incidencia, como se ha visto, también aumentan con la edad de forma casi paralela al aumento observado en la incidencia tanto para el EB como para el ACE.

### 7.1.3.3 Obesidad

Debido a las limitaciones en la recogida de datos de nuestro estudio, que derivaron en un pequeño tamaño muestral, no nos fue posible realizar un análisis estadístico de diferentes aspectos sociodemográficos que consideramos importantes, uno de ellos, el de incidencia de obesidad/sobrepeso. Sin embargo, sí podemos mencionar, de forma descriptiva, nuestros resultados. En estos vemos que los pacientes con EB y displasia presentaron un IMC más alto ( $28 \text{ kg/m}^2\text{sc}$ ) respecto al EBSD ( $25,11 \text{ kg/m}^2\text{sc}$ ) y al ACE ( $23,6 \text{ kg/m}^2\text{sc}$ ). Esta observación, aunque muy sesgada por la pobre recogida de datos en nuestro estudio, comparte los hallazgos observados por Cook et al [191] en su revisión sistemática y meta-análisis sobre la adiposidad como FR en el desarrollo de EB.

Quizá sea este estudio, el de Cook et al, el que nos aporta no solo la mejor información sino que sus conclusiones parecen coherentes con la realidad que nosotros, en nuestro estudio, también hemos objetivado. En su estudio realiza una revisión sistemática de lo publicado a nivel internacional sobre el papel de la “adiposidad” en el riesgo de desarrollo de EB. Una observación que nos impacta, nada más empezar a leer su trabajo, es la gran cantidad de estudios sobre el EB y la poca

cantidad de ellos que cumplen criterios de calidad y recogida de datos respecto al peso. En su estudio, de un total de 295 estudios, solo 10 cumplieron criterios de inclusión. En este estudio la OR fue de 0.99 por  $\text{kg}/\text{m}^2\text{sc}$ , si comparamos EB con ERGE y de 1.02 por  $\text{kg}/\text{m}^2\text{sc}$ , esto es significa que el riesgo atribuido clásicamente a la adiposidad es, quizá, menor de lo que se esperaba, lo cual lo hace un FR poco predictivo respecto a qué pacientes desarrollarán EB y, subsecuentemente, displasia-ACE.

La observación de Cook et al ha sido refrendada por el trabajo realizado por Kubo et al [192] sobre pacientes con ACE y de adenocarcinoma de cardias. En su estudio estos autores, al igual que Cook, realizan una revisión sistemática que les conduce a un total de 14 estudios (2 de cohorte y 12 de casos/controles) aportando un total de 2 488 casos de ACE y 2 509 de cardias. En su estudio, observaron que los pacientes con  $\text{IMC} >25 \text{ kg}/\text{m}^2\text{sc}$  presentaban un riesgo aumentado tanto para ACE (OR 2,2 en hombres y 2.0 en mujeres) como para cáncer de cardias (OR 1,5). Siendo la población más sensible la masculina, mientras que el ser hombre la incrementaba 1.8 veces (es decir, casi el doble), el ser hombre, y además obeso lo elevaba hasta 2,4.

Si bien queda claro de que la obesidad es un FR para multitud de enfermedades, entre ellas el EB, para ésta última, más que el peso en sí, depende la distribución de esa "adiposidad". En este sentido, un trabajo que merece la pena destacar, es el de Vaughan et al [784] realizado por el *Seattle Barrett's Esophagus Program*. En este estudio, transversal y que incluyó a 459 personas, se investigaron diversos parámetros entre los que se incluyeron el consumo de AINE's, el IMC y valores antropométricos (índice cadera-cintura) en relación con la genética y alteraciones por citometría de flujo. Sus hallazgos fueron bastante relevantes y sus afirmaciones contundentes "existen alteraciones tanto histológicas, genéticas y citométricas en pacientes con adiposidad centroabdominal, pero no con un IMC elevado", es decir, el riesgo atribuido a la adiposidad se centraba en la obesidad central (índice cadera-cintura  $<1$ ) patrón mayormente observado en la población masculina.

El porqué la obesidad/sobrepeso con un índice cadera-cintura altos son FR para el desarrollo de EB y ACE continúa en estudio. Si bien, como se ha comentado en la introducción, hasta la fecha siempre se han propuesto teorías sobre el papel mecánico de la obesidad en la génesis y agravamiento de la ERGE, hoy día existen otros trabajos que involucran a la biología molecular en su génesis.

Actualmente siguen publicándose trabajos sobre el porqué los pacientes con obesidad presentan un mayor riesgo de EB y ACE. Una de las líneas de estudio que parece más prometedora involucra a la leptina y grelina. Si bien Kendall et al [199] en su trabajo encuentran que los hombres, que no las mujeres, que presentaron niveles elevados de leptina en sangre presentaban un mayor riesgo de EB (OR 4,6), el estudio recientemente publicado por Thomas et al [785] hecha en tierra esta observación; en su investigación, son los niveles aumentados de grelina los que confieren mayor riesgo de EB y, lo que es más, los niveles de leptina se relacionan de forma inversa a la presencia de EB.

Nosotros creemos, al igual que Cook et al, que en lo que respecta a la obesidad como FR de EB y ACE, son una serie de factores los que convergen para incrementar el riesgo en esta población. Como se ha mencionado en el apartado de la edad y acorde a la Encuesta Nacional de Salud, la población con sobrepeso-obesidad también es la población más añosa, quizá con unos peores hábitos alimenticios e higiénicos, diabéticos muchos de ellos o, al menos, con resistencia a la insulina, otra de las líneas de investigación en desarrollo y que como menciona Yu et al [206] en su trabajo, ya se ha mostrado relacionada con otros tipos de cáncer (mama, próstata, pulmón, colon y recto).

#### **7.1.3.4 Consumo de alcohol y tabaco**

El análisis de otros factores de riesgo tales como consumo de alcohol o tabaco se ha visto limitado en nuestro estudio al no ser posible obtener este dato en un gran número de pacientes, particularmente en aquellos con displasia y ACE. Pese a los

pocos resultados, hemos observado que los pacientes con EB no consumen alcohol con niveles de significancia estadística respecto al ACE ( $p < 0,001$ ); cuando lo comparamos según su comportamiento histológico, observamos un mayor número de pacientes consumidores de alcohol en el grupo ACE respecto al EB sin displasia y con displasia estable. Esta observación, aunque cargada de sesgos, podría conferir al alcohol un FR en cuanto a la progresión de displasia y su posterior degeneración cancerígena. Nuestro estudio comparte los resultados obtenidos por Veugelers et al [763], respecto al alcohol como FR asociado a la progresión del EB, sin embargo, discrepa de observaciones más recientes realizadas por Thrift et al [130]. En su estudio, éste último autor, tras revisar la base de datos del Consorcio BEACON, que incluye más de 3000 pacientes y compararlo con controles, respecto al consumo de alcohol, encontró incluso que niveles bajos de consumo diario (3-5 bebidas alcohólicas de baja graduación) son protectoras frente al EB (OR 0,57), mientras que consumos mayores no parecen más relacionados con la aparición/ausencia ni de EB ó ACE. Nosotros creemos que este estudio, al igual que todos los a este respecto publicados, deben ser tomados con cautela ya que, como nosotros hemos comprobado en el nuestro (donde sólo pudimos recabar resultados del 36,5% de los pacientes con EB y del 24,2% con ACE), los resultados con los que cuentan la mayoría de investigadores son escasos, heterogéneos y sujetos a muchos sesgos.

En lo que respecta al consumo de tabaco, sí que existe evidencia sobre su potencial cancerígeno asociado al EB. A este respecto, merece la pena mencionar el estudio realizado por Cook et al [786] quien, tras analizar 5 estudios de casos-contróles realizados por el Consorcio Internacional sobre Esófago de Barrett y adenocarcinoma esofágico. En este estudio, se observa una relación directamente proporcional entre el consumo de tabaco y la incidencia de EB cuya pendiente ascendente alcanza su meseta en el consumo de 20 paquetes/año. Entre sus resultados destaca que ésta incidencia aumentada de EB es paralela a la observada para ERGE, lo cual, a criterio de los autores, y de nosotros igualmente, podría indicar que el tabaco ejercería su

efecto lesivo tanto de forma directa como indirecta al inducir el RGE. Esta observación se corresponde con lo descrito en otras publicaciones [219, 222, 758-763]. Sin embargo, en nuestro estudio y quizá debido al pequeño tamaño muestral, no hemos observado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio.

### 7.1.3.5 Longitud del Esófago de Barrett

En lo que respecta a la longitud del esófago de Barrett (Corto vs Largo) y la relación con su comportamiento histológico, en nuestro estudio hemos observado que aquellos con EB corto (<3 cms) tienen un comportamiento histológico más benigno; la mayor proporción de ellos no desarrolla displasia y, de desarrollarla, permanece estable.

El identificar la extensión del Barrett como factor de riesgo asociado al desarrollo de displasia y ACE no es tarea fácil dado que casi todas las series con las que contamos hasta el momento son heterogéneas y mezclan resultados. A este respecto, merece la pena destacar el estudio realizado por Anaparthi et al [787] en el que selecciona casos de EB sin displasia en un estudio multicéntrico que incluyó pacientes de 3 hospitales norteamericanos de 3er nivel. Entre sus resultados, que analizan un total de 1175 pacientes, se observa que los pacientes con EB >3 cms muestran un riesgo de desarrollo de DAG ó ACE del 28% por cada centímetro adicional. Nuestro estudio comparte esta observación ya que, mientras que el 78% de los casos con EBSD presentaron una longitud del Barrett de <3 cms, el grupo con cambios histológicos más agresivos y degeneración-progresión displásica mantenida presentaron, en el 55% de los casos, una longitud del Barrett mayor de 3 cms.

Quizá la longitud del EB sea una de las que mayor consenso genera en cuanto a su potencial FR en el desarrollo de cambios displásicos y evolución posterior a ACE. Como recoge Rugge et al en su estudio [788] y que se enfoca en el estudio de la

población italiana, bastante similar a la española en cuanto a situación geográfica, clima y hábitos higiénico-dietéticos, la longitud de Barrett presenta un riesgo relativo (RR) de 1,1, lo que significa que éste solo hallazgo ya confiere un potencial de progresión del Barrett. Este autor como otros tantos, incluso nosotros mismos, creemos que es la suma de varios factores de riesgo aislados lo que dibuja el panorama actual del EB y su población más frecuentemente afectada, esto es, varones, de entre 50-60 años, fumadores y quizá bebedores habituales, con sobrepeso y ERGE y que, en sus estudios de extensión, presentan un EB mayor de 3 cms. Es a esta población a la que deben dirigirse nuestros mayores esfuerzos en cuanto a diagnóstico y tratamiento precoz se refiere.

#### 7.1.3.6 Morbilidad, mortalidad y supervivencia

Como era de esperar, la supervivencia del grupo ACE fue menor respecto a los demás grupos con una media de 23 meses, sin embargo, algo que no era, *a priori* esperable es que la mayor supervivencia la encontramos en los pacientes con progresión de la displasia mientras que la mayor mortalidad, exceptuando el grupo de ACE, lo presenta el EB con displasia estable. Este resultado, aunque parecería contradictorio en un principio, queda explicado al analizar la población en cada uno de los grupos así como las diferentes causas de defunción. De esta forma observamos que, aunque fallecieron un mayor número de pacientes en el grupo de EB sin displasia (25%), es precisamente éste grupo el de mayor edad (media de 59 años), el de IMC más alto (en torno a 28 kg/m<sup>2</sup>sc) lo cual viene en relación casi directa a las causas de defunción, esto es, ninguna a consecuencia de la enfermedad esofágica y sí como consecuencia de otras comorbilidades, altamente dependientes de los factores de riesgo cardiovascular, la cardiopatía isquémica y la insuficiencia cardiaca descompensada. El porcentaje de defunciones cuando los pacientes no presentaban displasia se mantuvo relativamente bajo (3,3%). Estos resultados avalan las

observaciones realizadas por otros grupos de estudio [764-766] en relación a que los pacientes con EB son bastantes parecidos a la población general, esto es, que son los factores de riesgo cardiovascular los principales condicionantes de su supervivencia.

Un hecho a destacar es que, de los cuarenta pacientes en los que la displasia progresó, apareció ACE en 8 casos, todos ellos en periodos relativamente cortos de tiempo (15-60 meses), en cinco de los casos se pasó directamente de EBSD hacia ACE, esto es, sin mediar biopsias sugestivas de displasia. Sólo encontramos antecedente de displasia en tres casos que progresaron a ACE. El porqué de este hallazgo se puede explicar por varios factores, quizá el más importante sea el debido a un muestreo inadecuado, biopsias insuficientes o interpretaciones histopatológicas equivocadas; o una combinación de todas ellas. Al ser nuestro estudio retrospectivo adolecemos de información adicional, lo que sí queda claro es que, de haberse detectado a tiempo, cerca del 10% de los casos totales de ACE en nuestra población hubieran podido, al menos teóricamente, ser evitados o tratados precozmente.

Nuestro estudio también avala la observación realizada por otros autores [767-771] de que la mayoría de los pacientes con diagnóstico de ACE no muestran antecedentes previos de EB (en nuestro caso este porcentaje alcanzó el 92% de los casos).

En resumen, en nuestro estudio hemos observado una mayor incidencia y prevalencia tanto del esófago de Barrett como del ACE en los últimos años. Como factores de riesgo encontramos el sexo masculino tanto para el desarrollo de EB como de ACE. Una mayor edad así como el consumo de alcohol se relacionan en mayor proporción a la presencia de ACE. El esófago de Barrett largo (>3 cms) ha sido el único factor que hemos encontrado implicado en la progresión del EB. La enfermedad cardiovascular y neoplásica no esofágica han sido los principales condicionantes de la mortalidad en los pacientes con EB. El diagnóstico de ACE, en nuestra área sanitaria en el periodo de tiempo estudiado ha sido, en prácticamente la totalidad de los casos, con debut de la enfermedad neoplásica.

Dada la ausencia de factores fiables que nos ayuden a predecir aquellos pacientes con riesgo de progresión de la displasia además de que, en la mayoría de los casos, esta permanece estable y no condiciona claramente la supervivencia, creímos conveniente el desarrollo de algún otro método que nos ayude a seleccionar aquellos pacientes que se beneficiarían de un seguimiento más estrecho a fin de evitar gestos y gastos innecesarios. Por este motivo, tras éste análisis inicial, decidimos realizar lo que corresponde a la segunda parte de la presente tesis doctoral.



## 7.2 Papel de los biomarcadores CD 133, TWIST y P504S en la valoración de la progresión del Esófago de Barrett

Como ha quedado patente en nuestro estudio y en numerosas investigaciones a nivel mundial, el adenocarcinoma de esófago es, de forma alarmante, una causa cada vez más frecuente de muerte en países desarrollados, con un patrón en ascenso principalmente en los últimos años. La mayoría de pacientes se diagnostican en estadios avanzados y no pueden beneficiarse, en la mayoría de los casos, de una cirugía curativa. Las tasas de supervivencia a los 5 años continúan siendo muy bajas, a pesar de los avances en las técnicas quirúrgicas y en los tratamientos quimioterápicos. En la lucha contra esta enfermedad, resulta de particular importancia la identificación de uno de los precursores más frecuentemente implicados, esto es, el Esófago de Barrett. Es por esto que investigadores y clínicos debemos desarrollar aquellos métodos que contribuyan al mejorar el conocimiento sobre la biología molecular del cáncer, su diagnóstico precoz, los marcadores que nos ayuden a predecir una evolución más agresiva para, finalmente, conseguir terapias más eficaces que mejoren sus supervivencia.

### 7.2.2 CD 133 como marcador de células madre

Desde que, en el año 1997, Yin et al [789] describieran que el antígeno CD 133 estaba presente en las células madre hematopoyéticas CD 34+, CD 133 se ha convertido en un marcador molecular para la identificación y separación de células madre. Estas células madre CD 133/CD 34 han mostrado un importante papel en cuanto a su alto poder de clonogenicidad se refiere siendo las CD 133 (+), según el trabajo de Gallecher et al [790], las únicas capaces de formar células CD 34+. Esto ha llevado a pensar que este tipo de células, las CD 133+, pertenecen a una línea de desarrollo celular primitiva y, por tanto, muy poco inmunogénica. Esta observación fue corroborada en el 2005 por Bitan M et al [791] al lograr trasplantar células CD 133+, de

cinco donantes no compatibles, sin observar reacciones letales agudas, crónicas ni desarrollo de lesiones injerto contra huésped.

Al igual que otras proteínas de superficie celular, CD 133 ha sido descrito en otros campos celulares distintos al sistema hematológico y que incluyen células precursoras endoteliales [792], células madre cerebrales fetales [793], células endoteliales embrionarias [794], células madre epiteliales prostáticas [795] y células musculares [796].

#### **7.2.2.1 CD 133 como marcador de células madre tumorales**

La primera descripción sobre el uso de CD 133 como marcador de células madre tumorales (CMT) correspondió a Singh et al [797] en el año 2003. En su trabajo, estos autores demostraron que las células que presentaban éste marcador de su superficie mostraban una mayor capacidad de proliferación, autorregulación así como diferenciación celular y, lo que es más, parecían ser las células primitivas a partir de las cuales se generaba la línea celular que finalmente derivaba en los tumores cerebrales. A estas investigaciones han seguido otras que nos han permitido conocer que éstas células CD 133 positivas no sólo se encuentran en tumores cerebrales, sino también, como menciona Olempska et al [798] y confirma Hermann et al [799], en tumores pancreáticos, en tumores hepáticos [800] y de colon [801].

#### **7.2.2.2 Detección de células madre en el Esófago de Barrett mediante el análisis inmunohistoquímico de CD 133**

Hasta la fecha, como se ha mencionado anteriormente, en lo que respecta al CD 133 en el EB, sólo se ha publicado un estudio por el grupo de Ahmad J et al [594]. Se trata de un estudio retrospectivo que no profundiza sobre el papel de las células madre tumorales en el origen del EB; sin embargo, sus hallazgos sí que son relevantes en varios sentidos, no sólo por el hallazgo de CD 133 en células precursoras de la

metaplasia intestinal sino también por el papel que podría tener este marcador como factor pronóstico de malignización del Barrett.

Tomando en cuenta estos antecedentes, en el diseño de nuestra investigación decidimos incluir este marcador como parte de la batería de estudios inmunohistoquímicos a los que someter nuestras muestras de epitelio de Barrett y adenocarcinoma esofágico.

En nuestro estudio, que incluyó un total de 287 pacientes (71 controles con "mucosa normal", 182 con EB y 34 con ACE) observamos un patrón característico de tinción luminal, de predominio en la base de las glándulas submucosas. Una cosa que nos llamó particularmente la atención es que, pese a que las glándulas submucosas existen en el epitelio esofágico normal, la tinción del CD 133 en estos casos fue negativa en el 93% de los casos y va aumentando gradualmente a medida que aparece el EB y progresan los cambios displásicos, siendo positiva en el 82% de los casos de ACE.

El hallazgo de inmunorreacción positiva en las glándulas submucosas y en el recorrido de los canalículos de drenaje mucoso hacia la luz esofágica, en pacientes con EB, va en la línea de los hallazgos descritos por Ahmad J et al [594] y otros autores [802-803] en el sentido de que podría ser el origen del EB. Según esta hipótesis, los pacientes con ERGE y/o predisposición genética, sufren un daño crónico continuo sobre el epitelio esofágico escamoso normal, al cabo del tiempo (no está claro el cuando ocurre), este epitelio escamoso es eliminado y la superficie expuesta es reemplazada por un tejido de tipo intestinal, más resistente al daño continuo ocasionado por los irritantes externos. Nuestras observaciones nos llevan a pensar que este daño se extiende, en algún momento, hacia las glándulas submucosas, siendo estas las que, mediante un proceso de migración de células madre a través de los canalículos de drenaje mucoso, repoblarían el tejido expuesto y generarían la línea celular tipo intestinal característica del Esófago de Barrett.

### 7.2.3 P504s (alfa-metil-coenzima A racemasa) en el Esófago de Barrett

Como se ha mencionado en la introducción, el uso de la p504s (alfa-metil-coenzima A racemasa) ha estado clásicamente ligado al cáncer de próstata y, más recientemente, al de colon. No es hasta el año 2006 en el que Lisovsky et al [577] publican un estudio en el que se describe como posible marcador de displasia, observación que refrenda Nassar et al [553] en ese mismo año. Tras estas primeras investigaciones, otras han ido surgiendo al cabo del tiempo, sin embargo, aún son pocas como para tener resultados concluyentes. Quizá una de las más extensas y que resulta, a la par, de las más recientes, sea la realizada por Kastelein et al [581] en el año 2013. En su estudio, tipo casos y controles, incluye 635 pacientes que aportan un total de 12 127 biopsias para su estudio mediante ésta técnica (p504s). Se concluye pues, que aquellos casos que presentan una tinción moderada presentan un RR de progresión neoplásica de 1,6, mientras que, si la tinción es intensa, este riesgo se incrementa hasta el 4,8. También merece la pena decir que la sola tinción inmunohistoquímica es menos útil que la observación de displasia de bajo grado, en cuanto a predecir el riesgo de progresión neoplásica del Barrett se refiere.

Cabe mencionar que, aunque se ha establecido y corroborado por estudios de microarray de DNAC de alto rendimiento [804], que la p504s participa en la beta oxidación de ácidos grasos de cadena ramificada y de derivados de ácidos grasos, no está claro, desde el punto de vista molecular, el porqué esta tinción es positiva en células tumorales y menos aún, en el epitelio de Barrett.

En nuestro estudio no hemos observado ningún caso de epitelio escamoso normal positivo mientras que, en el caso del EB, esta tinción presentó un patrón citoplasmático granular parcheado que tendía a circunscribirse a la base de la glándula. En el Barrett sin displasia estos cambios afectaban zonas aisladas mientras que, en los casos de displasia y ACE, estos cambios, aunque igualmente parcheados, afectaban a amplios segmentos de la longitud glandular.

#### 7.2.4 TWIST como marcador de metástasis precoces y su papel en el Esófago de Barrett

En lo que respecta a la utilidad clínica del TWIST, la evidencia con la que contamos hasta el momento es relativamente escasa por lo reciente de su uso en la práctica médica habitual. No es sino hasta el año 1987 que Thisse B et al [805] identifican su secuencia genética en embriones de *Drosophila*, estando el TWIST aparentemente involucrado en la diferenciación del mesodermo y del patrón dorsoventral de éste insecto.

Hasta ahora las mayores investigaciones sobre el papel de este marcador han estado enfocadas al cáncer de mama donde, según Yang et al [596] es un inductor directo de metástasis, particularmente las pulmonares al inhibir la adhesión celular dependiente de E-caderina, activando, de ésta manera, marcadores mesenquimales que inducen la movilidad celular que finalmente resultará en metástasis a distancia. También se ha estudiado su papel en otras estirpes tumorales, donde parece predecir un comportamiento metastásico precoz que lo sitúa como un posible marcador de mal pronóstico.

En lo que respecta a estudios sobre su utilidad en cáncer del sistema digestivo superior, la evidencia con la que contamos hasta la fecha es escasa. La primera descripción sobre su utilidad en el cáncer esofágico escamoso corresponde a Yuen HF et al [602]; en su trabajo, que estudió, de forma prospectiva, 87 casos de carcinoma escamoso de esófago, observó que aquellos que tenían, mediante análisis de mRNA, niveles elevados de TWIST, presentaban un riesgo muy elevado de desarrollar metástasis a distancia al año de seguimiento (OR 3,462). Esta observación ha sido avalada por otros investigadores [806], quienes, como en el caso de Xie F et al [807] le confieren a éste marcador un factor de riesgo independiente, incluso mayor que cualquier otro identificado hasta el momento, en el desarrollo de metástasis, en el caso del carcinoma esofágico escamoso.

Sobre su papel en el cáncer gástrico la evidencia, si cabe, es aún más escasa. Destaca el primer trabajo publicado hasta el momento de la mano de Ru GQ et al [808] quien estudia su utilidad en 47 casos de pacientes sometidos a gastrectomía por carcinoma gástrico. Éste autor identifica, como factores de riesgo independientes la profundidad de la invasión tumoral, las metástasis linfáticas, el estadio TNM así como la presencia de un marcador TWIST positivo. Una observación que destaca el autor es el alto grado de metástasis que presentaron los pacientes con marcador TWIST positivo; lo cual deriva en considerarlo un marcador importante de mal pronóstico. Otras investigaciones, también sobre el carcinoma gástrico, han hipotetizado que este comportamiento metastásico precoz, en los casos TWIST positivo, se deba a que éste induce la expresión del receptor de crecimiento derivado de los fibroblastos [809].

Sobre el papel del TWIST en el esófago de Barrett y el adenocarcinoma esofágico sólo hemos encontrado un artículo ya previamente discutido en este trabajo [594]. En su estudio, Ahmad encuentra que, mientras que éste marcador es positivo en el 1% de los casos de EB sin displasia, el porcentaje aumenta al 3% en los casos de displasia de bajo grado y hasta el 48% en los casos de ACE; si bien hay que hacer notar que el número de casos es escaso (25 por grupos) como para sacar conclusiones absolutas. Si nuestros resultados, con el uso de ésta técnica, sirven para algo, son para, al igual que el autor refleja en su trabajo, corroborar la gran complejidad técnica que entraña el uso de esta tinción inmunohistoquímica. Al igual que nosotros, Ahmad observó que la tinción del TWIST en el caso del EB y de ACE es muy inespecífica ya que si bien tiñe los núcleos celulares, también tiende a teñir células fusiformes, inflamatorias, fibroblastos y el estroma desmoplásico. Nuestros resultados resultan contradictorios al encontrar más casos con tinciones positivas en el grupo EB sin displasia que en el grupo ACE lo que resta valor a cualquier intento de interpretación de los mismos. Nosotros creemos que, al igual que Ahmad, ésta técnica presenta serias dudas sobre su utilidad y aplicabilidad en la práctica clínica habitual, si bien, a nivel experimental y en centros investigadores especializados tiene potencial de desarrollo.

### 7.2.5 Expresión de CD 133, p504s y TWIST en la valoración de la progresión del Esófago de Barrett

Debido a la dificultad para encontrar marcadores inmunohistoquímicos precisos, aunado a la poca evidencia que existe a la fecha sobre su utilidad en el esófago de Barrett y ACE, parece lógico pensar que utilizar más de un marcador y dirigirlos a diversas dianas en la historia natural de ésta enfermedad, podría resultar clarificador.

Como ya hemos comentado previamente, existen varios trabajos que evalúan el papel de los marcadores de células madre tipo CD 133, Ki97, ALDH1 entre otros, en diversos tipos de cáncer. También encontramos marcadores de células tumorales, sobre todo en cáncer de próstata tipo p504s y marcadores de metástasis precoces del tipo TWIST en cáncer esofágico escamoso y carcinoma gástrico.

Nuestro trabajo ha intentado evaluar la historia natural del EB mediante tres enfoques distintos, esto es, evaluando su origen a través de la CD 133, identificando marcadores de membrana sugestivos de células con transformación neoplásica, mediante el p504s y, finalmente, valorando el papel del TWIST en el desarrollo de metástasis precoces.

Como se describe en el apartado resultados, nuestras observaciones indican que, a medida que progresan los cambios histológicos del Barrett hacia la displasia, estos cambios se acompañan de alteraciones en la expresión de los marcadores CD 133 y p504s; no así del TWIST que por dificultades técnicas no ha aportado datos fiables. De esta forma, hemos observado que el epitelio esofágico escamoso normal, expresa de forma muy débil y escasa (apenas el 7%), el CD 133 mientras que en el 100% de los casos es negativo a p504s. En lo que respecta a su uso como identificador de displasia, hemos observado que p504s es positivo en un mayor número de casos de EB con displasia que sin displasia; ésta diferencia alcanza valores de significancia estadística ( $p=0,002$ ), también es más positiva en los casos de ACE que en el esófago de Barrett sin displasia, igualmente con valores estadísticamente significativos

( $p < 0,001$ ). En el caso del CD 133, observamos que era positivo en un mayor número de casos de EB, EB con displasia y ACE respecto al epitelio normal, esta observación, aunque estadísticamente significativa, sea quizá de dudosa relevancia clínica. Quizá en lo que más resultó de utilidad el CD 133 fue a la hora de discernir entre EB con displasia y ACE, mostrando, ésta última, una mayor proporción de muestras positivas; esta diferencia mostró valores estadísticamente significativos ( $p < 0,001$ ).

Un análisis más detallado y que eliminó el epitelio escamoso normal como grupo a contrastar, nos mostró que la p504s es positiva, en un mayor número de casos tanto en el caso de displasia de bajo grado, como de displasia de alto grado, respecto al epitelio de Barrett sin displasia, en ambos casos, con valores estadísticamente significativos (0,016 y 0,003, respectivamente). También observamos que tanto CD 133 como p504s fueron positivas en un mayor número de casos de ACE que de EB sin displasia, de nuevo, observación de dudosa relevancia clínica.

Una observación que sí creemos trascendente ya que definiría tanto conductas a seguir como tratamientos de elección, es el hecho de que CD 133 resultó positiva, en un mayor número de casos de DAG y ACE respecto a la DBG, con valores estadísticamente significativos (0,013 y  $< 0,001$ , respectivamente). Si en algo fallaron todas las técnicas, fue en encontrar diferencias estadísticamente significativas entre la DAG y el ACE. Estos resultados vienen a confirmar las observaciones realizadas por Ahamad et al [594] en el sentido de que el uso de la p504s podría ser útil en la identificación de la displasia sobre el epitelio de Barrett a la vez que, el uso conjunto de CD 133, podría ayudar a discernir entre displasia de bajo y alto grado.

Nuestro estudio presentó varias limitaciones, quizá una de las más trascendentales fuera el hecho de tratarse un estudio retrospectivo. En un intento por estudiar ese comportamiento "prospectivo", seleccionamos a los pacientes sometidos a esofagectomía quirúrgica al ser estos los que nos permitían el estudio de diferentes zonas histológicas de la línea metaplasia-displasia-adenocarcinoma. Los resultados con los que nos encontramos al hacer éstas comparaciones, nos confirmaron que existían



diferencias en la positividad de las tinciones CD 133 y p504s a medida que progresaban los cambios histológicos en la línea metaplasia-displasia-adenocarcinoma; si bien estos resultados deben tomarse con cautela y deben de servir, sobre todo, al desarrollo de nuevas líneas de investigación en este sentido.

Si trasladáramos nuestras observaciones a la historia natural del EB, podríamos decir que, haciendo una interpretación de nuestros resultados, el epitelio escamoso esofágico normal resulta pobremente positivo a CD 133 al encontrar algunas células madre a nivel de las glándulas submucosas como parte de su arquitectura normal. No es sino tras una serie de factores agresores, tanto innatos como adquiridos, que algunas células desarrollarían una transformación y degeneración neoplásica evidenciada, según nuestros hallazgos, por la positividad a la p504s. Siguiendo ésta línea, a medida que se perpetúan estos factores agresores, la CD 133 se vuelve más positiva traduciendo una mayor proliferación de células madre que, originadas en las glándulas submucosas, migrarían a través de su conducto excretor hacia la luz esofágica donde proliferarían y generarían, dada su pluripotencialidad, un nuevo epitelio de tipo intestinal que recubriría las zonas dañadas, al ser más resistente a los irritantes externos; sin embargo, el efecto irritante continuo sobre células madre pluripotenciales degeneraría, con el paso del tiempo, a cambios displásicos y, finalmente, daría paso a un adenocarcinoma esofágico. Nuestro estudio, al igual que el de Ahmad (siendo el único que por sus características nos sirve para realizar comparaciones) ha fallado en identificar ese marcador de invasión de la transición epitelio-mesenquimal que traduciría una intravasación de células tumorales y, finalmente, el desarrollo de metástasis precoces.

Aunque nosotros compartimos la afirmación de que el mejor marcador pronóstico continúa siendo una adecuada observación y caracterización de la displasia, como ha quedado patente a lo largo del presente trabajo, esto no siempre resulta fácil de realizar, de ahí que, hasta la fecha, siga estando presente el término “indeterminado para displasia”. Debemos ser conscientes de que, aunque lo ideal sería que todos estos

casos fueran valorados por patólogos expertos, de cara a las diferentes opciones de tratamiento, esta situación no siempre ocurre, sobre todo en hospitales de 2º nivel donde habitualmente no se cuenta con anatomopatólogos expertos en EB y ACE. Esta situación conlleva a que frecuentemente se tomen decisiones diagnóstico-terapéuticas con diferentes grados de certeza asumiendo, en muchos casos, tratamientos muy agresivos o, por el contrario, insuficientes. Según nuestros hallazgos, nosotros creemos que el empleo sistemático de estos auxiliares inmunohistoquímicos podría aportar una información objetiva que sea de especial ayuda en Hospitales de 2º nivel y/o para patólogos no expertos en un intento de enfocar nuestros recursos a realizar un seguimiento más estrecho de aquellos casos con mayor riesgo de malignización.

## **8 CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. Existe una mayor incidencia y prevalencia tanto del EB como de ACE en los últimos años.
2. Como factores de riesgo asociados a la aparición y progresión del esófago de Barrett encontramos el sexo masculino, edades avanzadas de la vida, un consumo excesivo de alcohol y la presencia de un esófago de Barrett largo (>3 cms).
3. La enfermedad cardiovascular y el cáncer de estirpe no esofágica, han sido las principales causas de mortalidad en los pacientes con EB.
4. El diagnóstico de ACE ha sido, mayoritariamente, como debut de la enfermedad neoplásica.
5. En los pacientes con esófago de Barrett, CD 133 se expresa tanto a nivel luminal en las glándulas submucosas como a lo largo del trayecto de su conducto excretor hacia la luz esofágica, por lo que podrían ser éstas células el origen del epitelio de Barrett.
6. P540s presentó un patrón de tinción citoplasmático siendo más positiva en los casos de displasia que en los casos sin displasia.
7. El uso de TWIST presenta múltiples dificultades técnicas y de interpretación que hacen muy difícil su uso rutinario en la práctica clínica habitual. Por ello, no hemos conseguido identificar alteraciones en la membrana de transición epitelio-mesenquimal como marcador de metástasis precoces en el ACE.
8. La expresión de CD 133 es más frecuente en los casos de DAG y ACE respecto a la DBG, por ello, una tinción positiva podría estar relacionada con un peor pronóstico.

9. La expresión de p504s con su característico patrón citoplasmático, resultó más frecuente en los casos de EB con displasia, tanto de bajo como de alto grado, respecto a la metaplasia de Barrett sin displasia.
  
10. Tanto el CD 133 como la p504s podrían ser útiles en identificar aquellos casos de EB que presenten dudas respecto a la displasia, sobre todo para patólogos no expertos y en centros no especializados.

## **9 BIBLIOGRAFIA**

1. Hamilton Sr. Esophagitis. In Pathology of the Gastrointestinal Tract. Second edition. Siu-Chun Ming, Harvey Goldman Editors. Williams and Wilkins, 1998. (20):433-474.
2. Reginal V.N. Lord. Norman Barrett, «Doyen of Esophageal Surgery». Lippincott Williams & Wilkins. Annals of Surgery, March 1999. Volume 229. (3): 428-439.
3. Weinstein WN, Ippoliti AF. The diagnosis of Barrett's esophagus: goblets, goblets goblets. Gastrointests Endosc.1996;44:91-95.
4. Ellis FH Jr, Olsen AM. Achalasia of the Esophagus. Major Probl Clin Surg. 1969;9:1-221
5. Barrett NR. Chronic peptic ulcer of the oesophagus and «oesophagitis». Br J Surg.1950;38:175-182.
6. Lyall A. Chronic peptic ulcer of the oesophagus: a report of eight cases. Br J Surg.1937;24:534-547.
7. Allison PR, Johnstone AS. Oesophagus lined with gastric mucous membrane. Thorax.1953;8:87-93.
8. Chandrasoma P. Pathophysiology of Barrett's esophagus. Semin Thorac Cardiovasc Surg. 1997;9(3):270-8
9. Modlin IM, Sachs G. Barrett's. In Modlin Irvin M, Sachs George ed. Acid Related Diseases. Biology and Treatment. Schnetztor-Verlag GmbH D-Konstanz.1998;Ch 5: 302-307.
10. Spechler SJ. The Columnar-Lined Esophagus: History, Terminology, and Clinical Issues. Gastroenterol Clin North Am. 1997;26(3):455-66.
11. Boshier LH, Taylor FH. Heterotopic gastric mucosa in the esophagus with ulceration and stricture formation. J Th Surg.1951;21:306-312
12. Morson BC, Belcher JR: Adenocarcinoma of the esophagus and ectopic gastric mucosa. Br J Cancer.1952;6:127- 130.
13. Barrett NR. The lower esophagus lined by columnar epithelium. Surgery.1957; 41:881-894.
14. Moersch RN, Eellis FH, Mc Donald JR: Pathologic changes occurring in severe reflux esophagitis. Surg Gynecol Obstet.1959;180:476.
15. Hayward J. The lower end of the oesophagus. Thorax.1961;16:36- 41.
16. Paull A, Trier JS, Dalton MD, et al. The histologic spectrum of Barrett's esophagus. N Engl J Med.1976;295:476-480.
17. Resano CH, Cabrera N, Gonzales-Cueto D, et al. Double early epidermoid carcinoma of the esophagus in columnar epithelium. Endoscopy.1985;17:73-75.
18. Siu-Chun M. Adenocarcinoma and other epithelial tumors of the esophagus. In Pathology of the Gastrointestinal Tract. Second edition. Siu-Chun Ming, Harvey Goldman Editors. Williams and Wilkins.1998;22:499-521.

19. Tamura H, Schulman SA. Barrett type esophagus associated with squamous carcinoma. *Chest*.1971;59:330-332.
20. Skinner DB, Walther BC, Riddell RH, et al. Barrett's esophagus: comparison of benign and malignant cases. *Ann Surg*.1983;198:554-565.
21. Gray MR, Hall PA, Nash J, et al. Epithelial proliferation in Barrett's esophagus by proliferating cell nuclear antigen immunolocalization. *Gastroenterology*. 1992;103(6):1769-76.
22. Reid BJ, Weinstein WM. Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Annu Rev Med*.1987;38:477-492.
23. Rustgi AK. Biomarkers For Malignancy In The Columnar-Lined Esophagus. *Gastroenterol Clin North Am*. 1997;26(3):599-606
24. Spechler SJ. Esophageal columnar metaplasia (Barrett's esophagus). *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 1997;7(1):1-18
25. Spechler ST. The Columnar-Lined Esophagus. *Gastroenterology Clinics*, 1997;26 (3):455-467.
26. Hirota WK, Loughney TM, Lazas DJ. Specialized intestinal metaplasia, dysplasia and cancer of the esophagus and esophagogastric junction: prevalence and clinical data. *Gastroenterology*, 1999. 116:277-285.
27. Schnell TG, Sontag SJ, Chejfec G. Adenocarcinoma arising in tongues or short segment of Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci*, 1992. 37:143-173.
28. Sharma P, Morales TG, Bhattacharyya A, et al. Dysplasia in Short-Segment Barrett's Esophagus: A Prospective 3-Year Follow-Up. *American College of Gastroenterology. American Journal of Gastroenterology*. 1997;92(11).
29. Weston AP, Krmpotich PT, Cherian R, et al. Prospective Long-Term Endoscopic and Histological Follow-Up of Short Segment Barrett's Esophagus: Comparison with Traditional Long Segment Barrett's Esophagus. *American College of Gastroenterology. American Journal of Gastroenterology*.1997(92);3.
30. Reynolds JC, Waronker MD, Sibayan P, Maricar D, et al. Gastroesophageal Reflux Disease. Barrett's Esophagus: Reducing the Risk of Progression to Adenocarcinoma. W. B. Saunders Company. *Gastroenterology Clinics*. 1999(28);4.
31. Prateek S. The Worldwide Prevalence of Barrett's Esophagus. *World Gastroenterology News*, 2001.(6);1: 22-25.
32. Pohl H, Welch G. The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence.*J Natl Cancer Inst* 2005;97:142-6.
33. Fitzgerald RC, di Pietro M, Ragnath K, Ang Y, Kang JY, et al. British Society of Gastroenterology. British Society of Gastroenterology guidelines on the diagnosis and management of Barrett's oesophagus. *Gut*. 2014 Jan;63(1):7-42



34. Jankowski JA, Harrison RF, Perry I, et al. Barrett's metaplasia. *The lancet*, 2000. Vol 356: 2079-2085
35. Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, et al. Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Pathol*, 1999. 154: 965-973.
36. Atherfold PA, Jankowski JA. Molecular biology of Barrett's cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2006;20(5):813-2.
37. Bajpai M, Das KM, Lefferts J, Lisovsky M, Mashimo H, Phillips WA, Srivastava A, To H. Molecular epidemiology of and genetic susceptibility to esophageal cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2014 Sep;1325:40-8
38. Souza RF, Meltzer SJ. The Molecular Basis For Carcinogenesis In Metaplastic Columnar-Lined Esophagus. W. B. Saunders Company. *Gastroenterology Clinics*. 1997 (26);3.
39. Weinstein WM. Predicting who will develop cancer: role of biopsy, flow cytometry, cell and genetic markers. *American Society for Gastrointestinal Endoscopy. Gastrointestinal Endoscopy*, 1999. (49);3.
40. Legergren J, Bergstrom R, Lindgren A, et al. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 1999. (340): 825-831.
41. Lada MJ, Nieman DR, Han M, Timratana P, Alsalahi O, Peyre CG, Jones CE, Watson TJ, Peters JH. Gastroesophageal reflux disease, proton-pump inhibitor use and Barrett's esophagus in esophageal adenocarcinoma: Trends revisited. *Surgery*. 2013 Oct;154(4):856-64; discussion 864-6.
42. Merlo, L.M.et al. A comprehensive survey of clonal diversity measures in Barrett's esophagus as biomarkers of progression to esophageal adenocarcinoma. *Cancer Prev. Res*. 2010(3): 1388–1397.
43. Sharma P, Dent J, Armstrong D, Bergman JJ, Gossner L, Hoshihara Y, Jankowski JA, Junghard O, Lundell L, Tytgat GN, Vieth M. The development and validation of an endoscopic grading system for Barrett's esophagus: the Prague C & M criteria. *Gastroenterology*. 2006 Nov;131(5):1392-9
44. Vahabzadeh B, Seetharam AB, Cook MB, Wani S, Rastogi A, Bansal A, Early DS, Sharma P. Validation of the Prague C & M criteria for the endoscopic grading of Barrett's esophagus by gastroenterology trainees: a multicenter study. *Gastrointest Endosc*. 2012 Feb;75(2):236-41
45. Cameron AJ. Epidemiology Of Columnar-Lined Esophagus And Adenocarcinoma. W. B. Saunders Company. *Gastroenterology Clinics*. 1999 (27);3.

46. Bhat S, Coleman HG, Yousef F, Johnston BT, McManus DT, Gavin AT, Murray LJ. Risk of malignant progression in Barrett's esophagus patients: results from a large population-based study. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Jul 6;103(13):1049-57.
47. Cameron AJ. Epidemiology and prevalence of Barrett's esophagus and adenocarcinoma. In Sharma P, Sampliner RE, ed. *Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma*. Blackwell Science, 2001. Ch 2, 8-17.
48. Dulai GS, Guha S, Kahn KL, Gornbein J, Weinstein WM. Preoperative prevalence of Barrett's esophagus in esophageal adenocarcinoma: a systematic review. *Gastroenterology* 2002;122:26-33.
49. Nason KS, Wichienkuer PP, Awais O, Schuchert MJ, Luketich JD, O'Rourke RW, et al. Gastroesophageal reflux disease symptom severity, proton pump inhibitor use, and esophageal carcinogenesis. *Arch Surg* 2011;146:851-8.
50. Bytzer P, Christensen PB, Damkier P, Vinding K, Seersholm N. Adenocarcinoma of the esophagus and Barrett's esophagus: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 1999 94:86-91.
51. Philips RW, Wong RKH. Barrett's esophagus: natural history, incidence, etiology, and complications. *Gastroenterol Clin North Am*, 1991. 20, N° 4, 791-816.
52. Ronkainen J, Aro P, Storskrubb T, Johansson SE, Lind T, Bolling-Sternevald E, Vieth M, Stolte M, Talley NJ, Agréus L. Prevalence of Barrett's esophagus in the general population: an endoscopic study. *Gastroenterology*. 2005.Dec;129(6):1825-31.
53. Cameron AJ, Zinsmeister AR, Ballard DJ, Carney JA. Prevalence of columnar-lined (Barrett's) esophagus. Comparison of population-based clinical and autopsy findings. *Gastroenterology*. 1990 Oct;99(4):918-22.
54. Alcedo J, Ferrández A, Arenas J, Sopeña F, Ortego J, Sainz R, Lanás A. Trends in Barrett's esophagus diagnosis in Southern Europe: implications for surveillance. *Dis Esophagus*. 2009;22(3):239-48.
55. Darbà J, Kaskens L, Plans P, Elizalde JI, Coma M, Cuomo R, Santoiemma L, Geldmacher J. Epidemiology and societal costs of gastroesophageal reflux disease and Barrett's syndrome in Germany, Italy and Spain. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* 2011 Apr;11(2):225-32
56. Ford AC, Forman D, Reynolds PD, Cooper BT, Moayyedi P. Ethnicity, gender, and socioeconomic status as risk factors for esophagitis and Barrett's esophagus. *Am J Epidemiol.* 2005 Sep 1;162(5):454-60
57. Rajendra S, Kutty K, Karim N. Ethnic differences in the prevalence of endoscopic oesophagitis and Barrett's oesophagus: the long and short of it all. *DigDis Sci*2004;49:237-42.

58. Kim JY, Kim YS, JungMK et al. Prevalence of Barrett's oesophagus in Korea. *J Gastroenterol Hepatol*.2005;20:633–6.
59. Azuma N,Endo T,ArimuraY et al. Prevalence ofBarrett's oesophagus and expression of mucin antigens detected by a panel of monoclonal antibodies in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 35: 583–92.
60. ChenX,ZhuLR,HouXH.The characteristics ofBarrett's oesophagus: an analysis of 4120 cases in China. *Dis Esophagus* 2009; 22:348–53.
61. Dhawan PS, Alvares JF, Vora IM et al. Prevalence of short segment of specialized columnar epithelium in distal esophagus: association with gastroesophageal reflux. *Indian J Gastroenterol* 2001;20:144–7.
62. Fernandes ML,Seow A,Chan YH,Ho KY. Opposing trends incidence of oesophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma in amulti-ethnic Asian country. *Am J Gastroenterol* 2006; 101:1430–6.
63. Shibata A, Matsuda I, Ajiki W,Sobue J. Trendin incidence ofadenocarcinoma of the oesophagus in Japan. *Jpn J ClinOncol* 1993; 38:464–8.
64. Haghdoost AA, Hosseini H, Chamani G et al. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus in Kerman, Iran. *Arch Iran Med*2008;11:364–70.
65. Raghunath A, Hungin AP, Wooff D, Childs S. Prevalence of Helicobacter pylori in patients with gastro-oesophageal reflux disease: systematic review. *BMJ* 2003;326:737–43.
66. O'Connor HJ. Helicobacter pylori and gastro-oesophageal reflux disease – clinical implications and management. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:117–27.
67. Rajendra S, Ackroyd R, Robertson IK ,Ho JJ, Karim N,Kutty MK. Helicobacter pylori, ethnicity and the gastro-oesophageal reflux disease spectrum: a study fromthe East. *Helicobacter* 2007; 12:177–83.
68. Kim JH, Rhee PL, Lee JH, et al. Prevalence and risk factors of Barrett's esophagus in Korea. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22:908–12.
69. Sharma P, McCallum RW, Lundell L, et al. The geoprevalence of Barrett's esophagus. (Paper presented at the Sixth OESO World Congress, Paris, France , September 2000)
70. Gadour MO, Ayoola EA. Barrett's oesophagus and oesophageal cancer in Saudi Arabia. *Gastroenterology*, 1999. 20:111-5.
71. Mason RJ, Bremner CG. The columnar-line (Barrett's) oesophagus in black patients. *S Afr J Surg*, 1998. 36:61-2.
72. Connor MJ, Weston AP, Mayo MS, et al. The prevalence of Barrett's esophagus and erosive esophagitis in patients undergoing upper endoscopy for dyspepsia in a VA population. *Dig Dis Sci*. 2004; 49:920–4.

73. Oberg S, Wenner J, Johansson J, et al. Barrett esophagus: risk factors for progression to dysplasia and adenocarcinoma. *Ann Surg.* 2005; 242:49–54.
74. Sharma P, Falk GW, Weston AP, et al. Dysplasia and cancer in a large multicenter cohort of patients with Barrett's esophagus. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006; 4:566–72.
75. Anandasabapathy S, Jhamb J, Davila M, et al. Clinical and endoscopic factors predict higher pathologic grades of Barrett dysplasia. *Cancer.* 2007; 109:668–74.
76. Corley DA, Kubo A, Levin TR, Block G, Habel L, Rumore G, Quesenberry C, Buffler P. Race, ethnicity, sex and temporal differences in Barrett's oesophagus diagnosis: a large community-based study, 1994-2006. *Gut.* 2009 Feb;58(2):182-8.
77. El-Serag HB, Mason AC, Petersen N, Key CR. Epidemiological differences between adenocarcinoma of the oesophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia in the USA. *Gut.* 2002 Mar;50(3):368-7.
78. Guardino JM, Khandwala F, Lopez R, et al. Barrett's esophagus at a tertiary care center: association of age on incidence and prevalence of dysplasia and adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol.* 2006; 101:2187–93.
79. Sampliner R, Wang K, Shaheen N, et al. InterSPORE/EDRN Barrett's Esophagus (BE) study: Interim Report of a Multicenter Case-Control Study of Progressors to High Grade Dysplasia/Adenocarcinoma vs. Nonprogressors. *Gastroenterology.* 2008:134.
80. Pohl H, Welch HG. The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97:142–6.
81. Wong A, Fitzgerald RC. Epidemiologic risk factors for Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005 Jan;3(1):1-10
82. von Rahden BH, Stein HJ, Siewert JR. Barrett's esophagus and Barrett's carcinoma. *Curr Oncol Rep.* 2003 May;5(3):203-9
83. Wang A, Mattek NC, Holub JL, Lieberman DA, Eisen GM. Prevalence of complicated gastroesophageal reflux disease and Barrett's esophagus among racial groups in a multi-center consortium. *Dig Dis Sci.* 2009;54(5):964-971.
84. Rogers EL, Goldkind SF, Iseri OA, Bustin M, Goldkind L, Hamilton SR, Smith RL. Adenocarcinoma of the lower esophagus. A disease primarily of white men with Barrett's esophagus. *J Clin Gastroenterol* 1986; 8: 613-618 75
85. Pondugula K, Wani S, Sharma P. Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma in adults: long-term GERD or something else? *Curr Gastroenterol Rep* 2007; 9: 468-474-76.
86. Kubo A, Corley DA. Marked multi-ethnic variation of esophageal and gastric cardia carcinomas within the United States. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 582-588 77

87. El-Serag HB, Petersen NJ, Carter J, Graham DY, Richardson P, Genta RM, Rabeneck L. Gastroesophageal reflux among different racial groups in the United States. *Gastroenterology* 2004; 126: 1692-1699.
88. Achkar E, Carey W. The cost of surveillance for adenocarcinoma complicating Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol*, 1988. 3:291-4.
89. Cameron AJ, Ott BJ, Payne WS. The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus. *N Engl J Med*, 1985. 313:857-9.
90. Ovaska J, Miettinen M, Kivillkso E. Adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci*, 1989. 34:1336-9.
91. Spechler SJ, Robbins AH, Rubins HB, et al. Adenocarcinoma and Barrett's esophagus: An overrated risk? *Gastroenterology*, 1984. 87: 927 -33.
92. Van der Veen AH, Dees J, Blankensteijn JD, et al. Adenocarcinoma in Barrett's oesophagus. An overrated risk. *Gut*, 1989. 30: 14-18.
93. Williamson WA, Ellis FH, Gibb SP, et al. Barrett's esophagus: Prevalence and incidence of adenocarcinoma. *Arch Intern Med*, 1991. 151:2212-6.
94. Bonelli L, GOSPE.(Gruppo Operativo per lo Studio delle Precancerosi Esofagee). Barrett's esophagus: Results of a multicentric survey. *Endoscopy* 25 (suppl.) , 1993; 652-4.
95. Hammeeteman W, Tytgat NJ, Houthoff HJ, et al. Barrett's esophagus. Development of dysplasia and adenocarcinoma. *Gastroenterology*, 1989. 96:1249-56.
96. Iftikhar SY, James PD, Steele RJC, et al. Length of Barrett's oesophagus: An important factor in the development of dysplasia and adenocarcinoma. *Gut*, 1992. 33: 1155-8.
97. Miros M, Kerlin P, Walker N. Only patients with dysplasia progress to adenocarcinoma in Barrett's oesophagus. *Gut*, 1991. 32:1441-6.
98. Robertosn CS, Mayberry JF, Nicholson JF, Nicholson DA, et al. Value of endoscopic surveillance in detection of neoplastic change in Barrett's oesophagus. *Br J Surg*, 1988. 75: 760-3
99. Drewitz DJ, Sampliner RE, Garewal HS. The Incidence of Adenocarcinoma in Barrett's Esophagus: A Prospective Study of 170 Patients Followed 4.8 Years. *American College of Gastroenterology. American Journal of Gastroenterology*, February 1997. Volume 92. Number 2.
100. Solaymani-Dodaran M, Logan RF, West J, Card T, Coupland C. Risk of oesophageal cancer in Barrett's oesophagus and gastro-oesophageal reflux. *Gut*. 2004 Aug;53(8):1070-4
101. Gatenby PA, Caygill CP, Ramus JR, Charlett A, Watson A. Barrett's columnar-lined oesophagus: demographic and lifestyle associations and adenocarcinoma risk. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1175-1185.

102. Gatenby P, Ramus J, Caygill C, Shepherd N, Winslet M, Watson A. Routinely diagnosed low-grade dysplasia in Barrett's oesophagus: a population-based study of natural history. *Histopathology* 2009; 54: 814-819
103. Desai TK, Krishnan K, Samala N, Singh J, Cluley J, Perla S, Howden CW. The incidence of oesophageal adenocarcinoma in non-dysplastic Barrett's oesophagus: a meta-analysis. *Gut* 2012; 61: 970-976
104. Yousef F, Cardwell C, Cantwell MM, Galway K, Johnston BT, Murray L. The incidence of esophageal cancer and highgrade dysplasia in Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2008; 168: 237- 249.
105. Sikkema M, de Jonge PJ, Steyerberg EW, Kuipers EJ. Risk of esophageal adenocarcinoma and mortality in patients with Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8: 235-44.
106. Thomas T, Abrams KR, De Caestecker JS, Robinson RJ. Meta analysis: Cancer risk in Barrett's oesophagus. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 1465-1477.
107. De Jonge PJF, van Blankenstein M, Grady WM, Kuipers EJ: Barrett's oesophagus: epidemiology, cancer risk and implications for management. *Gut* 2014; 63: 191–202.
108. Gatenby PA, Ramus JR, Caygill CP, Fitzgerald RC, Charlett A, Winslet MC, Watson A. The influence of symptom type and duration on the fate of the metaplastic columnar-lined Barrett's oesophagus. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 29: 1096-1105.
109. Rudolph RE, Vaughan TL, Storer BE, et al. Effect of segment length on risk for neoplastic progression in patients with Barrett esophagus. *Ann Intern Med.* 2000; 132:612–20.
110. Connor MJ, Weston AP, Mayo MS, et al. The prevalence of Barrett's esophagus and erosive esophagitis in patients undergoing upper endoscopy for dyspepsia in a VA population. *Dig Dis Sci.* 2004; 49:920–4.
111. Sato F, Jin Z, Schulmann K, et al. Three-tiered risk stratification model to predict progression in Barrett's esophagus using epigenetic and clinical features. *PLoS ONE.* 2008; 3:e1890.
112. Yousef F, Cardwell C, Cantwell MM, et al. The incidence of esophageal cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus:a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2008; 168:237–49.
113. Menke-Pluymers MB, Hop WC, Dees J, et al. Risk factors for the development of an adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett) esophagus. The Rotterdam Esophageal Tumor Study Group. *Cancer.* 1993; 72:1155–8.
114. Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, et al. Hiatal hernia size, Barrett's length, and severity of acid reflux are all risk factors for esophageal adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97:1930–6.

115. Vaughan TL, Dong LM, Blount PL, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of neoplastic progression in Barrett's oesophagus:a prospective study. *Lancet Oncol.* 2005; 6:945–52.
116. Weston AP, Sharma P, Mathur S, et al. Risk stratification of Barrett's esophagus:updated prospective multivariate analysis. *Am J Gastroenterol.* 2004; 99:1657–66.
117. O'Connor JB, Falk GW, Richter JE. The incidence of adenocarcinoma and dysplasia in Barrett's esophagus:report on the Cleveland Clinic Barrett's Esophagus Registry. *Am J Gastroenterol.* 1999;94:2037–42.
118. Anandasabapathy S, Jhamb J, Davila M, et al. Clinical and endoscopic factors predict higher pathologic grades of Barrett dysplasia. *Cancer.* 2007; 109:668–74.103.
119. Yousef F, Cardwell C, Cantwell MM, et al. The incidence of esophageal cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus:a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2008; 168:237–49.
120. Oberg S, Wenner J, Johansson J, et al. Barrett esophagus:risk factors for progression to dysplasia and adenocarcinoma. *Ann Surg.* 2005; 242:49–54.
121. Rudolph RE, Vaughan TL, Storer BE, et al. Effect of segment length on risk for neoplastic progression in patients with Barrett esophagus. *Ann Intern Med.* 2000; 132:612–20.
122. Rudolph RE, Vaughan TL, Storer BE, et al. Effect of segment length on risk for neoplastic progression in patients with Barrett esophagus. *Ann Intern Med.* 2000; 132:612–20.
123. Thomas T, Abrams KR, De Caestecker JS, et al. Meta analysis:cancer risk in Barrett's oesophagus. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007; 26:1465–77.
124. Buttar NS, Wang KK, Sebo TJ, et al. Extent of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus correlates with risk of adenocarcinoma. *Gastroenterology.* 2001; 120:1630–9.
125. Sikkema M, Looman CW, Steyerberg EW, et al. Predictors of neoplastic progression in patients with Barrett's esophagus: a prospective cohort study. *Am J Gastroenterol* 2011;106:1231–8.
126. Erichsen R, Robertson D, Farkas DK, et al. Erosive reflux disease increases risk for esophageal adenocarcinoma, compared with nonerosive reflux. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10:475–80.
127. Coleman HG, Bhat SK, Murray LJ, et al. Symptoms and endoscopic features at Barrett's esophagus diagnosis: implications for neoplastic progression risk. *Am J Gastroenterol* 2014;109:527–34.

128. Westhoff B, Brotze S, Weston A, et al. The frequency of Barrett's esophagus in high-risk patients with chronic GERD. *Gastrointest Endosc.* 2005; 61:226–231.
129. Eloubeidi MA, Provenzale D. Clinical and demographic predictors of Barrett's esophagus among patients with gastroesophageal reflux disease: a multivariable analysis in veterans. *J Clin Gastroenterol.* 2001; 33:306–309.
130. Thrift AP, Cook MB, Vaughan TL, Anderson LA, Murray LJ, Whiteman DC, Shaheen NJ, Corley DA. Alcohol and the risk of Barrett's esophagus: a pooled analysis from the International BEACON Consortium. *Am J Gastroenterol.* 2014 Oct;109(10):1586–94.
131. Johansson J, Hakansson H-O, Mellblom L, et al. Risk factors for Barrett's oesophagus: a population-based approach. *Scand J Gastroenterol.* 2007; 42:148–156.
132. Smith KJ, O' Brien SM, Smithers BM, et al. Interactions among smoking, obesity, and symptoms of acid reflux in Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14:2481–2486.
133. Winters C Jr, Spurling TJ, Chobanian SJ, et al. Barrett's esophagus. A prevalent, occult complication of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology.* 1987; 92:118–124.
134. Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, et al. Epidemiology of gastroesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut.* 2005; 54:710–717.
135. Anderson LA, Watson RGP, Murphy SJ, et al. Risk factors for Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: results from the FINBAR study. *World J Gastroenterol.* 2007; 13:1585–1594.
136. Smith KJ, O' Brien SM, Green AC, et al. Current and past smoking significantly increase risk for Barrett's esophagus. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009; 7:840–848.
137. Westhoff B, Brotze S, Weston A, et al. The frequency of Barrett's esophagus in high-risk patients with chronic GERD. *Gastrointest Endosc.* 2005; 61:226–231
138. Rex DK, Cummings OW, Shaw M, et al. Screening for Barrett's esophagus in colonoscopy patients with and without heartburn. *Gastroenterology.* 2003; 125:1670–1677.
139. Malfertheiner P, Lind T, Willich S, et al. Prognostic influence of Barrett's oesophagus and *Helicobacter pylori* infection on healing of erosive gastro-oesophageal reflux disease (GORD) and symptom resolution in non-erosive GORD: report from the ProGORD study. *Gut.* 2005; 54:746–751.
140. Voutilainen M, Sipponen P, Mecklin JP, et al. Gastroesophageal reflux disease: prevalence, clinical, endoscopic and histopathological findings in 1,128 consecutive patients referred for endoscopy due to dyspeptic and reflux symptoms. *Digestion.* 2000; 61:6–13.



141. Thrift AP, Kramer JR, Qureshi Z, Richardson PA, El-Serag HB. Age at onset of GERD symptoms predicts risk of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol*. 2013 Jun;108(6):915-22.
142. Pandeya N, Webb PM, Sadeghi S, et al. Gastro-oesophageal reflux symptoms and the risks of oesophageal cancer: are the effects modified by smoking, NSAIDs or acid suppressants? *Gut*. 2010; 59:31–38.
143. Vaezi MF, Richter JE. Synergism of acid and duodenogastroesophageal reflux in complicated Barrett's esophagus. *Surgery*. 1995 Jun;117(6):699-704.
144. Nehra D, Howell P, Williams CP, Pye JK, Beynon J. Toxic bile acids in gastro-oesophageal reflux disease: influence of gastric acidity. *Gut*. 1999 May;44(5):598-602.
145. Menges M, Müller M, Zeitz M. Increased acid and bile reflux in Barrett's esophagus compared to reflux esophagitis, and effect of proton pump inhibitor therapy. *Am J Gastroenterol*. 2001 Feb;96(2):331-7.
146. Theisen J, Nehra D, Citron D, Johansson J, Hagen JA, Crookes PF, DeMeester SR, Bremner CG, DeMeester TR, Peters JH. Suppression of gastric acid secretion in patients with gastroesophageal reflux disease results in gastric bacterial overgrowth and deconjugation of bile acids. *J Gastrointest Surg*. 2000 Jan-Feb;4(1):50-4.
147. Naran S, Abrams P, de Oliveira PQ, Hughes SJ. Bile salts differentially sensitize esophageal squamous cells to CD95 (Fas/Apo-1 receptor) mediated apoptosis. *J Surg Res*. 2011 Dec;171(2):504-9.
148. Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase- 2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 2929-2934.
149. Wild CP, Hardie LJ. Reflux, Barrett's oesophagus and adenocarcinoma: burning questions. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 676-684.
150. Qiao D, Gaitonde SV, Qi W, Martinez JD. Deoxycholic acid suppresses p53 by stimulating proteasome-mediated p53 protein degradation. *Carcinogenesis* 2001; 22: 957-964.
151. Anderson LA, Watson RG, Murphy SJ, Johnston BT, Comber H, Mc Guigan J, Reynolds JV, Murray LJ. Risk factors for Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: results from the FINBAR study. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1585-1594.
152. Chak A, Faulx A, Eng C, Grady W, Kinnard M, Ochs-Balcom H, Falk G. Gastroesophageal reflux symptoms in patients with adenocarcinoma of the esophagus or cardia. *Cancer* 2006; 107: 2160-2166.

153. Ouatu-Lascar R, Fitzgerald RC, Triadafilopoulos G. Differentiation and proliferation in Barrett's esophagus and the effects of acid suppression. *Gastroenterology* 1999; 117: 327-335.
154. Attwood SE, Harrison LA, Preston SL, Jankowski JA. Esophageal adenocarcinoma in mice and men: back to basics! *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2367-2372.
155. Buttar NS, Wang KK. Mechanisms of disease: Carcinogenesis in Barrett's esophagus. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 106-112.
156. Nasr AO, Dillon MF, Conlon S, Downey P, Chen G, Ireland A, Leen E, Bouchier-Hayes D, Walsh TN. Acid suppression increases rates of Barrett's esophagus and esophageal injury in the presence of duodenal reflux. *Surgery*. 2012 Mar;151(3):382-90.
157. Islami F, Kamangar F, Boffetta P. Use of proton pump inhibitors and risk of progression of Barrett's esophagus to neoplastic lesions. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 2646-2648.
158. Hvid-Jensen F, Pedersen L, Funch-Jensen P, Drewes AM. Proton pump inhibitor use may not prevent high-grade dysplasia and oesophageal adenocarcinoma in Barrett's oesophagus: a nationwide study of 9883 patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2014. 39(9):984-91.
159. Obszynska JA, Atherfold PA, Nanji M, Glancy D, Santander S, Graham TA, Otto WR, West K, Harrison RF, Jankowski JA. Long-term proton pump induced hypergastrinaemia does induce lineage-specific restitution but not clonal expansion in benign Barrett's oesophagus in vivo. *Gut* 2010; 59:156-163.
160. Singh S, Garg SK, Singh PP, Iyer PG, El-Serag HB. Acid-suppressive medications and risk of oesophageal adenocarcinoma in patients with Barrett's oesophagus: a systematic review and meta-analysis. *Gut*. 2014. Aug;63(8):1229-37.
161. McCallum R, Polepalle S, Davenport K et al. Role of antireflux surgery against dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology*. 1991 100:A121.
162. Katz D, Rothstein R, Schned A et al. The development of dysplasia and adenocarcinoma during endoscopic surveillance of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol*. 1998 93:536-541 19.
163. Ortiz A, Martinez de Haro LF, Parrilla P et al. Conservative treatment versus antireflux surgery in Barrett's oesophagus: long-term results of a prospective study. *Br J Surg* 1996 83: 274-278.
164. Parrilla P, Martinez de Haro LF, Ortiz A et al. Long-term results of a randomized prospective study comparing medical and surgical treatment of Barrett's esophagus. *Ann Surg*. 2003 237:291-298.

165. Öberg S, Wenner J, Johansson J et al. Barrett esophagus: risk factors for progression to dysplasia and adenocarcinoma. *Ann Surg* 2005. 242:49–54.
166. Csendes A, Burdiles P, Braghetto I et al. Dysplasia and adenocarcinoma after classic antireflux surgery in patients with Barrett's esophagus: the need for long-term subjective and objective follow-up. *Ann Surg* 2002. 235:178–185.
167. Chang EY, Morris CD, Seltman AK et al. The effect of antireflux surgery on esophageal carcinogenesis in patients with Barrett esophagus: a systematic review. *Ann Surg* 2007. 246:11–21.
168. Oelschlager BK, Barreca M, Chang L et al. Clinical and pathologic response of Barrett's esophagus to laparoscopic antireflux surgery. *Ann Surg* 2003. 238:458–464.
169. O'Riordan JM, Byrne PJ, Ravi N et al. Long-term clinical and pathologic response of Barrett's esophagus after antireflux surgery. *Am J Surg* 2004. 188:27–33 25.
170. Lagergren J, Viklund P. Is esophageal adenocarcinoma occurring late after antireflux surgery due to persistent postoperative reflux? *World J Surg* 2007. 31:465–469 26.
171. Zehetner J, deMeester SR, Ayazi S et al. Long-term follow-up after anti-reflux surgery in patients with Barrett's esophagus. *J Gastrointest Surg* 2010. 14:1483–1491.
172. Rossi M, Barreca M, de Bortoli N et al. Efficacy of Nissen fundoplication versus medical therapy in the regression of lowgrade dysplasia in patients with Barrett esophagus. A prospective study. *Ann Surg* 2006. 243:58–63.
173. Gurski RR, Peters JH, Hagen JA et al. Barrett's esophagus can and does regress after antireflux surgery: a study of prevalence and predictive features. *J Am Coll Surg* 2003. 196:706–712.
174. Raghunath A, Hungin APS, Wooff D, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* in patients with gastro-oesophageal reflux disease: systematic review. *BMJ*. 2003; 326:737.
175. Souza RC, Lima JH. *Helicobacter pylori* and gastroesophageal reflux disease: a review of this intriguing relationship. *Dis Esophagus*. 2009; 22:256–63.
176. Islami F, Kamangar F. *Helicobacter pylori* and esophageal cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Prev Res*. 2008; 1:329–38.
177. El Serag HB, Sonnenberg A. Opposing time trends of peptic ulcer and reflux disease. *Gut*. 1998; 43:327–33.
178. Abe Y, Ohara S, Koike T, et al. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection and the status of gastric acid secretion in patients with Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol*. 2004; 99:1222–5.
179. Wang F, Xia P, Wu F, et al. *Helicobacter pylori vacA* disrupts apical membrane-cytoskeletal interactions in gastric parietal cells. *J Biol Chem*. 2008; 283:26714–25.

180. Raghunath A, Hungin PS, Wooff D, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* in patients with gastro-oesophageal reflux disease: systematic review. *BMJ*. 2003; 326:736–9.
181. Cremonini F, Di Caro S, Delgado-Aros S, et al. Meta-analysis: the relationship between *Helicobacter pylori* infection and gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003; 18:279–89.
182. Saad AM, Choudhary A, Bechtold ML. Effect of *Helicobacter pylori* treatment on gastroesophageal reflux disease (GERD): meta-analysis of randomized controlled trials. *Scand J Gastroenterol*. 2012; 47:129–35.
183. Fischbach LA, Graham DY, Kramer JR, Rugge M, Verstovsek G, Parente P, Alsarraj A, Fitzgerald S, Shaib Y, Abraham NS, Kolpachi A, Gupta S, Vela MF, Velez M, Cole R, Anand B, El Serag HB. Association between *Helicobacter pylori* and Barrett's esophagus: a case-control study. *Am J Gastroenterol*. 2014 Mar;109(3):357-68.
184. Rokkas T, Pistiolas D, Sechopoulos P, et al. relationship between *Helicobacter pylori* infection and esophageal neoplasia: a meta-analysis. *Clin Gastroentero; Hepatol*. 2007; 5:1413–7.
185. Maaros HI, Vorobjova T, Sipponen P, Tammur R, Uibo R, Wadström T, Keevallik R, Villako K. An 18-year follow-up study of chronic gastritis and *Helicobacter pylori* association of CagA positivity with development of atrophy and activity of gastritis. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 864-869.
186. Weston AP, Badr AS, Topalovski M, Cherian R, Dixon A, Hassanein RS. Prospective evaluation of the prevalence of gastric *Helicobacter pylori* infection in patients with GERD, Barrett's esophagus, Barrett's dysplasia, and Barrett's adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 387-394.
187. Wu AH, Crabtree JE, Bernstein L, Hawtin P, Cockburn M, Tseng CC, Forman D. Role of *Helicobacter pylori* CagA+ strains and risk of adenocarcinoma of the stomach and esophagus. *Int J Cancer* 2003; 103: 815-821.
188. 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: 1198-1209.
189. Forman D, Al-Dabbagh S, Doll R. Nitrates, nitrites and gastric cancer in Great Britain. *Nature* 1985; 313: 620-625.
190. Hampel H, Abraham NS, El-Serag HB. Meta-analysis: obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications. *Ann Intern Med* 2005; 143: 199-211.
191. Cook MB, Greenwood DC, Hardie LJ, Wild CP, Forman D. A systematic review and meta-analysis of the risk of increasing adiposity on Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 292-300.

192. Kubo A, Corley DA. Body mass index and adenocarcinomas of the esophagus or gastric cardia: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 872-878.
193. Murray L, Romero Y. Role of obesity in Barrett's esophagus and cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2009; 18: 439-452.
194. de Jonge PJ, Steyerberg EW, Kuipers EJ, Honkoop P, Wolters LM, Kerkhof M, van Dekken H, Siersema PD. Risk factors for the development of esophageal adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1421-1429.
195. Oberg S, Wenner J, Johansson J, Walther B, Willén R. Barrett esophagus: risk factors for progression to dysplasia and adenocarcinoma. *Ann Surg* 2005; 242: 49-54.
196. Björntorp P. Body fat distribution, insulin resistance, and metabolic diseases. *Nutrition*. 1997 Sep;13(9):795-803.
197. Konturek PC, Burnat G, Rau T, Hahn EG, Konturek S. Effect of adiponectin and ghrelin on apoptosis of Barrett adenocarcinoma cell line. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 597-605.
198. Rubenstein JH, Dahlkemper A, Kao JY, Zhang M, Morgenstern H, McMahon L, Inadomi JM. A pilot study of the association of low plasma adiponectin and Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1358-1364.
199. Kendall BJ, Macdonald GA, Hayward NK, Prins JB, Brown I, Walker N, Pandeya N, Green AC, Webb PM, Whiteman DC. Leptin and the risk of Barrett's oesophagus. *Gut* 2008; 57: 448-454.
200. Francois F, Roper J, Goodman AJ, Pei Z, Ghumman M, Mourad M, de Perez AZ, Perez-Perez GI, Tseng CH, Blaser MJ. The association of gastric leptin with oesophageal inflammation and metaplasia. *Gut* 2008; 57: 16-24.
201. Ogunwobi O, Mutungi G, Beales IL. Leptin stimulates proliferation and inhibits apoptosis in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells by cyclooxygenase-2-dependent, prostaglandin E2-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor and c-Jun NH2-terminal kinase activation. *Endocrinology* 2006; 147: 4505-4516.
202. Dornonville de la Cour C, Lindström E, Norlén P, Håkanson R. Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. *Regul Pept* 2004; 120: 23-32.
203. Mottershead M, Karteris E, Barclay JY, Suortamo S, Newbold M, Randeva H, Nwokolo CU. Immunohistochemical and quantitative mRNA assessment of ghrelin expression in gastric and oesophageal adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2007; 60: 405-409.

204. de Martel C, Haggerty TD, Corley DA, Vogelman JH, Orentreich N, Parsonnet J. Serum ghrelin levels and risk of subsequent adenocarcinoma of the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1166-1172.
205. McCarty MF. Up-regulation of IGF binding protein-1 as an anticarcinogenic strategy: relevance to caloric restriction, exercise, and insulin sensitivity. *Med Hypotheses*. 1997 Apr;48(4):297-308.
206. Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Sep 20;92(18):1472-89.
207. Kristal AR, Blount PL, Schenk JM, Sanchez CA, Rabinovitch PS, Odze RD, Standley J, Vaughan TL, Reid BJ. Low-fat, high fruit and vegetable diets and weight loss do not affect biomarkers of cellular proliferation in Barrett esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Oct;14(10):2377-83.
208. Hohenberger P, Gretschel S. Gastric cancer. *Lancet* 2003;362:305–15.
209. Riboli E, Norat T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am J Clin Nutr* 2003;78(3 Suppl):559S–569S. 8. Gonzalez CA, Pera G, Agudo A, Bueno-deMesquita HB, Ceroti M, Boeing H, Schulz M, del GG, Plebani M, Carneiro F, Berrino F, Sacerdote C, et al. Fruit and vegetable intake and the risk of stomach and oesophagus adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). *Int J Cancer* 2006;118:2559–66.
210. Gonzalez CA, Jakszyn P, Pera G, Agudo A, Bingham S, Palli D, Ferrari P, Boeing H, del GG, Plebani M, Carneiro F, Nesi G, et al. Meat intake and risk of stomach and esophageal adenocarcinoma within the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst* 2006;98:345–54.
211. Terry P, Lagergren J, Hansen H, Wolk A, Nyrén O. Fruit and vegetable consumption in the prevention of oesophageal and cardia cancers. *Eur J Cancer Prev* 2001; 10: 365-369.
212. Kristal AR, Blount PL, Schenk JM, Sanchez CA, Rabinovitch PS, Odze RD, Standley J, Vaughan TL, Reid BJ. Low-fat, high fruit and vegetable diets and weight loss do not affect biomarkers of cellular proliferation in Barrett esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2377-2383.
213. Dong LM, Kristal AR, Peters U, Schenk JM, Sanchez CA, Rabinovitch PS, Blount PL, Odze RD, Ayub K, Reid BJ, Vaughan TL. Dietary supplement use and risk of neoplastic progression in esophageal adenocarcinoma: a prospective study. *Nutr Cancer* 2008; 60: 39-48.
214. Jenab M, Riboli E, Ferrari P, Sabate J, Slimani N, Norat T, Friesen M, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, et al. Plasma and dietary vitamin C levels and risk of gastric cancer in the European Prospective

- Investigation into Cancer and Nutrition (EPICEURGAST). *Carcinogenesis* 2006;27:2250–7.
215. Chen H, Tucker KL, Graubard BI, Heineman EF, Markin RS, Potischman NA, Russell RM, Weisenburger DD, Ward MH. Nutrient intakes and adenocarcinoma of the esophagus and distal stomach. *Nutr Cancer* 2002; 42: 33-40.
  216. Rudolph RE, Vaughan TL, Kristal AR, Blount PL, Levine DS, Galipeau PC, Prevo LJ, Sanchez CA, Rabinovitch PS, Reid BJ. Serum selenium levels in relation to markers of neoplastic progression among persons with Barrett's esophagus. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 750-757.
  217. Jeurink SM, Büchner FL, Bueno-de-Mesquita HB, Siersema PD, Boshuizen HC, Numans ME, Dahm CC, Overvad K, Tjønneland A, Roswall N, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Morois S, Kaaks R, Teucher B, Boeing H, Buijsse B, Trichopoulou A, Benetou V, Zylis D, Palli D, Sieri S, Vineis P, Tumino R, Panico S, Ocké MC, Peeters PH, Skeie G, Brustad M, Lund E, Sánchez-Cantalejo E, Navarro C, Amiano P, Ardanaz E, Ramón Quirós J, Hallmans G, Johansson I, Lindkvist B, Regnér S, Khaw KT, Wareham N, Key TJ, Slimani N, Norat T, Vergnaud AC, Romaguera D, Gonzalez CA. Variety in vegetable and fruit consumption and the risk of gastric and esophageal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer*. 2012 Sep 15;131(6):E963-73.
  218. Caygill CP, Johnston DA, Lopez M, Johnston BJ, Watson A, Reed PI, Hill MJ. Lifestyle factors and Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1328-1331.
  219. Gammon MD, Schoenberg JB, Ahsan H, Risch HA, Vaughan TL, Chow WH, Rotterdam H, West AB, Dubrow R, Stanford JL, Mayne ST, Farrow DC, Niwa S, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. Tobacco, alcohol, and socioeconomic status and adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst*. 1997 Sep 3;89(17):1277-84.
  220. Kabat GC, Ng SK, Wynder EL. Tobacco, alcohol intake, and diet in relation to adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Cancer Causes Control* 1993; 4: 123-132.
  221. Zhang ZF, Kurtz RC, Sun M, Karpeh M, Yu GP, Gargon N, Fein JS, Georgopoulos SK, Harlap S. Adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia: medical conditions, tobacco, alcohol, and socioeconomic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 761-768.
  222. Brown LM, Silverman DT, Pottern LM, Schoenberg JB, Greenberg RS, Swanson GM, Liff JM, Schwartz AG, Hayes RB, Blot WJ. Adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction in white men in the United States: alcohol, tobacco, and socioeconomic factors. *Cancer Causes Control* 1994; 5: 333-340.

223. Vaughan TL, Davis S, Kristal A, Thomas DB. Obesity, alcohol, and tobacco as risk factors for cancers of the esophagus and gastric cardia: adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4: 85-92.
224. Menke-Pluymers MB, Hop WC, Dees J, van Blankenstein M, Tilanus HW. Risk factors for the development of an adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett) esophagus. The Rotterdam Esophageal Tumor Study Group. *Cancer* 1993; 72: 1155-1158.
225. Achkar JP, Post AB, Achkar E, Carey WD. Risk of extraesophageal malignancy in patients with adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 39-43.
226. Gray MR, Donnelly RJ, Kingsnorth AN. The role of smoking and alcohol in metaplasia and cancer risk in Barrett's columnar lined oesophagus. *Gut* 1993; 34: 727-731.
227. Levi F, Ollyo JB, La Vecchia C, Boyle P, Monnier P, Savary M. The consumption of tobacco, alcohol and the risk of adenocarcinoma in Barrett's oesophagus. *Int J Cancer* 1990; 45: 852-854.
228. Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, Nyrén O. The role of tobacco, snuff and alcohol use in the aetiology of cancer of the oesophagus and gastric cardia. *Int J Cancer* 2000; 85: 340-346.
229. Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, Chejfec G, Metz A, Sontag SJ. Hiatal hernia size, Barrett's length, and severity of acid reflux are all risk factors for esophageal adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1930-1936.
230. Lou Z, Xing H, Li D (2014) Alcohol Consumption and the Neoplastic Progression in Barrett's Esophagus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 9(10): e105612. doi:10.1371/journal.pone.0105612.
231. Smith KJ, O'Brien SM, Smithers BM, Gotley DC, Webb PM, Green AC, Whiteman DC. Interactions among smoking, obesity, and symptoms of acid reflux in Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2481-2486.
232. 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 Feb;142(2):233-40.
233. Heath EI, Canto MI, Piantadosi S, Montgomery E, Weinstein WM, Herman JG, Dannenberg AJ, Yang VW, Shar AO, Hawk E, Forastiere AA. Secondary chemoprevention of Barrett's esophagus with celecoxib: results of a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 545-557.
234. Gatenby PA, Ramus JR, Caygill CP, Winslet MC, Watson A. Aspirin is not chemoprotective for Barrett's adenocarcinoma of the oesophagus in multicentre cohort. *Eur J Cancer Prev* 2009; 18: 381-384.



235. Macfarlane TV, Lefevre K, Watson MC. Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of upper aerodigestive tract cancer. *Br J Cancer*. 2014 Oct 28;111(9):1852-9.
236. Odze RD. Diagnosis and grading of dysplasia in Barrett's oesophagus. *J Clin Pathol*. 2006 Oct;59(10):1029-38
237. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Roth G, Surawicz CM, Van Belle G, Lewin K, Weinstein WM, Antonioli DA, Goldman H, et al. Observer variation in the diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus. *Hum Pathol*. 1988 Feb;19(2):166-78.
238. Montgomery E, Bronner MP, Goldblum JR, Greenson JK, Haber MM, Hart J, Lamps LW, Lauwers GY, Lazenby AJ, Lewin DN, Robert ME, Toledano AY, Shyr Y, Washington K. Reproducibility of the diagnosis of dysplasia in Barrett esophagus: a reaffirmation. *Hum Pathol*. 2001 Apr;32(4):368-78.
239. Baak JPA, ten Kate FJW, Offerhaus GJA, van Lanschot JJ, Meijer GA. Routine morphometrical analysis can improve reproducibility of dysplasia grade in Barrett's oesophagus surveillance biopsies. *Journal of Clinical Pathology*. 2002;55(12):910-916.
240. Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DE, et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical information. *Hum Pathol* 1983;14:931-68.
241. Lomo LC, Bloun PL, Sanchez CA, et al. Crypt dysplasia with surface maturation: a clinical, pathologic and molecular study of a Barrett's esophagus cohort. *Am J Surg Pathol* 2006;30:423-35.
242. Srivastava A, Hornick JL, Blount PL, et al. Extent of low-grade dysplasia is a risk factor for cancer in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2005;128:A240.
243. Buttar NS, Want KK, Sebo TJ, et al. Extent of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus correlates with risk of adenocarcinoma. *Gastroenterology* 2001;120:1630-9.
244. Ormsby AH, Petras RE, Henricks WH, et al. Observer variation in the diagnosis of superficial oesophageal adenocarcinoma. *Gut* 2002;51:671-6.
245. Rice TW, Falk GW, Achkar E, et al. Surgical management of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 1993;88:1832-6.
246. Bogomoletz WV, Molas G, Gatey B, et al. Superficial squamous cell carcinoma of the esophagus: a report of 76 cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 1989;13:535-46.
247. Westerterp M, Koppert LB, Buskens CJ, et al. Outcome of surgical treatment for early adenocarcinoma of the esophagus or gastro-esophageal junction. *Virchows Arch* 2005;446:497-504.

248. 136 Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease:standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol.* 1983; 14:931–68.
249. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, et al. Observer variation in the diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus. *Hum Pathol.* 1988; 19:166–78.
250. Montgomery E, Goldblum JR, Greenson JK, et al. Dysplasia as a predictive marker for invasive carcinoma in Barrett esophagus:a follow-up study based on 138 cases from a diagnostic variability study. *Hum Pathol.* 2001; 32:379–88.
251. Sharma P, Falk GW, Weston AP, et al. Dysplasia and cancer in a large multicenter cohort of patients with Barrett's esophagus. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006; 4:566–72.
252. Weston AP, Sharma P, Mathur S, et al. Risk stratification of Barrett's esophagus:updated prospective multivariate analysis. *Am J Gastroenterol.* 2004; 99:1657–66.
253. Weston AP, Krmpotich PT, Cherian R, et al. Prospective long-term endoscopic and histological follow-up of short segment Barrett's esophagus:comparison with traditional long segment Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol.* 1997; 92:407–13.
254. Taylor CR. Principles of immunomicroscopy. In: *Immunomicroscopy. A diagnostic Tool for surgical pathologists. Mayor problems in Pathology.* 3rd ed. New York: Saunders, 2006;pp:1- 46.
255. Stone MJ. Monoclonal antibodies in the prehybridoma Era: A brief Historical Perspective and personal Reminiscence. *Clinical Lymphoma* 2001;2;148-54.
256. Kohler G, Milsten C. Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature* 1974;256:495-97.
257. Coiffier B. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene* 2007;26:3603-13.
258. Anthony DC, Dickens AM, Seneca N, Couch Y, Campbell S, Checa B, Kersemans V, Warren EA, Tredwell M, Sibson NR, Gouverneur V, Leppert D. Anti-CD20 inhibits T cell-mediated pathology and microgliosis in the rat brain. *Ann Clin Transl Neurol.* 2014 Sep;1(9):659-69
259. Schiffer CA. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2007;357:258-65.
260. Hudis CA. Trastuzumab-mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 2007;357:39-51.
261. Chuek W, Chan JKC. Subcellular localization of immunohistochemical signals. Knowledge of the ultrastructural of biologic features of the antigens helps predict the signal localization and proper interpretation of immunostains. *Int J Surg Pathol* 2004;185:185-206.

262. Chan JK. Advances in immunohistochemistry: impact on surgical pathology practice. *Semin Diagn Pathol* 2000;17:170-7.
263. Sickel JZ, di Sant'Agnese PA. Anomalous immunostaining of 'optically clear' nuclei in gestational endometrium. A potential pitfall in the diagnosis of pregnancy-related herpesvirus infection. *Arch Pathol Lab Med* 1994;118:831-3.
264. Lau SK, Chu PG, Weiss LM. Immunohistochemical expression of estrogen receptor in pulmonary adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006;14:83-7.
265. Mai KT, Belanger EC. Perivascular epithelioid cell tumour (PEComa) of the soft tissue. *Pathology* 2006;38:415-20.
266. McCluggage WG, Maxwell P, Patterson A, Sloan JM. Immunohistochemical staining of hepatocellular carcinoma with monoclonal antibody against inhibin. *Histopathology* 1997;30:518-22.
267. Lezzoni JC, Mills SE, Pelkey TJ, Stoler MH. Inhibin is not an immunohistochemical marker for hepatocellular carcinoma. An example of the potential pitfall in diagnostic immunohistochemistry caused by endogenous biotin. *Am J Clin Pathol* 1999;111:229-34.
268. Hornick JL, Fletcher CD. Immunohistochemical staining for KIT (CD117) in soft tissue sarcomas is very limited in distribution. *Am J Clin Pathol* 2002;117:188-93.
269. Yantiss RK, Spiro IJ, Compton CC, Rosenberg AE. Gastrointestinal stromal tumor versus intra-abdominal fibromatosis of the bowel wall: a clinically important differential diagnosis. *Am J Surg Pathol* 2000;24:947-57.
270. Barisella M, Andreola S, Rosai J. CD117 in soft tissue sarcomas. *Am J Clin Pathol* 2002;118:470-1.
271. Seidal T, Balaton AJ, Battifora H. Interpretation and quantification of immunostains. *Am J Surg Pathol* 2001;25:1204-7.
272. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2000;24:1016-9.
273. Wick MR, Mills SE. Consensual interpretive guidelines for diagnostic immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2001;25:1208-10.
274. Dow LE, Humbert PO. Polarity regulators and the control of epithelial architecture, cell migration, and tumorigenesis. *Int Rev Cytol* 2007;262:253-302.
275. Rosai J. *Breast en Rosai and Ackerman's surgical pathology*. 9th ed. Vol 2. China: Mosby, 2004;pp:1805-7.
276. Laprise P. Emerging role for epithelial polarity proteins of the Crumbs family as potential tumor suppressors. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:868217.
277. Troxell ML. Reversed MUC1/EMA polarity in both mucinous and micropapillary breast carcinoma. *Hum Pathol*. 2014 Feb;45(2):432-4.

278. Barbashina V, Corben AD, Akram M, Vallejo C, Tan LK. Reversed MUC1/EMA polarity in both mucinous and micropapillary breast carcinoma--reply. *Hum Pathol.* 2014 Feb;45(2):434.
279. Jimbo K, Tsuda H, Yoshida M, Miyagi-Maeshima A, Sasaki-Katsurada Y, Asaga S, Hojo T, Kitagawa Y, Kinoshita T. Mucinous breast carcinoma with a lobular neoplasia component: a subset with aberrant expression of cell adhesion and polarity molecules and lack of neuroendocrine differentiation. *Pathol Int.* 2014 May;64(5):217-23.
280. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, et al. The HER-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 2003;8:307-25.
281. Anastasopoulou EA, Voutsas IF, Keramitsoglou T, Gouttefangeas C, Kalbacher H, Thanos A, Papamichail M, Perez SA, Baxevanis CN. A pilot study in prostate cancer patients treated with the AE37 li-key-HER-2/neu polypeptide vaccine suggests that HLA-A\*24 and HLA-DRB1\*11 alleles may be prognostic and predictive biomarkers for clinical benefit. *Cancer Immunol Immunother.* 2015 May 31.
282. Lin CS, Chang SC, Ou LH, Chen CM, Hsieh SS, Chung YP, King KL, Lin SL, Wei YH. Mitochondrial DNA alterations correlate with the pathological status and the immunological ER, PR, HER-2/neu, p53 and Ki-67 expression in breast invasive ductal carcinoma. *Oncol Rep.* 2015 Jun;33(6):2924-34.
283. Bayoglu IV, Kucukzeybek BB, Kucukzeybek Y, Varol U, Yildiz I, Alacacioglu A, Akyol M, Demir L, Dirican A, Yildiz Y, Salman T, Tarhan MO. Prognostic value of mesothelin expression in patients with triple negative and HER2-positive breast cancers. *Biomed Pharmacother.* 2015 Mar;70:190-5.
284. Wesolowski R, Carson WE 3rd. Tumor Infiltrating Lymphocytes - The Next Step in Assessing Outcome and Response to Treatment in Patients with Breast Cancer. *J Carcinog Mutagen.* 2014 Dec;5(6). pii: 199.
285. Dennie T. Metastatic, her-2 amplified lacrimal gland carcinoma with response to lapatinib treatment. *Case Rep Oncol Med.* 2015;2015:262357.
286. Shayanfar N, Bahari L, Safaie-Naraghi Z, Kamyab K, Gheytonchi E, Rezaei N. Negative HER2/neu amplification using immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization techniques in skin melanoma cases. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(2):421-5.
287. Cheng Y, Zhou J, Li H. Clinicopathologic Implications of Eukaryotic Initiation Factor 3f and Her-2/neu Expression in Gastric Cancer. *Clin Transl Sci.* 2015 Feb 14.
288. Ryška A, Hovorková E, Sobande F, Rozkoš T, Laco J, Hornychová H. [Hopes and pitfalls of the molecular classification of breast cancer]. *Cesk Patol.* 2015 Jan;51(1):26-32.

289. Perez EA, Thompson EA, Ballman KV, Anderson SK, Asmann YW, Kalari KR, Eckel-Passow JE, Dueck AC, Tenner KS, Jen J, Fan JB, Geiger XJ, McCullough AE, Chen B, Jenkins RB, Sledge GW, Winer EP, Gralow JR, Reinholz MM. Genomic analysis reveals that immune function genes are strongly linked to clinical outcome in the North Central Cancer Treatment Group n9831 Adjuvant Trastuzumab Trial. *J Clin Oncol.* 2015 Mar 1;33(7):701-8.
290. Marano L, Roviello F. The distinctive nature of HER2-positive gastric cancers. *Eur J Surg Oncol.* 2015 Mar;41(3):271-3.
291. Gokavarapu S, Fonseca D, Puthamakula S, Reddy BP, Reddy BS, Murthy S. HER2/neu negative salivary duct carcinoma of parotid: A case with forty months recurrence free follow up. *Int J Surg Case Rep.* 2015;8C:22-4.
292. Chen CK, Lee MY, Lin WL, Wang YT, Han CP, Yu CP, Chao WR. A qualitative study comparing the assay performance characteristics between the 2007 and the 2013 American Society for Clinical Oncology and College of American Pathologists HER2 scoring methods in mucinous epithelial ovarian cancer. *Medicine (Baltimore).* 2014 Dec;93(27):e171.
293. Nam S, Chang HR, Jung HR, Gim Y, Kim NY, Grailhe R, Seo HR, Park HS, Balch C, Lee J, Park I, Jung SY, Jeong KC, Powis G, Liang H, Lee ES, Ro J, Kim YH. A pathway-based approach for identifying biomarkers of tumor progression to trastuzumab-resistant breast cancer. *Cancer Lett.* 2015 Jan 28;356(2 Pt B):880-90.
294. Lee HJ, Seo AN, Kim EJ, Jang MH, Suh KJ, Ryu HS, Kim YJ, Kim JH, Im SA, Gong G, Jung KH, Park IA, Park SY. HER2 heterogeneity affects trastuzumab responses and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 2014 Dec;142(6):755-66.
295. Sheffield BS, Garratt J, Kalloger SE, Li-Chang HH, Torlakovic EE, Gilks CB, Schaeffer DF. HER2/neu testing in gastric cancer by immunohistochemistry: assessment of interlaboratory variation. *Arch Pathol Lab Med.* 2014 Nov;138(11):1495-502.
296. Kobayakov DS, Avdalyan AM, Bobrov IP, Bychkova EY, Lazarev AF, Lushnikova EL, Nepomnyashchikh LM. Correlation of HER-2/Neu protein expression and HER2 gene amplification with clinical morphological parameters of nonsmall cell lung cancer. *Bull Exp Biol Med.* 2014 Oct;157(6):789-93.
297. Zhu GJ, Xu CW, Fang MY, Zhang YP, Li Y. Detection of Her-2/neu expression in gastric cancer: Quantitative PCR versus immunohistochemistry. *Exp Ther Med.* 2014 Nov;8(5):1501-1507.
298. von Minckwitz G, Puglisi F, Cortes J, Vrdoljak E, Marschner N, Zielinski C, Villanueva C, Romieu G, Lang I, Ciruelos E, De Laurentiis M, Veyret C, de Ducla S, Freudensprung U, Srock S, Gligorov J. Bevacizumab plus chemotherapy versus

- chemotherapy alone as second-line treatment for patients with HER2-negative locally recurrent or metastatic breast cancer after first-line treatment with bevacizumab plus chemotherapy (TANIA): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014 Oct;15(11):1269-78. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70439-5.
299. Putti TC, To KF, Hsu HC, Chan AT, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in head and neck cancers correlates with clinical progression: a multicentre immunohistochemical study in the Asia-Pacific region. *Histopathology* 2002;41:144-51.
300. Zandi R, Larsen AB, Andersen P, Stockhausen MT, Poulsen HS. Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal* 2007;9:2013-23.
301. Boeckx C, Van den Bossche J, De Pauw I, Peeters M, Lardon F, Baay M, Wouters A. The hypoxic tumor microenvironment and drug resistance against EGFR inhibitors: preclinical study in cetuximab-sensitive head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *BMC Res Notes.* 2015 Jun 2;8(1):203.
302. Al-Shamsi HO, Alhazzani W, Wolff RA. Extended RAS testing in metastatic colorectal cancer-Refining the predictive molecular biomarkers. *J Gastrointest Oncol.* 2015 Jun;6(3):314-21.
303. Sha H, Li R, Bian X, Liu Q, Xie C, Xin X, Kong W, Qian X, Jiang X, Hu W, Liu B. A tumor-penetrating recombinant protein anti-EGFR-iRGD enhance efficacy of paclitaxel in 3D multicellular spheroids and gastric cancer in vivo. *Eur J Pharm Sci.* 2015 May 19. pii: S0928-0987(15)00271-7.
304. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Overcoming Resistance to Anti-EGFR Therapy in Colorectal Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2015;35:e149-56.
305. Rowland A, Dias MM, Wiese MD, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS, Sorich MJ. Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2015 May 19. doi: 10.1038/bjc.2015.173. [Epub ahead of print].
306. Srivastava RM, Trivedi S, Concha-Benavente F, Jie HB, Wang L, Seethala RR, Branstetter BF, Ferrone S, Ferris RL. STAT1 Induced HLA class I Upregulation Enhances Immunogenicity and Clinical Response to anti-EGFR mAb Cetuximab Therapy in HNC Patients. *Cancer Immunol Res.* 2015 May 13. pii: canimm.0053.2015. [Epub ahead of print].
307. Song QB, Wang Q, Hu WG. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer: A meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2015 Apr 14;21(14):4365-72.
308. Do K, Cao L, Kang Z, Turkbey B, Lindenberg ML, Larkins E, Holkova B, Steinberg SM, Raffeld M, Peer CJ, Figg WD, Eugeni M, Jacobs P, Choyke P, Wright JJ,

- Doroshov JH, Kummar S. A Phase II Study of Sorafenib Combined With Cetuximab in EGFR-Expressing, KRAS-Mutated Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2015 Mar 7. pii: S1533-0028(15)00036-5. doi: 10.1016/j.clcc.2015.02.007. [Epub ahead of print].
309. Okamoto K, Maeda H, Shiga T, Shiga M, Dabanaka K, Hanazaki K, Kobayashi M. Cetuximab and panitumumab in a patient with colon cancer and concomitant chronic skin disease: a potential beneficial effect on psoriasis vulgaris. *World J Gastroenterol*. 2015 Mar 28;21(12):3746-9.
310. Graham CN, Hechmati G, Fakhri MG, Knox HN, Maglinte GA, Hjelmgren J, Barber B, Schwartzberg LS. Cost-minimization analysis of panitumumab compared with cetuximab for first-line treatment of patients with wild-type RAS metastatic colorectal cancer. *J Med Econ*. 2015 May 20:1-10.
311. Papadimitriou K, Rolfo C, Dewaele E, Van De Wiel M, Van den Brande J, Altintas S, Huizing M, Specenier P, Peeters M. Incorporating anti-VEGF pathway therapy as a continuum of care in metastatic colorectal cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2015 Apr;16(4):18.
312. Li A, Huang X, Song Y, Chen X, Sun J, Xu H, Wang Z. Anti-epidermal growth factor receptor-targeted therapy in upper gastrointestinal tract cancers: a meta-analysis. *Growth Factors*. 2015 Apr;33(2):113-27
313. Khattak MA, Martin H, Davidson A, Phillips M. Role of first-line anti-epidermal growth factor receptor therapy compared with anti-vascular endothelial growth factor therapy in advanced colorectal cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Clin Colorectal Cancer*. 2015 Jun;14(2):81-90.
314. Forero A, Lobuglio AF. History of antibody therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol* 2003;30(6 Suppl 17):1-5.
315. Robak T, Huang H, Jin J, Zhu J, Liu T, Samoilo O, Pylypenko H, Verhoef G, Siritanaratkul N, Osmanov E, Alexeeva J, Pereira J, Drach J, Mayer J, Hong X, Okamoto R, Pei L, Rooney B, van de Velde H, Cavalli F; LYM-3002 Investigators. Bortezomib-based therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2015 Mar 5;372(10):944-53.
316. Oak E, Bartlett NL. Blinatumomab for the treatment of B-cell lymphoma. *Expert Opin Investig Drugs*. 2015 May;24(5):715-24.
317. Tsang M, Shanafelt TD, Call TG, Ding W, Chanan-Khan A, Leis JF, Nowakowski GS, Bowen D, Conte M, Schwager SM, Slager SL, Kay NE, Hanson CA, Parikh SA. The efficacy of ibrutinib in the treatment of Richter syndrome. *Blood*. 2015 Mar 5;125(10):1676-8.
318. Tallman MS. Monoclonal antibody therapies in leukemias. *Semin Hematol* 2002;39:12-9.

319. Horne GA, Kinstrie R, Copland M. Novel drug therapies in myeloid leukemia: a patent review. *Pharm Pat Anal*. 2015 May;4(3):187-205.
320. Jabbour E, O'Brien S, Ravandi F, Kantarjian H. Monoclonal antibodies in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015 May 21. pii: blood-2014-08-596403. [Epub ahead of print]
321. Annesley CE, Brown P. Novel agents for the treatment of childhood acute leukemia. *Ther Adv Hematol*. 2015 Apr;6(2):61-79.
322. Obinutuzumab (Gazyva) for chronic lymphocytic leukemia. *Med Lett Drugs Ther*. 2014 Nov 10;56(1455):e114-5.
323. Quinquenel A, Willekens C, Dupuis J, Royer B, Ysebaert L, De Guibert S, Michallet AS, Feugier P, Guieze R, Levy V, Delmer A. Bendamustine and rituximab combination in the management of chronic lymphocytic leukemia-associated autoimmune hemolytic anemia: a multicentric retrospective study of the French CLL intergroup (GCFLLC/MW and GOELAMS). *Am J Hematol*. 2015 Mar;90(3):204-7.
324. Patel JN, Jiang C, Hertz DL, Mulkey FA, Owzar K, Halabi S, Ratain MJ, Friedman PN, Small EJ, Carducci MA, Mahoney JF, Kelley MJ, Morris MJ, Kelly WK, McLeod HL. Bevacizumab and the risk of arterial and venous thromboembolism in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer treated on Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 90401 (Alliance). *Cancer*. 2015 Apr 1;121(7):1025-31
325. Castro JE, Choi MY, Carvajal T, Almahasnah E, Chang J, James DF, Kipps TJ. Ofatumumab and high-dose methylprednisolone for the treatment of patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J*. 2014 Nov 14;4:e258.
326. Frenso Forcellado MF. Determinación inmunohistoquímica de CD117 /c-kit en el GIST (tumor estromal gastrointestinal). *Oncología* 2004;27:242-45.
327. Dematteo RP, Heinrich MC, El-Rifai WM, Demetri G. Clinical management of gastrointestinal stromal tumors: before and after STI-571. *Hum Pathol* 2002;33:466-77.
328. Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A, Miettinen M. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol* 1998;11:728-34.
329. Makhlof HR, Remotti HE, Ishak KG. Expression of KIT (CD117) in angiomyolipoma. *Am J Surg Pathol* 2002;26:493-7.
330. Wang C, Jin MS, Zou YB, Gao JN, Li XB, Peng F, Wang HY, Wu ZD, Wang YP, Duan XM. Diagnostic significance of DOG-1 and PKC- $\theta$  expression and c-Kit/PDGFR mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Scand J Gastroenterol*. 2013 Sep;48(9):1055-65.



331. Ni S, Huang D, Chen X, Huang J, Kong Y, Xu Y, Du X, Sheng W. c-kit gene mutation and CD117 expression in human anorectal melanomas. *Hum Pathol.* 2012 Jun;43(6):801-7.
332. Sharawat SK, Gupta R, Raina V, Kumar L, Sharma A, Iqbal S, Bakhshi R, Vishnubhatla S, Bakhshi S. Increased coexpression of c-KIT and FLT3 receptors on myeloblasts: independent predictor of poor outcome in pediatric acute myeloid leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2013 Nov-Dec;84(6):390-7.
333. Heger K, Seidler B, Vahl JC, Schwartz C, Kober M, Klein S, Voehringer D, Saur D, Schmidt-Supprian M. CreER(T2) expression from within the c-Kit gene locus allows efficient inducible gene targeting in and ablation of mast cells. *Eur J Immunol.* 2014 Jan;44(1):296-306.
334. Lau ST, Hansford LM, Chan WK, Chan GC, Wan TS, Wong KK, Kaplan DR, Tam PK, Ngan ES. Prokineticin signaling is required for the maintenance of a de novo population of c-KIT<sup>+</sup> cells to sustain neuroblastoma progression. *Oncogene.* 2015 Feb 19;34(8):1019-34.
335. Beadling C, Patterson J, Justusson E, Nelson D, Pantaleo MA, Hornick JL, Chacón M, Corless CL, Heinrich MC. Gene expression of the IGF pathway family distinguishes subsets of gastrointestinal stromal tumors wild type for KIT and PDGFRA. *Cancer Med.* 2013 Feb;2(1):21-31.
336. Mikami T, Nemoto Y, Numata Y, Hana K, Nakada N, Ichinoe M, Murakumo Y, Okayasu I. Small gastrointestinal stromal tumor in the stomach: identification of precursor for clinical gastrointestinal stromal tumor using c-kit and  $\alpha$ -smooth muscle actin expression. *Hum Pathol.* 2013 Dec;44(12):2628-35.
337. Zhao F, Chen Y, Wu Q, Wang Z, Lu J. Prognostic value of CD117 in cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Feb 15;7(3):1012-21
338. Wallander ML, Layfield LJ, Tripp SR, Schmidt RL. Gastrointestinal stromal tumors: clinical significance of p53 expression, MDM2 amplification, and KIT mutation status. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2013 Jul;21(4):308-12
339. Bischof DA, Dodson R, Jimenez MC, Behman R, Cocieru A, Blazer DG 3rd, Fisher SB, Squires MH 3rd, Kooby DA, Maithel SK, Groeschl RT, Gamblin TC, Bauer TW, Karanicolas PJ, Law C, Queresby FA, Pawlik TM. Adherence to Guidelines for Adjuvant Imatinib Therapy for GIST: A Multi-institutional Analysis. *J Gastrointest Surg.* 2015 Jun;19(6):1022-8.
340. Trent JC, Subramanian MP. Managing GIST in the imatinib era: optimization of adjuvant therapy. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2014 Dec;14(12):1445-59.
341. Rutkowski P, Gronchi A, Hohenberger P, Bonvalot S, Schöffski P, Bauer S, Fumagalli E, Nyckowski P, Nguyen BP, Kerst JM, Fiore M, Bylina E, Hoiczky M, Cats A, Casali PG, Le Cesne A, Treckmann J, Stoeckle E, de Wilt JH, Sleijfer S, Tielen R,

- van der Graaf W, Verhoef C, van Coevorden F. Neoadjuvant imatinib in locally advanced gastrointestinal stromal tumors (GIST): the EORTC STBSG experience. *Ann Surg Oncol*. 2013 Sep;20(9):2937-43.
342. Reid T. Reintroduction of imatinib in GIST. *J Gastrointest Cancer*. 2013 Dec;44(4):385-92. doi: 10.1007/s12029-013-9532-4. Review.
343. Del Muro XG. Nilotinib, imatinib, and GIST therapy. *Lancet Oncol*. 2015 May;16(5):483-4.
344. Nakatsuka SI, Oji Y, Horiuchi T, et al. Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Mod Pathol* 2006;19:804-14.
345. Wang Y, Xiao M, Chen X, Chen L, Xu Y, Lv L, Wang P, Yang H, Ma S, Lin H, Jiao B, Ren R, Ye D, Guan KL, Xiong Y. WT1 recruits TET2 to regulate its target gene expression and suppress leukemia cell proliferation. *Mol Cell*. 2015 Feb 19;57(4):662-73
346. Ho PA, Alonzo TA, Gerbing RB, Kuhn J, Pollard JA, Hirsch B, Raimondi SC, Gamis AS, Meshinchi S. The prognostic effect of high diagnostic WT1 gene expression in pediatric AML depends on WT1 SNP rs16754 status: report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 Jan;61(1):81-8.
347. Brett A, Pandey S, Fraizer G. The Wilms' tumor gene (WT1) regulates E-cadherin expression and migration of prostate cancer cells. *Mol Cancer*. 2013 Jan 8;12:3.
348. Rauscher J, Beschorner R, Gierke M, Bisdas S, Braun C, Ebner FH, Schittenhelm J. WT1 expression increases with malignancy and indicates unfavourable outcome in astrocytoma. *J Clin Pathol*. 2014 Jul;67(7):556-61.
349. Matalka I, Obeidat B, Mohtaseb A, Awamleh A. The significance of Wilms Tumor Gene (WT1) and p53 expression in curettage specimens of patients with endometrial carcinomas. *Pathol Res Pract*. 2013 Jan 15;209(1):19-23
350. Becker H, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Metzeler KH, Whitman SP, Schwind S, Kohlschmidt J, Wu YZ, Powell BL, Carter TH, Kolitz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Moore JO, Caligiuri MA, Larson RA, Marcucci G, Bloomfield CD. Clinical outcome and gene- and microRNA-expression profiling according to the Wilms tumor 1 (WT1) single nucleotide polymorphism rs16754 in adult de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Haematologica*. 2011 Oct;96(10):1488-95.
351. Katuri V, Gerber S, Qiu X, McCarty G, Goldstein SD, Hammers H, Montgomery E, Chen AR, Loeb DM. WT1 regulates angiogenesis in Ewing Sarcoma. *Oncotarget*. 2014 May 15;5(9):2436-49.
352. Choi EJ, Yun JA, Jeon EK, Won HS, Ko YH, Kim SY. Prognostic significance of RSPO1, WNT1, P16, WT1, and SDC1 expressions in invasive ductal carcinoma of the breast. *World J Surg Oncol*. 2013 Dec 27;11:314.

353. Bandopadhyay P, Jabbour AM, Riffkin C, Salmanidis M, Gordon L, Popovski D, Rigby L, Ashley DM, Watkins DN, Thomas DM, Algar E, Ekert PG. The oncogenic properties of EWS/WT1 of desmoplastic small round cell tumors are unmasked by loss of p53 in murine embryonic fibroblasts. *BMC Cancer*. 2013 Dec 9;13:585.
354. Kim A, Park EY, Kim K, Lee JH, Shin DH, Kim JY, Park do Y, Lee CH, Sol MY, Choi KU, Kim JI, Lee IS. Prognostic significance of WT1 expression in soft tissue sarcoma. *World J Surg Oncol*. 2014 Jul 16;12:214
355. Gregg JL, Brown KE, Mintz EM, Piontkivska H, Fraizer GC. Analysis of gene expression in prostate cancer epithelial and interstitial stromal cells using laser capture microdissection. *BMC Cancer*. 2010 Apr 28;10:165.
356. Pileri SA, Ascani S, Leoncini L, Sabatini E, et al. Hodgkin's lymphoma: the pathologist's viewpoint. *J Clin Pathol* 2002;55:162-76.
357. Torlakovic E, Torlakovic G, Nguyen PL, Brunning RD, Delabie J. The value of anti-pax-5 immunostaining in routinely fixed and paraffin-embedded sections: a novel pan pre-B and B-cell marker. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1343-50.
358. Manuel M, Price DJ. Role of Pax6 in forebrain regionalization. *Brain Res Bull* 2005;66:387-93.
359. Dziarmaga A, Quinlan J, Goodyer P. Renal hypoplasia: lessons from Pax2. *Pediatr Nephrol* 2006;21:26-31.
360. Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA. PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol* 2007;73:1-14.
361. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* 2007;8:463-70.
362. Medeiros J, Elenitoba-Johnson KSJ. Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2007;127:707-22.
363. Crapoulet N, O'Brien P, Ouellette RJ, Robichaud GA. Coordinated expression of Pax-5 and FAK1 in metastasis. *Anticancer Agents Med Chem*. 2011 Sep;11(7):643-9.
364. O'Brien P, Morin P Jr, Ouellette RJ, Robichaud GA. The Pax-5 gene: a pluripotent regulator of B-cell differentiation and cancer disease. *Cancer Res*. 2011 Dec 15;71(24):7345-50.
365. Li CG, Eccles MR. PAX Genes in Cancer; Friends or Foes? *Front Genet*. 2012 Jan 31;3:6.
366. Paixão-Côrtes VR, Salzano FM, Bortolini MC. Evolutionary history of chordate PAX genes: dynamics of change in a complex gene family. *PLoS One*. 2013 Sep 2;8(9):e73560.
367. Blake JA, Ziman MR. Pax genes: regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance. *Development*. 2014 Feb;141(4):737-51

368. Abraham S, Paknikar R, Bhumbra S, Luan D, Garg R, Dressler GR, Patel SR. The Groucho-associated phosphatase PPM1B displaces Pax transactivation domain interacting protein (PTIP) to switch the transcription factor Pax2 from a transcriptional activator to a repressor. *J Biol Chem*. 2015 Mar 13;290(11):7185-94.
369. Sun N, Meng Q, Tian A. Expressions of the anti-apoptotic genes Bag-1 and Bcl-2 in colon cancer and their relationship. *Am J Surg*. 2010 Sep;200(3):341-5.
370. Ozer H, Yenicesu G, Arici S, Cetin M, Tuncer E, Cetin A. Immunohistochemistry with apoptotic-antiapoptotic proteins (p53, p21, bax, bcl-2), c-kit, telomerase, and metallothionein as a diagnostic aid in benign, borderline, and malignant serous and mucinous ovarian tumors. *Diagn Pathol*. 2012 Sep 20;7:124.
371. Gurlek U, Demiroz Abakay C, Ozkan L, Saraydaroglu O, Kurt M, Kahraman Çetintas S. The evaluation of bcl-2 expression as a prognostic marker in early stage laryngeal cancer. *Tumori*. 2013 Nov-Dec;99(6):682-8.
372. Asmarinah A, Paradowska-Dogan A, Kodariah R, Tanuhardja B, Waliszewski P, Mochtar CA, Weidner W, Hinsch E. Expression of the Bcl-2 family genes and complexes involved in the mitochondrial transport in prostate cancer cells. *Int J Oncol*. 2014 Oct;45(4):1489-96
373. Seong MK, Lee JY, Byeon J, Sohn YJ, Seol H, Lee JK, Kim EK, Kim HA, Noh WC. Bcl-2 is a highly significant prognostic marker of hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Feb;150(1):141-8
374. Ortiz-Hidalgo C, de la Vega G, de León Bojorge B. Linfoma de células grandes con matriz fibrilar y formación de pseudorrosetas. *An Med Soc Med Hosp ABC* 1993;38:34-3.
375. Pillozzi E, Pulford K, Jones M, Müller-Hermelink HK, Falini B, Ralfkiaer E, Pileri S, Pezzella F, De Wolf-Peeters C, Arber D, Stein H, Mason D, Gatter K. Co-expression of CD79a (JCB117) and CD3 by lymphoblastic lymphoma. *J Pathol*. 1998 Oct;186(2):140-3.
376. Thomas R, Smith KC, Gould R, Gower SM, Binns MM, Breen M. Molecular cytogenetic analysis of a novel high-grade canine T-lymphoblastic lymphoma demonstrating co-expression of CD3 and CD79a cell markers. *Chromosome Res*. 2001;9(8):649-57.
377. Mason DY, Cordell JL, Brown MH, Borst J, Jones M, Pulford K, Jaffe E, Ralfkiaer E, Dallenbach F, Stein H, et al. CD79a: a novel marker for B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples. *Blood*. 1995 Aug 15;86(4):1453-9.
378. Chang SH, Lee HR. Peripheral T Cell Non-Hodgkin's Lymphoma following Treatment of Hodgkin's Lymphoma. *Case Rep Oncol Med*. 2015;2015:438385.

379. Bischof D, Pulford K, Mason DY, Morris SW. Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis. *Mol Cell Biol* 1997;17:2312-25.
380. Bai RY, Dieter P, Peschel C, Morris SW, Duyster J. Nucleophosmin- anaplastic lymphoma kinase of large-cell anaplastic lymphoma is a constitutively active tyrosine kinase that utilizes phospholipase C-gamma to mediate its mitogenicity. *Mol Cell Biol* 1998;18:6951-61.
381. Bai RY, Dieter P, Peschel C, Morris SW, Duyster J. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of large-cell anaplastic lymphoma is a constitutively active tyrosine kinase that utilizes phospholipase C-gamma to mediate its mitogenicity. *Mol Cell Biol*. 1998 Dec;18(12):6951-61.
382. Turturro F, Frist AY, Arnold MD, Seth P, Pulford K. Biochemical differences between SUDHL-1 and KARPAS 299 cells derived from t(2;5)-positive anaplastic large cell lymphoma are responsible for the different sensitivity to the antiproliferative effect of p27(Kip1). *Oncogene*. 2001 Jul 27;20(33):4466-75.
383. Bonvini P, Gastaldi T, Falini B, Rosolen A. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK), a novel Hsp90-client tyrosine kinase: down-regulation of NPM-ALK expression and tyrosine phosphorylation in ALK(+) CD30(+) lymphoma cells by the Hsp90 antagonist 17-allylamino,17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res*. 2002 Mar 1;62(5):1559-66.
384. Ouyang T, Bai RY, Bassermann F, von Klitzing C, Klumpen S, Miething C, Morris SW, Peschel C, Duyster J. Identification and characterization of a nuclear interacting partner of anaplastic lymphoma kinase (NIPA). *J Biol Chem*. 2003 Aug 8;278(32):30028-36.
385. Cussac D, Greenland C, Roche S, Bai RY, Duyster J, Morris SW, Delsol G, Allouche M, Payrastre B. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of anaplastic large-cell lymphoma recruits, activates, and uses pp60c-src to mediate its mitogenicity. *Blood*. 2004 Feb 15;103(4):1464-71.
386. Christensen JG, Zou HY, Arango ME, Li Q, Lee JH, McDonnell SR, Yamazaki S, Alton GR, Mroczkowski B, Los G. Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther*. 2007 Dec;6(12 Pt 1):3314-22.
387. Shi B, Vishwamitra D, Granda JG, Whitton T, Shi P, Amin HM. Molecular and functional characterizations of the association and interactions between nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase and type I insulin-like growth factor receptor. *Neoplasia*. 2013 Jun;15(6):669-83.

388. Wlodarska I, De Wolf-Peeters C, Falini B, Verhoef G, Morris SW, Hagemeijer A, Van den Berghe H. The cryptic inv(2)(p23q35) defines a new molecular genetic subtype of ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*. 1998 Oct 15;92(8):2688-95.
389. Lamant L, Dastugue N, Pulford K, Delsol G, Mariame B. A new fusion gene TPM3-ALK in anaplastic large cell lymphoma created by a (1;2)(q25;p23) translocation. *Blood* 1999;93:3088-95.
390. Siebert R, Gesk S, Harder L, Steinemann D, Grote W, Schlegelberger B, Tiemann M, Wlodarska I, Schemmel V. Complex variant translocation t(1;2) with TPM3-ALK fusion due to cryptic ALK gene rearrangement in anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*. 1999 Nov 15;94(10):3614-7.
391. Touriol C, Greenland C, Lamant L, Pulford K, et al. Further demonstration of the diversity of chromosomal changes involving 2p23 in ALK-positive lymphoma: 2 cases expressing ALK kinase fused to CLTCL (clathrin chain polypeptide-like). *Blood* 2000;95:3204-7.
392. Touriol C, Greenland C, Lamant L, Pulford K, Bernard F, Rousset T, Mason DY, Delsol G. Further demonstration of the diversity of chromosomal changes involving 2p23 in ALK-positive lymphoma: 2 cases expressing ALK kinase fused to CLTCL (clathrin chain polypeptide-like). *Blood*. 2000 May 15;95(10):3204-7.
393. Cheuk W, Chan JK. Timely topic: anaplastic lymphoma kinase (ALK) spreads its influence. *Pathology*. 2001 Feb;33(1):7-12. Review. PubMed PMID: 11280613.
394. Armstrong F, Lamant L, Hieblot C, Delsol G, Touriol C. TPM3-ALK expression induces changes in cytoskeleton organisation and confers higher metastatic capacities than other ALK fusion proteins. *Eur J Cancer*. 2007 Mar;43(4):640-6.
395. Bohling SD, Jenson SD, Crockett DK, Schumacher JA, Elenitoba-Johnson KS, Lim MS. Analysis of gene expression profile of TPM3-ALK positive anaplastic large cell lymphoma reveals overlapping and unique patterns with that of NPM-ALK positive anaplastic large cell lymphoma. *Leuk Res*. 2008 Mar;32(3):383-93.
396. Kelleher FC, McDermott R. The emerging pathogenic and therapeutic importance of the anaplastic lymphoma kinase gene. *Eur J Cancer*. 2010 Sep;46(13):2357-68.
397. Delsol G. [Molecular abnormalities in lymphomas]. *Bull Cancer*. 2010 Nov;97(11):1347-64.
398. Shin S, Kim J, Yoon SO, Kim YR, Lee KA. ALK-positive anaplastic large cell lymphoma with TPM3-ALK translocation. *Leuk Res*. 2012 Jul;36(7):e143-5.
399. Wagner F, Streubel A, Roth A, Stephan-Falkenau S, Mairinger T. Chromogenic in situ hybridisation (CISH) is a powerful method to detect ALK-positive non-small cell lung carcinomas. *J Clin Pathol*. 2014 May;67(5):403-7
400. Hoshino A, Nomura K, Hamashima T, Isobe T, Seki M, Hiwatari M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Takita J, Kanegane H.

- Aggressive transformation of anaplastic large cell lymphoma with increased number of ALK-translocated chromosomes. *Int J Hematol.* 2015 Feb;101(2):198-202.
401. Griffin CA, Hawkins AL, Dvorak C, Henkle C, Ellingham T, Perlman EJ. Recurrent involvement of 2p23 in inflammatory myofibroblastic tumors. *Cancer Res* 1999;15(59):2776-80.
  402. Lawrence B, Perez-Atayde A, Hibbard MK, Rubin BP, et al. TPM3-ALK and TPM4-ALK oncogenes in inflammatory myofibroblastic tumors. *Am J Pathol* 2000;157:377-84.
  403. Cook JR, Dehner LP, Collins MH, Ma Z, et al. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) expression in the inflammatory myofibroblastic tumor: a comparative immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 2001;25:1364-71.
  404. Chan JK, Cheuk W, Shimizu M. Anaplastic lymphoma kinase expression in inflammatory pseudotumors. *Am J Surg Pathol* 2001;25:761-8.
  405. Debelenko LV, Arthur DC, Pack SD, Helman LJ, Schrupp DS, Tsokos M. Identification of CARS-ALK fusion in primary and metastatic lesions of an inflammatory myofibroblastic tumor. *Lab Invest.* 2003 Sep;83(9):1255-65.
  406. Tsuzuki T, Magi-Galluzzi C, Epstein JI. ALK-1 expression in inflammatory myofibroblastic tumor of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol.* 2004 Dec;28(12):1609-14.
  407. Sukov WR, Cheville JC, Carlson AW, Shearer BM, Piatigorsky EJ, Grogg KL, Sebo TJ, Sinnwell JP, Ketterling RP. Utility of ALK-1 protein expression and ALK rearrangements in distinguishing inflammatory myofibroblastic tumor from malignant spindle cell lesions of the urinary bladder. *Mod Pathol.* 2007 May;20(5):592-603.
  408. Chen ST, Lee JC. An inflammatory myofibroblastic tumor in liver with ALK and RANBP2 gene rearrangement: combination of distinct morphologic, immunohistochemical, and genetic features. *Hum Pathol.* 2008 Dec;39(12):1854-8.
  409. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Sugawara E, Hatano S, Asaka R, Okumura S, Nakagawa K, Mano H, Ishikawa Y. Pulmonary inflammatory myofibroblastic tumor expressing a novel fusion, PPFIBP1-ALK: reappraisal of anti-ALK immunohistochemistry as a tool for novel ALK fusion identification. *Clin Cancer Res.* 2011 May 15;17(10):3341-8.
  410. Fuehrer NE, Keeney GL, Ketterling RP, Knudson RA, Bell DA. ALK-1 protein expression and ALK gene rearrangements aid in the diagnosis of inflammatory myofibroblastic tumors of the female genital tract. *Arch Pathol Lab Med.* 2012 Jun;136(6):623-6.
  411. Parra-Herran C, Quick CM, Howitt BE, Dal Cin P, Quade BJ, Nucci MR. Inflammatory myofibroblastic tumor of the uterus: clinical and pathologic review of

- 10 cases including a subset with aggressive clinical course. *Am J Surg Pathol*. 2015 Feb;39(2):157-68.
412. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984;226(4678):1097-9.
413. Verma YK, Gangenahalli GU, Singh VK, Gupta P, et al. Cell death regulation by B-cell lymphoma protein. *Apoptosis* 2006;11:459-71.
414. Bosch R, Dieguez-Gonzalez R, Céspedes MV, Parreño M, Pavón MÁ, Grañena A, Sierra J, Mangués R, Casanova I. A novel inhibitor of focal adhesion signaling induces caspase-independent cell death in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2011 Oct 20;118(16):4411-20.
415. Thompson RC, Vardinogiannis I, Gilmore TD. The sensitivity of diffuse large B-cell lymphoma cell lines to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis is modulated by BCL-2 family protein activity. *PLoS One*. 2013 May 7;8(5):e62822.
416. Akl H, Vervloessem T, Kiviluoto S, Bittremieux M, Parys JB, De Smedt H, Bultynck G. A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: mitochondria versus endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Oct;1843(10):2240-52.
417. Pan R, Hogdal LJ, Benito JM, Bucci D, Han L, Borthakur G, Cortes J, DeAngelo DJ, Debose L, Mu H, Döhner H, Gaidzik VI, Galinsky I, Golfman LS, Haferlach T, Harutyunyan KG, Hu J, Levenson JD, Marcucci G, Müschen M, Newman R, Park E, Ruvolo PP, Ruvolo V, Ryan J, Schindela S, Zweidler-McKay P, Stone RM, Kantarjian H, Andreeff M, Konopleva M, Letai AG. Selective BCL-2 inhibition by ABT-199 causes on-target cell death in acute myeloid leukemia. *Cancer Discov*. 2014 Mar;4(3):362-75.
418. Giménez-Cassina A, Danial NN. Regulation of mitochondrial nutrient and energy metabolism by BCL-2 family proteins. *Trends Endocrinol Metab*. 2015 Apr;26(4):165-75.
419. Gulmann C, Espina V, Petricoin E 3rd, Longo DL, Santi M, Knutsen T, Raffeld M, Jaffe ES, Liotta LA, Feldman AL. Proteomic analysis of apoptotic pathways reveals prognostic factors in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug 15;11(16):5847-55.
420. Coelho Siqueira SA, Ferreira Alves VA, Beitler B, Otta MM, Nascimento Saldiva PH. Contribution of immunohistochemistry to small B-cell lymphoma classification. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006;14:1-6.
421. Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJ. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia* 2007;21:18-29.



422. Ruminy P, Jardin F, Picquenot JM, Parmentier F, Contentin N, Buchonnet G, Tison S, Rainville V, Tilly H, Bastard C. S(mu) mutation patterns suggest different progression pathways in follicular lymphoma: early direct or late from FL progenitor cells. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):1951-9.
423. De Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, et al. Lymphoma Biomarker Consortium. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications- a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol* 2007;25:805-12.
424. Delsol G. [Molecular abnormalities in lymphomas]. *Bull Cancer*. 2010 Nov;97(11):1347-64.
425. Seiler TM, Hiddemann W. Advances in the management of follicular lymphoma. *Curr Opin Oncol*. 2012 Nov;24(6):742-7.
426. Rossi D, Ciardullo C, Gaidano G. Genetic aberrations of signaling pathways in lymphomagenesis: revelations from next generation sequencing studies. *Semin Cancer Biol*. 2013 Dec;23(6):422-30.
427. Capello D, Gaidano G. Molecular pathophysiology of indolent lymphoma. *Haematologica* 2000;85:195-201.
428. Merzianu M, Jiang L, Lin P, Wang X, et al. Nuclear BCL-10 expression is common in lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia and does not correlate with p65 NF-kappaB activation. *Mod Pathol* 2006;19:891-98.
429. Li L, Li GD, Jiang W, Yang WX, Liu WP, Li JM, Li FY. [Expression of bcl-10 protein in MALT lymphoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2005 Dec;34(12):780-4.
430. Li L, Li GD, Jiang W, Yang WX, Liu WP, Zhang WY, Li JM, Tang Y. [Expression of BCL-10 protein and the relationship with API2-MALT1 fusion gene in extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2006 Sep;28(9):678-82.
431. Talwalkar SS, Valbuena JR, Abruzzo LV, Admirand JH, et al. MALT1 gene rearrangements and NF-kappaB activation involving p65 and p50 are absent or rare in primary MALT lymphomas of the breast. *Mod Pathol* 2006;19:1402-8.
432. Zhu J, Wei RL, Wang LH, Jiao BH. [Significance of detection of Bcl-10 novel mutation in ocular adnexal mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2007 Nov;43(11):1010-6.
433. Briones J, Moga E, Espinosa I, Vergara C, Alvarez E, Villa J, Bordes R, Delgado J, Prat J, Sierra J. Bcl-10 protein highly correlates with the expression of phosphorylated p65 NF-kappaB in peripheral T-cell lymphomas and is associated with clinical outcome. *Histopathology*. 2009 Mar;54(4):478-85.

434. Geissinger E, Sadler P, Roth S, Grieb T, Puppe B, Müller N, Reimer P, Vetter-Kauczok CS, Wenzel J, Bonzheim I, Rüdiger T, Müller-Hermelink HK, Rosenwald A. Disturbed expression of the T-cell receptor/CD3 complex and associated signaling molecules in CD30+ T-cell lymphoproliferations. *Haematologica*. 2010 Oct;95(10):1697-704.
435. Moar-Antelo AR, Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda JM, Gayoso-Diz P, Barros-Angueira F, Gándara-Rey JM, García-García A. BCL10 expression is unrelated to clinico-pathological parameters or prognoses for oral squamous cell carcinomas. *Biotech Histochem*. 2012 Aug;87(6):423-7.
436. Rajasekaran K, Kumar P, Schuldt KM, Peterson EJ, Vanhaesebroeck B, Dixit V, Thakar MS, Malarkannan S. Signaling by Fyn-ADAP via the Carma1-Bcl-10-MAP3K7 signalosome exclusively regulates inflammatory cytokine production in NK cells. *Nat Immunol*. 2013 Nov;14(11):1127-36.
437. Roach HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biol Int*. 1994 Jun;18(6):617-28.
438. Fanburg JC, Rosenberg AE, Weaver DL, Leslie KO, Mann KG, Taatjes DJ, Tracy RP. Osteocalcin and osteonectin immunoreactivity in the diagnosis of osteosarcoma. *Am J Clin Pathol*. 1997 Oct;108(4):464-73.
439. Fanburg-Smith JC, Bratthauer GL, Miettinen M. Osteocalcin and osteonectin immunoreactivity in extraskelletal osteosarcoma: a study of 28 cases. *Hum Pathol* 1999;30:32-8.
440. Sakamoto A, Oda Y, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. A comparative study of fibrous dysplasia and osteofibrous dysplasia with regard to expressions of c-fos and c-jun products and bone matrix proteins: a clinicopathologic review and immunohistochemical study of c-fos, c-jun, type I collagen, osteonectin, osteopontin, and osteocalcin. *Hum Pathol*. 1999 Dec;30(12):1418-26.
441. Won KY, Lee CH, Kim YW, Park YK. Primary giant-cell-rich osteosarcoma of the urinary bladder: usefulness of osteocalcin and osteonectin immunohistochemical staining and literature review. *Pathology*. 2011 Feb;43(2):161-4.
442. Stavri S, Zarnescu O. The expression of alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin, and chondroitin sulfate during pectoral fin regeneration in *Carassius auratus gibelio*: a combined histochemical and immunohistochemical study. *Microsc Microanal*. 2013 Feb;19(1):233-42.
443. Ortega N, Werb Z. New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J Cell Sci* 2002;15;(Pt 22):4201-14.
444. Honma K, Miyata T, Ochiya T. Type I collagen gene suppresses tumor growth and invasion of malignant human glioma cells. *Cancer Cell Int*. 2007 Jun 20;7:12.

445. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Mar;8(3):221-33.
446. Latvanlehto A, Fox MA, Sormunen R, Tu H, Oikarainen T, Koski A, Naumenko N, Shakirzyanova A, Kallio M, Ilves M, Giniatullin R, Sanes JR, Pihlajaniemi T. Muscle-derived collagen XIII regulates maturation of the skeletal neuromuscular junction. *J Neurosci.* 2010 Sep 15;30(37):12230-41.
447. Gunda V, Boosani CS, Verma RK, Guda C, Sudhakar YA. L-arginine mediated renaturation enhances yield of human,  $\alpha 6$  Type IV collagen non-collagenous domain from bacterial inclusion bodies. *Protein Pept Lett.* 2012 Oct;19(10):1112-21.
448. Clause KC, Barker TH. Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair. *Curr Opin Biotechnol.* 2013 Oct;24(5):830-3.
449. Zaferani A, Talsma DT, Yazdani S, Celie JW, Aikio M, Heljasvaara R, Navis GJ, Pihlajaniemi T, van den Born J. Basement membrane zone collagens XV and XVIII/proteoglycans mediate leukocyte influx in renal ischemia/reperfusion. *PLoS One.* 2014 Sep 4;9(9):e106732.
450. Nita M, Strzałka-Mrozik B, Grzybowski A, Mazurek U, Romaniuk W. Age-related macular degeneration and changes in the extracellular matrix. *Med Sci Monit.* 2014 Jun 18;20:1003-16.
451. Oefner CM, Sharkey A, Gardner L, Critchley H, Oyen M, Moffett A. Collagen type IV at the fetal-maternal interface. *Placenta.* 2015 Jan;36(1):59-68.
452. Joshi MG, Lee AK, Pedersen CA, Schnitt S, et al. The role of immunocytochemical markers in the differential diagnosis of proliferative and neoplastic lesions of the breast. *Mod Pathol* 1996;9:57-62.
453. Huang L, Espinoza C, Welsh R. Malignant peripheral nerve sheath tumor with divergent differentiation. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:147-50.
454. Huang L, Espinoza C, Welsh R. Malignant peripheral nerve sheath tumor with divergent differentiation. *Arch Pathol Lab Med.* 2003 Mar;127(3):e147-50.
455. Pytel P, Taxy JB, Krausz T. Divergent differentiation in malignant soft tissue neoplasms: the paradigm of liposarcoma and malignant peripheral nerve sheath tumor. *Int J Surg Pathol.* 2005 Jan;13(1):19-28.
456. Shintaku M, Wada K, Wakasa T, Ueda M. Malignant peripheral nerve sheath tumor with fibroblastic differentiation in a patient with neurofibromatosis type 1: imprint cytological findings. *Acta Cytol.* 2011;55(5):467-72.
457. Guo A, Liu A, Wei L, Song X. Malignant peripheral nerve sheath tumors: differentiation patterns and immunohistochemical features - a mini-review and our new findings. *J Cancer.* 2012;3:303-9.

458. Yantiss RK, Goldman H, Odze RD. Hyperplastic polyp with epithelial misplacement (inverted hyperplastic polyp): a clinicopathologic and immunohistochemical study of 19 cases. *Mod Pathol*. 2001 Sep;14(9):869-75.
459. Yantiss RK, Bosenberg MW, Antonioli DA, Odze RD. Utility of MMP-1, p53, E-cadherin, and collagen IV immunohistochemical stains in the differential diagnosis of adenomas with misplaced epithelium versus adenomas with invasive adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2002;26:206-15.
460. Ichikawa Y, Nagashima Y, Morioka K, Akimoto K, Kojima Y, Ishikawa T, Goto A, Kobayashi N, Watanabe K, Ota M, Fujii S, Kawamata M, Takagawa R, Kunizaki C, Takahashi H, Nakajima A, Maeda S, Shimada H, Inayama Y, Ohno S, Endo I. Colorectal laterally spreading tumors show characteristic expression of cell polarity factors, including atypical protein kinase C  $\lambda_1$ , E-cadherin,  $\beta$ -catenin and basement membrane component. *Oncol Lett*. 2014 Sep;8(3):977-984.
461. Virchow R. Lecture XVII. Amyloid degeneration. Inflammation. In: *Cellular Pathology as Based Upon Physiological and Pathological Histology*. New York: Dover Publications, 1971;pp:409-37.
462. Skinner M, Pepys MB, Cohen AS, Heller LM, Lian JB. Amyloid and Amyloidosis. Eds: Glenner GG, Pinho e Costa P, Falcao de Freitas F. Amsterdam: Excerpta Medica, 1980;pp:384-91.
463. Linke RP. Monoclonal antibodies against amyloid fibril protein AA. Production, specificity, and use for immunohistochemical localization and classification of AA-type amyloidosis. *J Histochem Cytochem*. 1984 Mar;32(3):322-8.
464. Donini U, Casanova S, Dal Bosco F, Linke RP. Immunohistochemical typing of amyloid on hydroxyethyl-methacrylate-embedded renal biopsies. *Appl Pathol*. 1984;2(6):299-307.
465. Störkel S, Stürer A. Combined amyloidosis of the AA and AB type following chronic hemodialysis. *Pathologe* 1989;10:107-13.
466. Hoshii Y, Takahashi M, Ishihara T, Uchino F. Immunohistochemical classification of 140 autopsy cases with systemic amyloidosis. *Pathol Int*. 1994 May;44(5):352-8.
467. Toyoda M, Ebihara Y, Kato H, Kita S. Tracheobronchial AL amyloidosis: histologic, immunohistochemical, ultrastructural, and immunoelectron microscopic observations. *Hum Pathol*. 1993 Sep;24(9):970-6. Erratum in: *Hum Pathol* 1994 Jan;25(1):113.
468. Tennent GA, Lovat LB, Pepys MB. Serum Amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer's disease and systemic amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4299-303.
469. Isobe T, Matsushita T, Minakata T, et al. Coexistence of AL and Ab2M amyloid in tissues of a patient with myeloma on hemodialysis. *Amyloid* 1996;3:41-43.

470. Röcken C, Schwotzer EB, Linke RP, Saeger W. The classification of amyloid deposits in clinicopathological practice. *Histopathology*. 1996 Oct;29(4):325-35
471. Shah PL, Gillmore JD, Copley SJ, Collins JV, Wells AU, du Bois RM, Hawkins PN, Nicholson AG. The importance of complete screening for amyloid fibril type and systemic disease in patients with amyloidosis in the respiratory tract. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2002 Jun;19(2):134-42.
472. Liepnieks JJ, Benson MD. Codeposition of transthyretin and immunoglobulin lambda light chain in senile cardiac (ATTR) amyloidosis. In: Grateau G, Kyle R, Skinner M, eds. *Amyloid and Amyloidosis*. London: CRC Press, 2005;pp:332-33.
473. Kebbel A, Röcken C. Immunohistochemical classification of amyloid in surgical pathology revisited. *Am J Surg Pathol* 2006;30:673-83.
474. Kebbel A, Röcken C. Immunohistochemical classification of amyloid in surgical pathology revisited. *Am J Surg Pathol*. 2006 Jun;30(6):673-83.
475. Linke RP, Oos R, Wiegel NM, Nathrath WB. Classification of amyloidosis: misdiagnosing by way of incomplete immunohistochemistry and how to prevent it. *Acta Histochem*. 2006;108(3):197-208.
476. Shah KB, Inoue Y, Mehra MR. Amyloidosis and the heart: a comprehensive review. *Arch Intern Med*. 2006 Sep 25;166(17):1805-13.
477. Kuçi H, Ebert MP, Röcken C. Anti-lambda-light chain-peptide antibodies are suitable for the immunohistochemical classification of AL amyloid. *Histol Histopathol*. 2007 Apr;22(4):379-87.
478. Collins AB, Smith RN, Stone JR. Classification of amyloid deposits in diagnostic cardiac specimens by immunofluorescence. *Cardiovasc Pathol*. 2009 Jul-Aug;18(4):205-16
479. von Hutten H, Mihatsch M, Lobeck H, Rudolph B, Eriksson M, Röcken C. Prevalence and origin of amyloid in kidney biopsies. *Am J Surg Pathol*. 2009 Aug;33(8):1198-205
480. Röcken C. [Update on immunohistological classification of amyloidoses]. *Pathologe*. 2009 Dec;30 Suppl 2:121-3.
481. Schönland SO, Hegenbart U, Bochtler T, Mangatter A, Hansberg M, Ho AD, Lohse P, Röcken C. Immunohistochemistry in the classification of systemic forms of amyloidosis: a systematic investigation of 117 patients. *Blood*. 2012 Jan 12;119(2):488-93.
482. Leong A SY. Pitfalls in diagnostic immunohistology. *Adv Anat Pathol* 2004; 11:86-93.
483. Long E, Hofman V, Ilie M, Washetine K, Lespinet V, Bonnetaud C, Bordone O, Gavric-Tanga V, Gaziello MC, Lassalle S, Selva E, Zahaf K, Lamy A, Sabourin JC, Hofman P. [Accreditation of the activity of molecular pathology according to ISO

- 15189: key steps to follow and the main potential pitfalls]. *Ann Pathol*. 2013 Feb;33(1):12-23.
484. Li X. Pitfalls in the pathological diagnosis of lymphoma. *Chin Clin Oncol*. 2015 Mar;4(1):3.
485. Williamson DA, Chen SC. Contemporary molecular approaches in the clinical microbiology laboratory: progress and pitfalls. *Pathology*. 2015 Apr;47(3):189-90.
486. Horling L, Neuhuber WL, Raab M. Pitfalls using tyramide signal amplification (TSA) in the mouse gastrointestinal tract: endogenous streptavidin-binding sites lead to false positive staining. *J Neurosci Methods*. 2012 Feb 15;204(1):124-32
487. Zheng H, Jiang HY, Yan YH. [Effect of endogenous biotin on SP immunohistochemical result]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2003 Apr;28(2):195-6.
488. Srivastava A, Tischler AS, Delellis RA. Endogenous biotin staining as an artifact of antigen retrieval with automated immunostaining. *Endocr Pathol*. 2004 Summer;15(2):175-8.
489. Cruz Spano L, Merçon de Vargas PR, Gagliardi Leite JP, Pereira do Nascimento J. False positive reaction due to endogenous biotin activity in glandular epithelium of decidua. *Braz J Microbiol* 2005;36:109-13.
490. McKay BE, Molineux ML, Turner RW. Endogenous biotin in rat brain: implications for false-positive results with avidin-biotin and streptavidin-biotin techniques. *Methods Mol Biol*. 2008;418:111-28.
491. Kamphuis W, Klooster J. Pseudo-immunolabelling with the avidin-biotin-peroxidase complex due to the presence of endogenous biotin in the retina. *Methods Mol Biol*. 2008;418:129-38.
492. Nikiel B, Chekan M, Jarzab M, Lange D. Endogenous avidin biotin activity (EABA) in thyroid pathology: immunohistochemical study. *Thyroid Res*. 2009 Apr 8;2(1):5.
493. Ahrens WA, Folpe AL. CD1a immunopositivity in perivascular epithelioid cell neoplasms: true expression or technical artifact? A streptavidin-biotin and polymer-based detection system immunohistochemical study of perivascular epithelioid cell neoplasms and their morphologic mimics. *Hum Pathol*. 2011 Mar;42(3):369-74.
494. Kalousek DK, Lau AE. Pathology of spontaneous abortion. In: Dimmick JE and Kalousek, eds. *Developmental pathology of the embryo and fetus*. Philadelphia: Lippincott, 1992;pp:55-82.
495. Kaplan C. The placenta and viral infections. *Seminars Diag Pathol* 1993;10: 232-50.
496. Yokoyama S, Kashima K, Inoue S, Daa T, et al. Biotin-containing intranuclear inclusions in endometrial glands during gestation and puerperium. *Am J Clin Pathol* 1993;99:13-7.

497. Sickel JZ, di Sant'Agnese PA. Anomalous immunostaining of 'optically clear' nuclei in gestational endometrium. A potential pitfall in the diagnosis of pregnancy-related herpesvirus infection. *Arch Pathol Lab Med* 1994;118:831-3.
498. Nakatani Y, Kitamura H, Inayama Y, Ogawa N. Pulmonary endodermal tumor resembling fetal lung. The optically clear nucleus is rich in biotin. *Am J Surg Pathol* 1994;18:637-42.
499. Ekblad U. Biological Agents and Pregnancy. *JOEM* 1995;37:962-65.
500. Kashima K, Yokoyama S, Daa T, Nakayama I, et al. Cytoplasmic biotin-like activity interferes with immunohistochemical analysis of thyroid lesions: a comparison of antigen retrieval methods. *Mod Pathol* 1997;10:515-9.
501. Bussolati G, Gugliotta P, Volante M, Pace M, Papotti M. Retrieved endogenous biotin: a novel marker and a potential pitfall in diagnostic immunohistochemistry. *Histopathology* 1997;31:400-7.
502. Cameselle-Teijeiro J, Chan JK. Cribriform-morular variant of papillary carcinoma: a distinctive variant representing the sporadic counterpart of familial adenomatous polyposis-associated thyroid carcinoma? *Mod Pathol* 1999;12:400-11.
503. Zheng H, Jiang HY, Yan YH. [Effect of endogenous biotin on SP immunohistochemical result]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2003 Apr;28(2):195-6.
504. Srivastava A, Tischler AS, Delellis RA. Endogenous biotin staining as an artifact of antigen retrieval with automated immunostaining. *Endocr Pathol*. 2004 Summer;15(2):175-8.
505. Cruz Spano L, Merçon de Vargas PR, Gagliardi Leite JP, Pereira do Nascimento J. False positive reaction due to endogenous biotin activity in glandular epithelium of decidua. *Braz J Microbiol* 2005;36:109-13.
506. McKay BE, Molineux ML, Turner RW. Endogenous biotin in rat brain: implications for false-positive results with avidin-biotin and streptavidin-biotin techniques. *Methods Mol Biol*. 2008;418:111-28.
507. Kamphuis W, Klooster J. Pseudo-immunolabelling with the avidin-biotin-peroxidase complex due to the presence of endogenous biotin in the retina. *Methods Mol Biol*. 2008;418:129-38.
508. Nikiel B, Chekan M, Jarzab M, Lange D. Endogenous avidin biotin activity (EABA) in thyroid pathology: immunohistochemical study. *Thyroid Res*. 2009 Apr 8;2(1):5.
509. Ahrens WA, Folpe AL. CD1a immunopositivity in perivascular epithelioid cell neoplasms: true expression or technical artifact? A streptavidin-biotin and polymer-based detection system immunohistochemical study of perivascular epithelioid cell neoplasms and their morphologic mimics. *Hum Pathol*. 2011 Mar;42(3):369-74.
510. Sonwalkar SA, Rotimi O, Scott N, Verghese E, Dixon M, Axon ATRA, et al. A study of indefinite for dysplasia in Barrett's oesophagus: reproducibility of diagnosis, clinical

- outcomes and predicting progression with AMACR (alpha-methylacylCoA-racemase). *Histopathology* 2010 Jun;56(7):900-7.
511. Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70
512. Curvers WL, ten Kate FJ, Krishnadath KK, Visser M, Elzer B, Baak LC, et al. Low-grade dysplasia in Barrett's esophagus: overdiagnosed and underestimated. *Am J Gastroenterol* 2010 Jul;105(7):1523-30.
513. Bhat S, Coleman HG, Yousef F, Johnston BT, McManus DT, Gavin AT, et al. Risk of malignant progression in Barrett's esophagus patients: results from a large population-based study. *J Natl Cancer Inst* 2011 Jul 6;103(13):1049-57.
514. Dulai GS, Shekelle PG, Jensen DM, Spiegel BMR, Chen J, Oh D, et al. Dysplasia and risk of further neoplastic progression in a regional Veterans Administration Barrett's cohort. *Am J Gastroenterol* 2005 Apr;100(4):775e83.
515. Wani SB, Falk GW, Post J, Yerian L, Hall M, Wang A, et al. Risk factors for progression of low-grade dysplasia in patients with Barrett's esophagus. *Elsevier Gastroenterology* 2011 Oct 1;141(4):1179e86. 1186.-
516. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54:4855–78.
517. Kim R, Clarke MR, Melhem MF, Yuong MA, Vanbibber MM, Safatle-Ribeiro AV, et al. Expression of p53, PCNA, cerB-2 in Barrett's metaplasia and adenocarcinoma. *Dig Dis Sci.* 1997 Dec; 42(12):2453-62.
518. Reid BJ, Prevo LJ, Galipeau P, Sanchez C, Longton G, Levine DS. Barrett's oesophagus: from metaplasia to dysplasia and cancer. *Gut* 2005; 54(Suppl I):i6–i12.
519. Levine DS. Barrett's oesophagus and p53. *Lancet* 1994; 344:212-3.
520. Younes M, Lechago J, Chakraborty S, Ostrowski M, Bridges M, Meriano F, et al. Relationship between dysplasia, p53 protein accumulation, DNA ploidy and Glut-1 overexpression in Barrett's metaplasia. *Scand J Gastroenterology.* 2000. Feb; 35(2):131-7.
521. Giménez A, de Haro LM, Parrilla P, Bermejo J. Immunohistochemical detection of p53 protein could improve the management of some patients with Barrett's oesophagus and mild histologic alterations. *Arch Pathol Lab Med.*1999. Dec; 123(12):1260-3.
522. Illueca C, Llombart Bosch A, Ferrando C. Factores pronósticos en el esófago de Barrett: estudio inmunohistoquímico y morfométrico de 120 casos. *J. Rev. Esp. Enferm. Dig.* 2000; 92(11):726-37.
523. Coggi G, Bosari S, Roncalli M, Grazianni D, Bossi P, Viale G et al. P53 protein accumulation in p53 gene mutation in esophageal carcinoma. A molecular and



- immunohistochemical study with clinicopathologic correlations. *Cancer*. 1997;79:425-32.
524. Garewall H, Ramsey L, Sharma P, Kraus K, Sampliner R, Fass R. Biomarkers studies in reversed Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94(10):2829-33.
525. Klump B, Hsich CJ, Holzmann K, Borchard F, Gaco V, Greschnich A. Diagnostic significance of nuclear p53 expression in the surveillance of Barrett's esophagus. A longitudinal study. *Gastroenterology*. 1999; 37(10): 1005-11.
526. J Dulak AM, Stojanov P, Peng S, Lawrence MS, Fox C, Stewart C, et al. Exome and whole-genome sequencing of esophageal adenocarcinoma identifies recurrent driver events and mutational complexity. *Nat Genet* 2013 May;45(5):478-86.
527. Schneider PM, Casson AG, Levin B, Garewal HS, Hoelscher AH, Becker K, et al. Mutations of p53 in Barrett's esophagus and Barrett's cancer: a prospective study of ninety-eight cases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;111(2):323-33.
528. Weaver JMJ, Ross-Innes CS, Shannon N, Lynch AG, Forshew T, Barbera M, et al. Ordering of mutations in preinvasive disease stages of esophageal carcinogenesis. *Nat Genet* 2014 Jun 22;46(8):837-43
529. Galipeau PC, Prevo LJ, Sanchez CA, Longton GM, Reid BJ. Clonal expansion and loss of heterozygosity at chromosomes 9p and 17p in premalignant esophageal (Barrett's tissue). *J Natl Cancer Inst* 1999;91(24):2087-95.
530. Kaye PV, Haider SA, James PD, Soomro I, Catton J, Parsons SL, et al. Novel staining pattern of p53 in Barrett's dysplasia: the absent pattern. *Histopathology* 2010 Dec;57(6):933-5.
531. Fitzgerald RC, Pietro M, Ragnath K, Ang Y, Kang J, Watson P, et al. British society of gastroenterology guidelines on the diagnosis and management of Barrett's oesophagus. 2013. p. 1-36.
532. Kaye PV, Haider SA, Ilyas M, James PD, Soomro I, Faisal W, et al. Barrett's dysplasia and the Vienna classification: reproducibility, prediction of progression and impact of consensus reporting and p53 immunohistochemistry. *Histopathology* 2009 May;54(6):699-712.
533. Sikkema M, Kerkhof M, Steyerberg EW, Kusters JG, van Strien PMH, Looman CWN, et al. Aneuploidy and overexpression of Ki67 and p53 as markers for neoplastic progression in Barrett's esophagus: a case-control study. *Am J Gastroenterol* 2009 Nov;104(11):2673-80.
534. Rygiel AM, Milano F, Ten Kate FJ, Schaap A, Wang KK, Peppelenbosch MP, et al. Gains and amplifications of c-myc, EGFR, and 20.q13 loci in the no dysplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence of Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008 Jun;17(6):1380-5.

535. Skacel M, Petras RE, Rybicki LA, Gramlich TL, Richter JE, Falk GW, et al. p53 expression in low grade dysplasia in Barrett's esophagus: correlation with interobserver agreement and disease progression. *Am J Gastroenterol* 2002 Oct;97(10): 2508-13.
536. Weston AP, Banerjee SK, Sharma P, Tran TM, Richards R, Cherian R. p53 protein overexpression in low grade dysplasia (LGD) in Barrett's esophagus: immunohistochemical marker predictive of progression. *Am J Gastroenterol* 2001 May; 96(5):1355-62.
537. Murray L, Sedo a, Scott M, McManus D, Sloan JM, Hardie LJ, et al. TP53 and progression from Barrett's metaplasia to oesophageal adenocarcinoma in a UK population cohort. *Gut* 2006 Oct;55(10):1390-7.
538. 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 Oct;143(4). 927-35.
539. Wanders RJ, Vreken P, Ferdinandusse S, et al. Peroxisomal fatty acid alpha- and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochem Soc Trans* 2001;29:250 - 67.
540. Schmitz W, Fingerhut R, Conzelmann E. Purification and properties of an alpha-methylacyl-CoA racemase from rat liver. *Eur J Biochem* 1994;222:313 – 23
541. Carnell AJ, Kirk R, Smith M, McKenna S, Lian LY, Gibson R. Inhibition of human alpha-methylacyl CoA racemase (AMACR): a target for prostate cancer. *ChemMedChem*. 2013 Oct;8(10):1643-7
542. Worschech A, Meirelles L, Billis A. Expression of alpha-methylacyl coenzyme A racemase in partial and complete focal atrophy on prostate needle biopsies. *Anal Quant Cytol Histol*. 2009 Dec;31(6):424-31.
543. Honma I, Torigoe T, Hirohashi Y, Kitamura H, Sato E, Masumori N, Tamura Y, Tsukamoto T, Sato N. Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of alpha-methylacyl-coenzyme A racemase in prostate cancer. *J Transl Med*. 2009 Dec 9;7:103
544. Raspollini MR. Cytokeratin (AE1/AE3) in addition to alpha-methylacyl coenzyme A racemase (P504S), 34-beta-E12, and p63 stains in evaluation of surgical specimens after hormonal therapy for prostatic adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2008 Feb;39(2):304-5; author reply 305-6.
545. Santinelli A, Mazzucchelli R, Barbisan F, Lopez-Beltran A, Cheng L, Scarpelli M, Montironi R. alpha-Methylacyl coenzyme A racemase, Ki-67, and topoisomerase IIalpha in cystoprostatectomies with incidental prostate cancer. *Am J Clin Pathol*. 2007 Oct;128(4):657-66.

546. Ng VW, Koh M, Tan SY, Tan PH. Is triple immunostaining with 34betaE12, p63, and racemase in prostate cancer advantageous? A tissue microarray study. *Am J Clin Pathol.* 2007 Feb;127(2):248-53.
547. Zehentner BK, Secrist H, Zhang X, Hayes DC, Ostenson R, Goodman G, Xu J, Kiviat M, Kiviat N, Persing DH, Houghton RL. Detection of alpha-methylacyl-coenzyme-A racemase transcripts in blood and urine samples of prostate cancer patients. *Mol Diagn Ther.* 2006;10(6):397-403.
548. Adley BP, Yang XJ. Alpha-methylacyl coenzyme A racemase immunoreactivity in partial atrophy of the prostate. *Am J Clin Pathol.* 2006 Dec;126(6):849-55.
549. Puebla-Mora AG, Heras A, Cano-Valdez AM, Domínguez-Malagón H. Human telomerase and alpha-methylacyl-coenzyme A racemase in prostatic carcinoma. A comparative immunohistochemical study. *Ann Diagn Pathol.* 2006 Aug;10(4):205-8.
550. Molinié V, Hervé JM, Lugagne PM, Lebret T, Botto H. Diagnostic utility of a p63/alpha-methyl coenzyme A racemase (p504s) cocktail in ambiguous lesions of the prostate upon needle biopsy. *BJU Int.* 2006 May;97(5):1109-15.
551. Adley BP, Yang XJ. Application of alpha-methylacyl coenzyme A racemase immunohistochemistry in the diagnosis of prostate cancer: a review. *Anal Quant Cytol Histol.* 2006 Feb;28(1):1-13.
552. Pozharisskiĭ KM, Leenman EE, Arzumanov AA. [Achievements in morphological diagnosis of prostatic cancer: alpha-methylacyl-coenzyme-A-racemase--a new marker of malignant cell transformation]. *Arkh Patol.* 2005 Sep-Oct;67(5):15-9.
553. Nassar A, Amin MB, Sexton DG, Cohen C. Utility of alpha-methylacyl coenzyme A racemase (p504s antibody) as a diagnostic immunohistochemical marker for cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2005 Sep;13(3):252-5.
554. Jiang Z, Li C, Fischer A, Dresser K, Woda BA. Using an AMACR (P504S)/34betaE12/p63 cocktail for the detection of small focal prostate carcinoma in needle biopsy specimens. *Am J Clin Pathol.* 2005 Feb;123(2):231-6.
555. Suzue K, Montag AG, Tretiakova M, Yang XJ, Sahoo S. Altered expression of alpha-methylacyl-coenzyme A racemase in prostatic adenocarcinoma following hormone therapy. *Am J Clin Pathol.* 2005 Apr;123(4):553-61.
556. Rogers CG, Yan G, Zha S, Gonzalgo ML, Isaacs WB, Luo J, De Marzo AM, Nelson WG, Pavlovich CP. Prostate cancer detection on urinalysis for alpha methylacyl coenzyme a racemase protein. *J Urol.* 2004 Oct;172(4 Pt 1):1501-3.
557. Jiang Z, Woda BA, Wu CL, Yang XJ. Discovery and clinical application of a novel prostate cancer marker: alpha-methylacyl CoA racemase (P504S). *Am J Clin Pathol.* 2004 Aug;122(2):275-89.

558. Zielie PJ, Mobley JA, Ebb RG, Jiang Z, Blute RD, Ho SM. A novel diagnostic test for prostate cancer emerges from the determination of alpha-methylacyl-coenzyme A racemase in prostatic secretions. *J Urol*. 2004 Sep;172(3):1130-3.
559. Yang XJ, Laven B, Tretiakova M, Blute RD Jr, Woda BA, Steinberg GD, Jiang Z. Detection of alpha-methylacyl-coenzyme A racemase in postradiation prostatic adenocarcinoma. *Urology*. 2003 Aug;62(2):282-6.
560. Sanderson SO, Sebo TJ, Murphy LM, Neumann R, Slezak J, Cheville JC. An analysis of the p63/alpha-methylacyl coenzyme A racemase immunohistochemical cocktail stain in prostate needle biopsy specimens and tissue microarrays. *Am J Clin Pathol*. 2004 Feb;121(2):220-5.
561. Zhou M, Chinnaiyan AM, Kleer CG, et al. Alpha-methylacyl-CoA racemase. A novel marker over-expressed in several human cancers and their precursor lesions. *Am J Surg Pathol*. 2002;26:926–931.
562. Abbas M, Ploch EM, Wehling J, Schipper E, Janciauskiene S, Kreipe HH, Jonigk D.  $\alpha$ -Methylacyl-coenzyme A racemase (AMACR, p504s) is a marker to distinguish malignant melanomas from dysplastic nevi and melanocytic nevi. *Tumour Biol*. 2014 Dec;35(12):12015-20.
563. Fadare O, Parkash V, Gwin K, Hanley KZ, Jarboe EA, Liang SX, Quick CM, Zheng W, Rawish KR, Hecht JL, Desouki MM. Utility of  $\alpha$ -methylacyl-coenzyme-A racemase (p504s) immunohistochemistry in distinguishing endometrial clear cell carcinomas from serous and endometrioid carcinomas. *Hum Pathol*. 2013 Dec;44(12):2814-21.
564. Annenkov A, Nishikura K, Domori K, Ajioka Y. Alpha-methylacyl-coenzyme A racemase expression in neuroendocrine neoplasms of the stomach. *Virchows Arch*. 2012 Aug;461(2):169-75
565. Helal Tel A, Radwan NA, Abdel Kader Z, Helmy NA, Hammad SY. Role of alpha methylacyl-coenzyme A racemase in differentiating hepatocellular carcinoma from dysplastic and nondysplastic liver cell lesions. *Ann Diagn Pathol*. 2012 Oct;16(5):330-4.
566. Nozawa Y, Nishikura K, Ajioka Y, Aoyagi Y. Relationship between alpha-methylacyl-coenzyme A racemase expression and mucin phenotype in gastric cancer. *Hum Pathol*. 2012 Jun;43(6):878-87.
567. Ha YS, Kim YW, Min BD, Lee OJ, Kim YJ, Yun SJ, Lee SC, Kim WJ. Alpha-methylacyl-coenzyme A racemase-expressing urachal adenocarcinoma of the abdominal wall. *Korean J Urol*. 2010 Jul;51(7):498-500.
568. Willemoe GL, Vainer B. AMACR is not applicable as a diagnostic tool in hepatocellular carcinoma. *APMIS*. 2010 Feb;118(2):85-90.
569. Marx A, Wandrey T, Simon P, Wewer A, Grob T, Reichelt U, Minner S, Simon R, Spehlmann M, Tigges W, Soehendra N, Seitz U, Seewald S, Izbicki JR, Yekebas E,

- Kaifi JT, Mirlacher M, Terracciano L, Fleischmann A, Raedler A, Sauter G. Combined alpha-methylacyl coenzyme A racemase/p53 analysis to identify dysplasia in inflammatory bowel disease. *Hum Pathol.* 2009 Feb;40(2):166-73
570. Huang W, Zhao J, Li L, Huang Y, Yang X, Wang J, Zhang T. a-Methylacyl coenzyme A racemase is highly expressed in the intestinal-type adenocarcinoma and high-grade dysplasia lesions of the stomach. *Histol Histopathol.* 2008 Nov;23(11):1315-20.
571. Li W, Cagle PT, Botero RC, Liang JJ, Zhang Z, Tan D. Significance of overexpression of alpha methylacyl-coenzyme A racemase in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008 May 15;27:2.
572. Mayes DC, Patterson JW, Ramnani DM, Mills SE. alpha-methylacyl coenzyme A racemase is immunoreactive in extramammary Paget disease. *Am J Clin Pathol.* 2007 Apr;127(4):567-71.
573. Chen ZM, Ritter JH, Wang HL. Differential expression of alpha-methylacyl coenzyme A racemase in adenocarcinomas of the small and large intestines. *Am J Surg Pathol.* 2005 Jul;29(7):890-6.
574. Gupta A, Wang HL, Policarpio-Nicolas ML, Tretiakova MS, Papavero V, Pins MR, Jiang Z, Humphrey PA, Cheng L, Yang XJ. Expression of alpha-methylacyl-coenzyme A racemase in nephrogenic adenoma. *Am J Surg Pathol.* 2004 Sep;28(9):1224-9.
575. Shi X, Gong E, Wu X. Alpha-methylacyl-CoA racemase/P504S overexpression in colorectal carcinoma is correlated with tumor differentiation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007 Jun;15(2):175-80.
576. Dorer R, Odze RD. AMACR immunostaining is useful in detecting dysplastic epithelium in Barrett's esophagus, ulcerative colitis, and Crohn's disease. *Am. J. Surg. Pathol.* 2006; 30; 871–877.
577. Lisovsky M, Falkowski O, Bhuiya T. Expression of alpha-methylacyl-coenzyme A racemase in dysplastic Barrett's epithelium. *Hum. Pathol.* 2006; 37; 1601–1606.
578. Scheil-Bertram S, Lorenz D, Ell C, Sheremet E, Fisseler-Eckhoff A. Expression of alpha-methylacyl coenzyme A racemase in the dysplasia carcinoma sequence associated with Barrett's esophagus. *Mod. Pathol.* 2008; 21; 961–967.
579. Shi XY, Bhagwandeem B, Leong AS. P16, cyclin D1, Ki-67, and AMACR as markers for dysplasia in Barrett esophagus. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2008; 16; 447–452.
580. Sonwalkar SA, Rotimi O, Scott N et al. A study of indefinite for dysplasia in Barrett's oesophagus: reproducibility of diagnosis, clinical outcomes and predicting progression with AMACR (alpha-methylacyl-CoA-racemase). *Histopathology* 2010; 56; 900–907.

581. Kastelein F, Biermann K, Steyerberg EW, Verheij J, Kalisvaart M, Looijenga LH, Stoop HA, Walter L, Kuipers EJ, Spaander MC, Bruno MJ; ProBar study group. Value of  $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase immunochemistry for predicting neoplastic progression in Barrett's oesophagus. *Histopathology*. 2013 Nov;63(5):630-9
582. Yin, AH. et al. (1997) AC133, a novel marker for human hematopoietic stem cells and progenitor cells. *Blood* 90: 5002–5012.
583. Mizrak D, Brittan M, Alison M R. CD133: molecule of the moment. *J Pathol* 2008 Jan; 214 (1): 3–9.
584. Yu, S. et al. (2004) Isolation and characterization of the CD133 precursors from the ventricular zone of human fetal brain by magnetic affinity cell sorting. *Biotechnol. Lett.* 26: 1131–113
585. Belicchi, M. et al. (2004) Human skin-derived stem cells migrate throughout forebrain and differentiate into astrocytes after injection into adult mouse brain. *J. Neurosci. Res.* 77: 475–486
586. Miraglia S, Godfrey W, Yin A H *et al.* A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997 Dec 15; 90 (12): 5013–21.
587. Florek M, Haase M, Marzesco AM *et al.* Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res* 2005 Jan; 319 (1): 15–26.
588. Burkert J, Wright N A, Alison MR. Stem cells and cancer: an intimate relationship. *J Pathol* 2006; 209: 287–97
589. Fukamachi H, Shimada S, Ito K, et al. CD133 is a marker of gland-forming cells in gastric tumors and Sox17 is involved in its regulation. *Cancer Sci.* 2011 Jul;102(7):1313-21.
590. Yu JW, Zhang P, Wu JG, et al. Expressions and clinical significances of CD133 protein and CD133 mRNA in primary lesion of gastric adenocarcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010 Nov 7;29:141.
591. Tomizawa Y, Wu T T, Wang K K. Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cells in esophageal adenocarcinoma originating from Barrett's esophagus. *Oncol Lett* 2012; 3: 1059–63.
592. Grotenhuis B A, Dinjens W N, Wijnhoven B P *et al.* Barrett's oesophageal adenocarcinoma encompasses tumour-initiating cells that do not express common cancer stem cell markers. *J Pathol* 2010; 221: 379–89.
593. Ahmad J, Arthur K, Maxwell P *et al.* Re: Grotenhuis *et al.* Barrett's oesophageal adenocarcinoma encompasses tumour-initiating cells that do not express common cancer stem cell markers. *J Pathol* 2010; 221: 379–389. *J Pathol* 2011; 224: 143–5.

594. Ahmad J, Arthur K, Maxwell P, Kennedy A, Johnston BT, Murray L, McManus DT. A cross sectional study of p504s, CD133, and Twist expression in the esophageal metaplasia dysplasia adenocarcinoma sequence. *Dis Esophagus*. 2015 Apr;28(3):276-82
595. Kang Y, Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 2004; 118: 277–9.
596. Yang J, Mani S A, Donaher J L *et al.* Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004; 117: 927–39.
597. Li J, Zhou BP. Activation of  $\beta$ -catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell-like characters. *BMC Cancer*. 2011 Feb 1;11:49.
598. Phinney DG. Twist, epithelial-to-mesenchymal transition, and stem cells. *Stem Cells*. 2011 Jan;29(1):3-4
599. Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, *et al.* Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 2008;454:794.
600. Mani SA, Guo W, Liao MJ, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704-1
601. Ansieau S, Bastid J, Doreau A, *et al.* Induction of EMT by Twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 2008;14:79-8.
602. Yuen H F, Chan Y P, Wong M L *et al.* Upregulation of Twist in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with neoplastic transformation and distant metastasis. *J Clin Pathol* 2007; 60: 510–4.
603. Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 442–54.
604. Maestro R, Dei Tos A P, Hamamori Y *et al.* Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13: 2207–17.
605. Gomez I, Peña C, Herrera M, Muñoz C, *et al.* TWIST1 is expressed in colorectal carcinomas and predicts patient survival. *PLoS One*. 2011 Mar 28;6(3):e18023
606. van der Burgh A, Dees J, HopWC, van Blankenstein M. Oesophageal cancer is an uncommon cause of death in patients with Barrett's oesophagus. *Gut*. 1996;39(1):5-8.
607. Rubenstein JH, Sonnenberg A, Davis J, McMahan L, Inadomi JM. Effect of a prior endoscopy on outcomes of esophageal adenocarcinoma among United States veterans. *Gastrointest Endosc*. 2008;68(5):849-855. Inadomi JM, Sampliner R, Lagergren J, Lieberman D, Fendrick AM, Vakil N. Screening and surveillance for Barrett esophagus in high-risk groups: a cost-utility analysis. *Ann Intern Med*. 2003;138(3):176-186.

608. Shaheen NJ, Dulai GS, Ascher B, Mitchell KL, Schmitz SM. Effect of a new diagnosis of Barrett's esophagus on insurance status. *Am J Gastroenterol.* 2005;100(3):577-580.
609. Crockett SD, Lippmann QK, Dellon ES, Shaheen NJ. Health-related quality of life in patients with Barrett's esophagus: a systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009;7(6):613-623.
610. Corley DA, Levin TR, Habel LA, Weiss NS, Buffler PA. Surveillance and survival in Barrett's adenocarcinomas: a population-based study. *Gastroenterology.* 2002;122(3):633-640.
611. Provenzale D, Schmitt C, Wong JB. Barrett's esophagus: a new look at surveillance based on emerging estimates of cancer risk. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(8):2043-2053.
612. Sonnenberg A, Soni A, Sampliner RE. Medical decision analysis of endoscopic surveillance of Barrett's oesophagus to prevent oesophageal adenocarcinoma. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16(1):41-50.
613. Hur C, Nishioka NS, Gazelle GS. Cost-effectiveness of aspirin chemoprevention for Barrett's esophagus. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(4):316-325. Spechler SJ. Screening and surveillance for Barrett's esophagus—an unresolved dilemma. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2007;4(9):470-471.
614. Singh S, Manickam P, Amin AV, Samala N, Schouten LJ, Iyer PG, Desai TK. Incidence of esophageal adenocarcinoma in Barrett's esophagus with low-grade dysplasia: a systematic review and meta-analysis. *Gastrointest Endosc.* 2014 Jun;79(6):897-909
615. Reid BJ, Weinstein WM, Lewin KJ, Haggitt RC, VanDeventer G, DenBesten L, Rubin CE. Endoscopic biopsy can detect high-grade dysplasia or early adenocarcinoma in Barrett's esophagus without grossly recognizable neoplastic lesions. *Gastroenterology.* 1988 Jan;94(1):81-90
616. Cameron AJ, Carpenter HA. Barrett's esophagus, high-grade dysplasia, and early adenocarcinoma: a pathological study. *Am J Gastroenterol.* 1997 Apr;92(4):586-91
617. Konda VJ, Ross AS, Ferguson MK, Hart JA, Lin S, Naylor K, Noffsinger A, Posner MC, Dye C, Cislo B, Stearns L, Waxman I. Is the risk of concomitant invasive esophageal cancer in high-grade dysplasia in Barrett's esophagus overestimated? *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008 Feb;6(2):159-64.
618. Collard JM. High-grade dysplasia in Barrett's esophagus. The case for esophagectomy. *Chest Surg Clin N Am.* 2002 Feb;12(1):77-92
619. Peters JH. SSAT controversies intramucosal esophageal cancer and high-grade dysplasia: which treatment? Surgical therapy: improved outcomes and piece of mind. *J Gastrointest Surg.* 2009 Jul;13(7):1179-81.



620. Nasr JY, Schoen RE. Prevalence of adenocarcinoma at esophagectomy for Barrett's esophagus with high grade dysplasia. *J Gastrointest Oncol*. 2011 Mar;2(1):34-8
621. Levine DS, Haggitt RC, Blount PL, et al. An endoscopic biopsy protocol can differentiate high-grade dysplasia from early adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1993; 105:40.
622. Falk GW, Rice TW, Goldblum JR, Richter JE. Jumbo biopsy forceps protocol still misses unsuspected cancer in Barrett's esophagus with high-grade dysplasia. *Gastrointest Endosc* 1999; 49:170.
623. Abela JE, Going JJ, Mackenzie JF, et al. Systematic four-quadrant biopsy detects Barrett's dysplasia in more patients than nonsystematic biopsy. *Am J Gastroenterol* 2008; 103:850.
624. Curvers WL, Bansal A, Sharma P, Bergman JJ. Endoscopic work-up of early Barrett's neoplasia. *Endoscopy* 2008; 40:1000.
625. ASGE Standards of Practice Committee, Evans JA, Early DS, et al. The role of endoscopy in the assessment and treatment of esophageal cancer. *Gastrointest Endosc* 2013; 77:328.
626. Canto MI, Setrakian S, Willis J, et al. Methylene blue-directed biopsies improve detection of intestinal metaplasia and dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2000; 51:560.
627. Scotiniotis IA, Kochman ML, Lewis JD, et al. Accuracy of EUS in the evaluation of Barrett's esophagus and high-grade dysplasia or intramucosal carcinoma. *Gastrointest Endosc* 2001; 54:689.
628. Kobayashi K, Izatt JA, Kulkarni MD, et al. High-resolution cross-sectional imaging of the gastrointestinal tract using optical coherence tomography: preliminary results. *Gastrointest Endosc* 1998; 47:515.
629. Georgakoudi I, Jacobson BC, Van Dam J, et al. Fluorescence, reflectance, and light-scattering spectroscopy for evaluating dysplasia in patients with Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2001; 120:1620.
630. Kendall C, Stone N, Shepherd N, et al. Raman spectroscopy, a potential tool for the objective identification and classification of neoplasia in Barrett's oesophagus. *J Pathol* 2003; 200:602.
631. Wallace MB, Sharma P, Lightdale C, et al. Preliminary accuracy and interobserver agreement for the detection of intraepithelial neoplasia in Barrett's esophagus with probe-based confocal laser endomicroscopy. *Gastrointest Endosc* 2010; 72:19.
632. American Gastroenterological Association, Spechler SJ, Sharma P, et al. American Gastroenterological Association medical position statement on the management of Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2011; 140:1084.

633. Fitzgerald RC, di Pietro M, Ragnanath K, et al. British Society of Gastroenterology guidelines on the diagnosis and management of Barrett's oesophagus. *Gut* 2014; 63:7.
634. ASGE Standards of Practice Committee, Evans JA, Early DS, et al. The role of endoscopy in Barrett's esophagus and other premalignant conditions of the esophagus. *Gastrointest Endosc* 2012; 76:1087.
635. ASGE Standards of Practice Committee, Sharaf RN, Shergill AK, et al. Endoscopic mucosal tissue sampling. *Gastrointest Endosc* 2013; 78:216.
636. Fleischer DE, Odze R, Overholt BF, et al. The case for endoscopic treatment of non-dysplastic and low-grade dysplastic Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci.* 2010;55:1918–1931.
637. El-Serag HB, Graham DY. Routine polypectomy for colorectal polyps and ablation for Barrett's esophagus are intellectually the same. *Gastroenterology.* 2011;140:386–388.
638. Madisch A , Miehlike S , Bayerdorff er E et al. Long-term follow-up aft er complete ablation of Barrett's esophagus with argon plasma coagulation . *World J Gastroenterol* 2005;11: 1182–6.
639. Manner H , May A , Miehlike S et al. Ablation of nonneoplastic Barrett's mucosa using argon plasma coagulation with concomitant esomeprazole therapy (APBANEX): a prospective multicenter evaluation . *Am J Gastroenterol* 2006 ; 101 : 1762 – 9 .
640. Ferraris R , Fracchia M , Foti M et al. Barrett's oesophagus: long-term follow-up aft er complete ablation with argon plasma coagulation and the factors that determine its recurrence . *Aliment Pharmacol Ther* 2007 ; 25 : 835 – 40 .
641. Gondrie JJ, Pouw RE, Sondermeijer CM, et al. Effective treatment of early Barrett's neoplasia with stepwise circumferential and focal ablation using the HALO system. *Endoscopy.* 2008;40:370–379.
642. Fleischer DE, Overholt BF, Sharma VK, et al. Endoscopic radiofrequency ablation for Barrett's esophagus: 5-year outcomes from a prospective multicenter trial. *Endoscopy.* 2010;42:781–789.
643. Shaheen NJ, Fleischer DE, Eisen GM, et al. Durability of epithelial reversion after radiofrequency ablation: follow-up of the AIM dysplasia trial. *Gastroenterology.* 2010;138:A92
644. Spechler SJ. Barrett's Esophagus without dysplasia: wait or ablate? *Dig Dis Sci.* 2011 Jul;56(7):1926-8
645. Shaheen NJ , Sharma P , Overholt BF et al. Radiofrequency ablation in Barrett's esophagus with dysplasia . *N Engl J Med* 2009 ; 360 : 2277 – 88 . 132. Shaheen NJ , Overholt BF , Sampliner RE et al. Durability of radiofrequency ablation in Barrett's esophagus with dysplasia . *Gastroenterology* 2011;141:460–8.

646. Bennett C, Moayyedi P, Corley DA, DeCaestecker J, Falck-Ytter Y, Falk G, Vakil N, Sanders S, Vieth M, Inadomi J, Aldulaimi D, Ho KY, Odze R, Meltzer SJ, Quigley E, Gittens S, Watson P, Zaninotto G, Iyer PG, Alexandre L, Ang Y, Callaghan J, Harrison R, Singh R, Bhandari P, Bisschops R, Geramizadeh B, Kaye P, Krishnadath S, Fennerty MB, Manner H, Nason KS, Pech O, Konda V, Ragunath K, Rahman I, Romero Y, Sampliner R, Siersema PD, Tack J, Tham TC, Trudgill N, Weinberg DS, Wang J, Wang K, Wong JY, Attwood S, Malfertheiner P, MacDonald D, Barr H, Ferguson MK, Jankowski J. BOB CAT: a Large-Scale Review and Delphi Consensus for Management of Barrett's Esophagus With No Dysplasia, Indefinite for, or Low-Grade Dysplasia. *Am J Gastroenterol*. 2015 May;110(5):662-82
647. Wani S, Falk GW, Post J et al. Risk factors for progression of low-grade dysplasia in patients with Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2011; 141: 179–86.
648. Singh S, Sharma AN, Murad MH et al. Central adiposity is associated with increased risk of esophageal inflammation, metaplasia, and adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11: 1399–412.
649. Abdalla M, Dhanekula R, Greenspan M et al. Dysplasia detection rate of confirmatory EGD in nondysplastic Barrett's esophagus. *Dis Esophagus* 2014; 27:505–10.
650. Phoa KN, van Vilsteren FG, Weusten BL et al. Radiofrequency ablation vs endoscopic surveillance for patients with Barrett esophagus and lowgrade dysplasia: a randomized clinical trial. *JAMA* 2014; 311:1209–17.
651. Picardo SL, O'Brien MP, Feighery R et al. A Barrett's esophagus registry of over 1000 patients from a specialist center highlights greater risk of progression than population-based registries and high risk of low grade dysplasia. *Dis Esophagus* 2015; 28: 121–6.
652. Shaheen NJ, Sharma P, Overholt BF et al. Radiofrequency ablation in Barrett's esophagus with dysplasia. *N Engl J Med* 2009; 360: 2277–88.
653. Shaheen NJ, Overholt BF, Sampliner RE et al. Durability of radiofrequency ablation in Barrett's esophagus with dysplasia. *Gastroenterology* 2011; 141: 460–8.
654. Pech O, Behrens A, May A et al. Curative endoscopic therapy for Barrett's early cancer and high grade dysplasia: long-term results in 304 patients. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: AB83.
655. Ell C, May A, Gossner L et al. Endoscopic mucosal resection of early cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2000; 118: 670–7.
656. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut* 2000; 47: 251–5.

657. Montgomery E , Bronner MP , Goldblum JR et al. Reproducibility of the diagnosis of dysplasia in Barrett esophagus: a reaffirmation . *Hum Pathol* 2001 ; 32 : 368 – 78 .
658. Horvath B , Singh P , Xie H et al. Risk for esophageal neoplasia in Barrett's esophagus patients with mucosal changes indefinite for dysplasia . *J Gastroenterol Hepatol* 2015 ; 30 : 262 – 7 .
659. Younes M , Lauwers GY , Ertan A et al. The significance of "indefinite for dysplasia" grading in Barrett metaplasia . *Arch Pathol Lab Med* 2011 ; 135 : 430 – 2 .
660. Curvers WL , ten Kate FJ , Krishnadath KK et al. Low-grade dysplasia in Barrett's esophagus: overdiagnosed and underestimated . *Am J Gastroenterol* 2010 ; 105 : 1523 – 30 .
661. Duits LC , Phoa KN , Curvers WL et al. Barrett's oesophagus patients with low-grade dysplasia can be accurately risk-stratified after histological review by an expert pathology panel . *Gut* 2014 , 10.1136/gutjnl-2014-307278:10.1136/gutjnl-2014-307278.
662. Reid BJ, Weinstein WM, Lewin KJ, Haggitt RC, VanDeventer G, DenBesten L, Rubin CE. Endoscopic biopsy can detect high-grade dysplasia or early adenocarcinoma in Barrett's esophagus without grossly recognizable neoplastic lesions. *Gastroenterology*. 1988 Jan;94(1):81-90
663. Almond LM, Barr H, Jankowski J. Barrett's Oesophagus. In: SM Griffin, SA Raimes, editors. *A companion to specialist surgical practice: oesophagogastric surgery*. 5th ed. Saunders Elsevier (in print).
664. Buttar NS, Wang KK, Sebo TJ, et al. Extent of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus correlates with risk of adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 2001;120(7):1630–9.
665. Altorki NK, Sunagawa M, Little AG, et al. High-grade dysplasia in the columnar-lined esophagus. *Am J Surg*. 1991;161(1):97–9.
666. Pera M, Trastek VF, Carpenter HA, et al. Barrett's esophagus with high-grade dysplasia: an indication for esophagectomy? *Ann Thorac Surg*. 1992;54(2):199–204.
667. Streitz JM Jr, Andrews CW Jr, Ellis FH. Endoscopic surveillance of Barrett's esophagus. Does it help? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1993;105(3):383–7.
668. Levine DS, Haggitt RC, Blount PL, et al. An endoscopic biopsy protocol can differentiate high-grade dysplasia from early adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Gastroenterology*. 1993; 105(1):40–50.
669. Edwards MJ, Gable DR, Lentsch AB, et al. The rationale for esophagectomy as the optimal therapy for Barrett's esophagus with high-grade dysplasia. *Ann Surg*. 1996;223(5):585–9.

670. Peters JH, Clark GW, Ireland AP, et al. Outcome of adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus in endoscopically surveyed and nonsurveyed patients. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994;108(5):813–21.
671. Rice TW, Falk GW, Achkar E, et al. Surgical management of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol.* 1993;88(11):1832–6.
672. Collard JM, Romagnoli R, Hermans BP, et al. Radical esophageal resection for adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus. *Am J Surg.* 1997;174(3):307–11.
673. Ferguson MK, Naunheim KS. Resection for Barrett's mucosa with high-grade dysplasia: implications for prophylactic photodynamic therapy. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1997;114(5):824–9.
674. Cameron AJ, Carpenter HA. Barrett's esophagus, high-grade dysplasia, and early adenocarcinoma: a pathological study. *Am J Gastroenterol.* 1997;92(4):586–91.
675. Falk GW, Rice TW, Goldblum JR, et al. Jumbo biopsy forceps protocol still misses unsuspected cancer in Barrett's esophagus with high-grade dysplasia. *Gastrointest Endosc.* 1999;49(2): 170–6.
676. Headrick JR, Nichols FC 3rd, Miller DL, et al. High-grade esophageal dysplasia: long-term survival and quality of life after esophagectomy. *Ann Thorac Surg.* 2002;73(6):1697–702.
677. Tseng EE, Wu TT, Yeo CJ, et al. Barrett's esophagus with high grade dysplasia: surgical results and long-term outcome—an update. *J Gastrointest Surg.* 2003;7(2):164–70.
678. Sujendran V, Sica G, Warren B, et al. Oesophagectomy remains the gold standard for treatment of high-grade dysplasia in Barrett's oesophagus. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005;28(5):763–6.
679. Reed MF, Tolis G Jr, Edil BH, et al. Surgical treatment of esophageal high-grade dysplasia. *Ann Thorac Surg.* 2005;79(4): 1110–5.
680. Wang VS, Hornick JL, Sepulveda JA, et al. Low prevalence of submucosal invasive carcinoma at esophagectomy for highgrade dysplasia or intramucosal adenocarcinoma in Barrett's esophagus: a 20-year experience. *Gastrointest Endosc.* 2009;69(4):777–83.
681. Nasr JY, Schoen RE. Prevalence of adenocarcinoma at esophagectomy for Barrett's esophagus with high grade dysplasia. *J Gastrointest Oncol.* 2011;2(1):34–8. 105(1):40–50.
682. Konda VJ, Ross AS, Ferguson MK, et al. Is the risk of concomitant invasive esophageal cancer in high-grade dysplasia in Barrett's esophagus overestimated? *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008;6(2):159–64.

683. Tharavej C, Hagen JA, Peters JH, Portale G, Lipham J, DeMeester SR, et al. Predictive factors of coexisting cancer in Barrett's high-grade dysplasia. *Surg Endosc.* 2006;20(3): 439–43.
684. Chennat J, Waxman I. Endoscopic treatment of Barrett's esophagus: from metaplasia to intramucosal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2010;16(30):3780–5.
685. Leung WD, Chennat J. Comparison of endoscopic and surgical resection of intramucosal carcinoma in Barrett's esophagus. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;5(5):575–8.
686. Nealis TB, Washington K, Keswani RN. Endoscopic therapy of esophageal premalignancy and early malignancy. *J Natl Compr Canc Netw.* 2011;9(8):890–9.
687. Prasad GA, Wu TT, Wigle DA, et al. Endoscopic and surgical treatment of mucosal (T1a) esophageal adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Gastroenterology.* 2009;137(3):815–23.
688. Schembre DB, Huang JL, Lin OS, et al. Treatment of Barrett's esophagus with early neoplasia: a comparison of endoscopic therapy and esophagectomy. *Gastrointest Endosc.* 2008;67(4):595–601.
689. Singh S, Sharma P. How effective is endoscopic therapy in the treatment of patients with early esophageal cancer? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2009;6(2):70–1.
690. Das A, Singh V, Fleischer DE, et al. A comparison of endoscopic treatment and surgery in early esophageal cancer: an analysis of surveillance epidemiology and end results data. *Am J Gastroenterol.* 2008;103(6):1340–5.
691. Allum WH, Blazeby JM, Griffin SM, et al. Guidelines for the management of oesophageal and gastric cancer. *Gut.* 2011;50(5): 106–12.
692. Wani S, Drahos J, Cook MB, Rastogi A, Bansal A, Yen R, Sharma P, Das A. Comparison of endoscopic therapies and surgical resection in patients with early esophageal cancer: a population-based study. *Gastrointest Endosc.* 2014 Feb;79(2):224-232.
693. Prasad GA, Wang KK, Buttar NS, et al. Long-term survival following endoscopic and surgical treatment of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology.* 2007;132(4): 1226–33.
694. Bennett C, Green S, Decaestecker J, Almond M, Barr H, Bhandari P, Ragunath K, Singh R, Jankowski J. Surgery versus radical endotherapies for early cancer and high-grade dysplasia in Barrett's oesophagus. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Nov 14;11:CD007334.
695. Shaheen NJ, Overholt BF, Sampliner RE, et al. Durability of radiofrequency ablation in Barrett's esophagus with dysplasia. *Gastroenterology.* 2011;141(2):460–8.
696. Shaheen NJ, Sharma P, Overholt BF, et al. Radiofrequency ablation in Barrett's esophagus with dysplasia. *N Engl J Med.* 2009;360(22):2277–88.

697. Pouw RE, Wirths K, Eisendrath P, et al. Efficacy of radiofrequency ablation combined with endoscopic resection for barrett's esophagus with early neoplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8(1):23–9.
698. Badreddine RJ, Prasad GA, Wang KK, et al. Prevalence and predictors of recurrent neoplasia after ablation of Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc*. 2010;71(4):697–703.
699. Pech O, May A, Rabenstein T, Ell C. Endoscopic resection of early oesophageal cancer. *Gut*. 2007;56(11):1625–34.
700. Sgourakis G, Gockel I, Lang H. Endoscopic and surgical resection of T1a/T1b esophageal neoplasms: a systematic review. *World J Gastroenterol*. 2013 Mar 7;19(9):1424-37
701. Bennett C, Vakil N, Bergman J, et al. Consensus statements for management of barrett's dysplasia and early-stage esophageal adenocarcinoma, based on a delphi process. *Gastroenterology*. 2012;143:336–46.
702. Li YM, Li L, Yu CH, et al. A systematic review and metaanalysis of the treatment for Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci*. 2008;53(11):2837–46.
703. Pech O, Behrens A, May A, Nachbar L, et al. Long-term results and risk factor analysis for recurrence after curative endoscopic therapy in 349 patients with high-grade intraepithelial neoplasia and mucosal adenocarcinoma in Barrett's oesophagus. *Gut*. 2008;57(9):1200–6.
704. van Vilsteren FG, Pouw RE, Seewald S, et al. Stepwise radical endoscopic resection versus radiofrequency ablation for Barrett's oesophagus with high-grade dysplasia or early cancer: a multicentre randomised trial. *Gut*. 2011;60(6):765–73.
705. Hull MJ, Mino-Kenudson M, Nishioka NS, et al. Endoscopic mucosal resection: an improved diagnostic procedure for early gastroesophageal epithelial neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 2006;30(1):114–8.
706. Moss A, Bourke MJ, Hourigan LF, et al. Endoscopic resection for Barrett's high-grade dysplasia and early esophageal adenocarcinoma: an essential staging procedure with long-term therapeutic benefit. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(6):1276–83.
707. ASGE Technology Committee, Kantsevoy SV, Adler DG, Conway JD, Diehl DL, Farraye FA, et al. Endoscopic mucosal resection and endoscopic submucosal dissection. *Gastrointest Endosc*. 2008;68(1):11–8.
708. Ciocirlan M, Lapalus MG, Hervieu V, et al. Endoscopic mucosal resection for squamous premalignant and early malignant lesions of the esophagus. *Endoscopy*. 2007;39(1):24–9.
709. Inoue H, Fukami N, Yoshida T, et al. Endoscopic mucosal resection for esophageal and gastric cancers. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002;17(4):382–8.

710. Haidry RJ, Lipman G, Banks MR, Butt MA, Sehgal V, Graham D, Dunn JM, Gupta A, Sweis R, Miah H, Morris D, Smart HL, Bhandari P, Willert R, Fullarton G, Morris J, Di Pietro M, Gordon C, Penman I, Barr H, Patel P, Boger P, Kapoor N, Mahon B, Hoare J, Narayanasamy R, O'Toole D, Cheong E, Direkze NC, Ang Y, Veitch A, Dhar A, Nyalender D, Raganath K, Leahy A, Fullard M, Rodriguez-Justo M, Novelli M, Lovat LB. Comparing outcome of radiofrequency ablation in Barrett's with high grade dysplasia and intramucosal carcinoma: a prospective multicenter UK registry. *Endoscopy*. 2015 Jun 30. [Epub ahead of print]
711. Li N, Pasricha S, Bulsiewicz WJ, Pruitt RE, Komanduri S, Wolfsen HC, Chmielewski GW, Corbett FS, Chang KJ, Shaheen NJ. Effects of preceding endoscopic mucosal resection on the efficacy and safety of radiofrequency ablation for treatment of Barrett's esophagus: results from the United States Radiofrequency Ablation Registry. *Dis Esophagus*. 2015 Jun 30. doi: 10.1111/dote.12386. [Epub ahead of print]
712. Peter S, Mönkemüller K. Ablative Endoscopic Therapies for Barrett's-Esophagus-Related Neoplasia. *Gastroenterol Clin North Am*. 2015 Jun;44(2):337-53.
713. Small AJ, Araujo JL, Leggett CL, Mendelson AH, Agarwalla A, Abrams JA, Lightdale CJ, Wang TC, Iyer PG, Wang KK, Rustgi AK, Ginsberg GG, Forde KA, Gimotty PA, Lewis JD, Falk GW, Bewtra M. Radiofrequency Ablation Is Associated With Decreased Neoplastic Progression in Patients With Barrett's Esophagus and Confirmed Low-Grade Dysplasia. *Gastroenterology*. 2015 Apr 24. [Epub ahead of print]
714. Künzli HT, Schölvinck DW, Phoa KN, Schoon EJ, Houben MH, Bergman JJ, Weusten BL. Simplified protocol for focal radiofrequency ablation using the HALO90 device: short-term efficacy and safety in patients with dysplastic Barrett's esophagus. *Endoscopy*. 2015 Jul;47(7):592-7.
715. Overholt BF, Wang KK, Burdick JS, et al. Five-year efficacy and safety of photodynamic therapy with Photofrin in Barrett's high-grade dysplasia. *Gastrointest Endosc*. 2007;66(3):460-8. Raganath K, Krasner N, Raman VS, et al. Endoscopic ablation of dysplastic Barrett's oesophagus comparing argon plasma coagulation and photodynamic therapy: a randomized prospective trial assessing efficacy and cost-effectiveness. *Scand J Gastroenterol*. 2005;40(7):750-8.
716. Biddlestone LR, Barham CP, Wilkinson SP, et al. The histopathology of treated Barrett's esophagus: squamous reepithelialization after acid suppression and laser and photodynamic therapy. *Am J Surg Pathol*. 1998;22(2):239-45.
717. Overholt BF, Lightdale CJ, Wang KK, et al. Photodynamic therapy with porfimer sodium for ablation of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: international,



- partially blinded, randomized phase III trial. *Gastrointest Endosc.* 2005;62(4): 488–98.
718. Bulsiewicz WJ, Shaheen NJ. The role of radiofrequency ablation in the management of Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2011;21(1):95–109.
719. Herrero LA, van Vilsteren FG, Pouw RE, et al. Endoscopic radiofrequency ablation combined with endoscopic resection for early neoplasia in Barrett's esophagus longer than 10 cm. *Gastrointest Endosc.* 2011;49(5):286–301.
720. Lyday WD, Corbett FS, Kuperman DA, et al. Radiofrequency ablation of Barrett's esophagus: outcomes of 429 patients from a multicenter community practice registry. *Endoscopy.* 2010;42(4): 272–8.
721. Semlitsch T, Jeitler K, Schoefl R, et al. A systematic review of the evidence for radiofrequency ablation for Barrett's esophagus. *Surg Endosc.* 2010;24(12):2935–43.
722. David WJ, Qumseya BJ, Qumsiyeh Y, Heckman MG, Diehl NN, Wallace MB, Raimondo M, Woodward TA, Wolfsen HC. Comparison of endoscopic treatment modalities for Barrett's neoplasia. *Gastrointest Endosc.* 2015 Jun 10.
723. Pasricha S, Cotton C, Hathorn KE, Li N, Bulsiewicz WJ, Wolf WA, Muthusamy VR, Komanduri S, Wolfsen HC, Pruitt RE, Ertan A, Chmielewski GW, Shaheen NJ. Effects of Learning Curve on Efficacy of Radiofrequency Ablation for Barrett's Esophagus. *Gastroenterology.* 2015 Jun 24.
724. Sharma P, Wani S, Weston AP, Bansal A, et al. A randomized controlled trial of ablation of Barrett's oesophagus with multipolar electrocoagulation versus argon plasma coagulation in combination with acid suppression: long term results. *Gut.* 2006;55(9):1233–9.
725. Gatenby P, Caygill C, Wall C, Bhattacharjee S, Ramus J, Watson A, Winslet M. Lifetime risk of esophageal adenocarcinoma in patients with Barrett's esophagus. *World J Gastroenterol.* 2014 Jul 28;20(28):9611-7.
726. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco induced cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:733–744.
727. Van Soest EM, Dieleman JP, Siersema PD, Sturkenboom MCJM, Kuipers EJ. Increasing incidence of Barrett's oesophagus in the general population. *Gut.* 2005;54(8):1062–1066.
728. Van Blankenstein M, Looman CW, Johnston BJ, Caygill CP. Age and sex distribution of the prevalence of Barrett's esophagus found in a primary referral endoscopy center. *Am J Gastroenterol.* 2005;100(3):568–576.
729. Watanabe S, Hojo M, Nagahara A. Metabolic syndrome and gastrointestinal diseases. *J Gastroenterol.* 2007;42:267–274.

730. Merry AHH, Schouten LJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Body mass index, height and risk of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia: a prospective cohort study. *Gut*. 2007;56:1503–1511.
731. Freedman ND, Abnet CC, Leitzmann MF, et al. A prospective study of tobacco, alcohol, and the risk of Esophageal and gastric cancer subtypes. *Am J Epidemiol*. 2007;165:1424–1433.
732. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Bodymass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*. 2008;371:569–578.
733. Corley DA, Kubo A, Zhao W. Abdominal obesity and the risk of Esophageal and gastric cardia carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2008;17:352–358.
734. Jacobson BC, Chan AT, Giovannucci EL, Fuchs CS. Body mass index and Barrett's oesophagus in women. *Gut*. 2009;58: 1460–1466.
735. Steffen A, Schulze MB, Pischon T, et al. Anthropometry and Esophageal cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2009; 18:2079–2089.
736. Steevens J, Schouten LJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Alcohol consumption, cigarette smoking and risk of subtypes of oesophageal and gastric cancer: a prospective cohort study. *Gut*. 2010;59:39–48.
737. Cook MB, Kamangar F, Whiteman DC, et al. Cigarette smoking and adenocarcinomas of the Esophagus and Esophagogastric junction: a pooled analysis from the international BEACON consortium. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102:1344–1353.
738. Steevens J, Schouten LJ, Driessen ALC, et al. A prospective cohort study on overweight, smoking, alcohol consumption, and risk of Barrett's Esophagus. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2011;20:345–358.
739. Jacobson B, Giovannucci E, Fuchs C. Smoking and Barrett's Esophagus in women who undergo upper endoscopy. *Dig Dis Sci*. 2011;56:1707–1717.
740. Yates M, Cheong E, Luben R, Igali L, Fitzgerald R, Khaw KT, Hart A. Body mass index, smoking, and alcohol and risks of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: a UK prospective cohort study. *Dig Dis Sci*. 2014 Jul;59(7):1552-9
741. Desai TK, Krishnan K, Samala N, Singh J, Cluley J, Perla S, Howden CW. The incidence of oesophageal adenocarcinoma in non-dysplastic Barrett's oesophagus: a meta-analysis. *Gut* 2012; 61: 970-976
742. Flejou J F. WHO Classification of digestive tumors: the fourth edition. *Ann Pathol* 2011 Nov; 31 (5 Suppl. ): S27–31.

743. Harvey J M, Clark G M, Osborne C K, Allred D C. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1474–81.
744. Dubecz A, Solymosi N, Stadlhuber RJ, Schweigert M, Stein HJ, Peters JH. Does the Incidence of Adenocarcinoma of the Esophagus and Gastric Cardia Continue to Rise in the Twenty-First Century?-a SEER Database Analysis. *J Gastrointest Surg.* 2013 Nov 15.
745. Runge TM, Abrams JA, Shaheen NJ. Epidemiology of Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am.* 2015 Jun;44(2):203-231.
746. Gopal DV, Lieberman DA, Magaret N, et al. Risk factors for dysplasia in patients with Barrett's esophagus (BE): results from a multicenter consortium. *Dig Dis Sci* 2003;48:1537 – 41.
747. Buas MF, Onstad L, Levine DM, Risch HA, Chow WH, Liu G, Fitzgerald RC, Bernstein L, Ye W, Bird NC, Romero Y, Casson AG, Corley DA, Shaheen NJ, Wu AH, Gammon MD, Reid BJ, Hardie LJ, Peters U, Whitman DC, Vaughan TL. MiRNA-Related SNPs and Risk of Esophageal Adenocarcinoma and Barrett's Esophagus: Post Genome-Wide Association Analysis in the BEACON Consortium. *PLoS One.* 2015 Jun 3;10(6):e0128617.
748. Bansal A, Fitzgerald RC. Biomarkers in Barrett's Esophagus: Role in Diagnosis, Risk Stratification, and Prediction of Response to Therapy. *Gastroenterol Clin North Am.* 2015 Jun;44(2):373-390.
749. Eng L, Azad AK, Qiu X, Kong QQ, Cheng D, Ying N, Tse A, Kuang Q, Dodbiba L, Renouf DJ, Marsh S, Savas S, Mackay HJ, Knox JJ, Darling GE, Wong RK, Xu W, Liu G, Faluyi OO. Discovery and Validation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Pathway Polymorphisms in Esophageal Adenocarcinoma Outcome. *Carcinogenesis.* 2015 May 25.
750. Hazelton WD, Curtius K, Inadomi JM, Vaughan TL, Meza R, Rubenstein JH, Hur C, Luebeck EG. The Role of Gastroesophageal Reflux and Other Factors during Progression to Esophageal Adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2015 Apr 30.
751. Trevellin E, Scarpa M, Carraro A, Lunardi F, Kotsafti A, Porzionato A, Saadeh L, Cagol M, Alfieri R, Tedeschi U, Calabrese F, Castoro C, Vettor R. Esophageal adenocarcinoma and obesity: peritumoral adipose tissue plays a role in lymph node invasion. *Oncotarget.* 2015 May 10;6(13):11203-15.
752. Wang BJ, Zhang B, Yan SS, Li ZC, Jiang T, Hua CJ, Lu L, Liu XZ, Zhang DH, Zhang RS, Wang X. Hormonal and reproductive factors and risk of esophageal cancer in women: a meta-analysis. *Dis Esophagus.* 2015 Mar 23.

753. Petrick JL, Li N, McClain KM, Steck SE, Gammon MD. Dietary Risk Reduction Factors for the Barrett's Esophagus-Esophageal Adenocarcinoma Continuum: A Review of the Recent Literature. *Curr Nutr Rep*. 2015 Mar 1;4(1):47-65.
754. Steffen A, Huerta JM, Weiderpass E, Bueno-de-Mesquita HB, May AM, Siersema PD, Kaaks R, Neamat-Allah J, Pala V, Panico S, Saieva C, Tumino R, Naccarati A, Dorransoro M, Sánchez-Cantalejo E, Ardanaz E, Quirós JR, Ohlsson B, Johansson M, Wallner B, Overvad K, Halkjaer J, Tjønneland A, Fagherazzi G, Racine A, Clavel-Chapelon F, Key TJ, Khaw KT, Wareham N, Lagiou P, Bamia C, Trichopoulou A, Ferrari P, Freisling H, Lu Y, Riboli E, Cross AJ, Gonzalez CA, Boeing H. General and abdominal obesity and risk of esophageal and gastric adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer*. 2015 Aug 1;137(3):646-57.
755. Cook MB, Freedman ND, Gamborg M, Sørensen TI, Baker JL. Childhood body mass index in relation to future risk of oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2015 Feb 3;112(3):601-7.
756. Agrawal S, Patel P, Agrawal A, Makhijani N, Markert R, Deidrich W. Metformin use and the risk of esophageal cancer in Barrett esophagus. *South Med J*. 2014 Dec;107(12):774-9.
757. Nguyen T, Khalaf N, Ramsey D, El-Serag HB. Statin use is associated with a decreased risk of Barrett's esophagus. *Gastroenterology*. 2014 Aug;147(2):314-23.
758. Gonzalez CA, Agudo A, Montes J, et al. Tobacco and alcohol intake in relation to adenocarcinoma of the gastric cardia in Spain. *Cancer Causes Control*. 1994;5:88–89.
759. Kabat GC, Ng SK, Wynder EL. Tobacco, alcohol intake, and diet in relation to adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Cancer Causes Control*. 1993;4:123–132.
760. Li JY, Ershow AG, Chen ZJ, et al. A case-control study of cancer of the esophagus and gastric cardia in Linxian. *Int J Cancer*. 1989;43:755–761.
761. Vaughan TL, Davis S, Kristal A, et al. Obesity, alcohol, and tobacco as risk factors for cancers of the esophagus and gastric cardia: adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1995;4:85–92.
762. Wu AH, Wan P, Bernstein L. A multiethnic population-based study of smoking, alcohol and body size and risk of adenocarcinomas of the stomach and esophagus (United States) *Cancer Causes Control*. 2001;12:721–732.
763. Veugelers PJ, Porter GA, Guernsey DL, et al. Obesity and lifestyle risk factors for gastroesophageal reflux disease, Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Dis Esophagus*. 2006;19:321–328.

764. van der Burgh A, Dees J, Hop WC, van Blankenstein M. Oesophageal cancer is an uncommon cause of death in patients with Barrett's oesophagus. *Gut*. 1996 Jul;39(1):5-8
765. Moayyedi P, Burch N, Akhtar-Danesh N, Enaganti SK, Harrison R, Talley NJ, Jankowski J. Mortality rates in patients with Barrett's oesophagus. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008 Feb 15;27(4):316-20.
766. Portale G, Peters JH, Hsieh CC, Tamhankar AP, Almogy G, Hagen JA, Demeester SR, Bremner CG, Demeester TR. Esophageal adenocarcinoma in patients < or = 50 years old: delayed diagnosis and advanced disease at presentation. *Am Surg*. 2004 Nov;70(11):954-8
767. Abdullah M, Karim AA, Goh KL. Late presentation of esophageal cancer: observations in a multiracial South-East Asian population. *J Dig Dis*. 2010 Feb;11(1):28-33
768. Hvid-Jensen F, Pedersen L, Drewes AM, Sørensen HT, Funch-Jensen P. Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus. *N Engl J Med* 2011;365:1375-83.
769. Solaymani-Dodaran M, Card TR, West J. Cause-specific mortality of people with Barrett's esophagus compared with the general population: a population-based cohort study. *Gastroenterology*. 2013 Jun;144(7):1375-83.
770. Chadwick G, Groene O, Hoare J, Hardwick RH, Riley S, Crosby TD, Hanna GB, Cromwell DA. A population-based, retrospective, cohort study of esophageal cancer missed at endoscopy. *Endoscopy*. 2014 Jul;46(7):553-60 Bharat A, Crabtree T. Management of advanced-stage operable esophageal cancer. *Surg Clin North Am*. 2012 Oct;92(5):1179-97.
771. Nun-Anan P, Vilaichone RK. Late stage and grave prognosis of esophageal cancer in Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(5):1747-9.
772. Simard EP, Ward EM, Siegel R, Jemal A. Cancers with increasing incidence trends in the United States: 1999 through 2008. *CA Cancer J Clin*. 2012 Mar-Apr;62(2):118-28.
773. Gilbert EW, Luna RA, Harrison VL, Hunter JG. Barrett's esophagus: a review of the literature. *J Gastrointest Surg*. 2011 May;15(5):708-18
774. Cheng KK, Sharp L, McKinney PA, Logan RF, Chilvers CE, Cook-Mozaffari P, Ahmed A, Day NE. A case-control study of oesophageal adenocarcinoma in women: a preventable disease. *Br J Cancer*. 2000 Jul;83(1):127-32.
775. Chen H, Ward MH, Graubard BI, Heineman EF, Markin RM, Potischman NA, Russell RM, Weisenburger DD, Tucker KL. Dietary patterns and adenocarcinoma of the esophagus and distal stomach. *Am J Clin Nutr*. 2002 Jan;75(1):137-44

776. Whiteman DC, Sadeghi S, Pandeya N, Smithers BM, Gotley DC, Bain CJ, Webb PM, Green AC; Australian Cancer Study. Combined effects of obesity, acid reflux and smoking on the risk of adenocarcinomas of the oesophagus. *Gut*. 2008 Feb;57(2):173-80
777. Corley DA, Kubo A, Levin TR, Block G, Habel L, Zhao W, Leighton P, Quesenberry C, Rumore GJ, Buffler PA. Abdominal obesity and body mass index as risk factors for Barrett's esophagus. *Gastroenterology*. 2007 Jul;133(1):34-41.
778. Edelstein ZR, Farrow DC, Bronner MP, Rosen SN, Vaughan TL. Central adiposity and risk of Barrett's esophagus. *Gastroenterology*. 2007 Aug;133(2):403-11
779. Corley DA, Kubo A, Zhao W. Abdominal obesity, ethnicity and gastro-oesophageal reflux symptoms. *Gut*. 2007 Jun;56(6):756-62.
780. Kubo A, Corley DA. Marked regional variation in adenocarcinomas of the esophagus and the gastric cardia in the United States. *Cancer*. 2002 Nov 15;95(10):2096-102
781. Cook MB, Wild CP, Forman D. A systematic review and meta-analysis of the sex ratio for Barrett's esophagus, erosive reflux disease, and nonerosive reflux disease. *Am J Epidemiol*. 2005 Dec 1;162(11):1050-61
782. Lagergren J, Jansson C. Sex hormones and oesophageal adenocarcinoma: influence of childbearing? *Br J Cancer*. 2005 Oct 17;93(8):859-61
783. Instituto Nacional de Estadística. Ministerio de Sanidad, Servicios sociales e Igualdad. Encuesta Nacional de Salud 2011-2012.
784. Vaughan TL, Kristal AR, Blount PL, Levine DS, Galipeau PC, Prevo LJ, Sanchez CA, Rabinovitch PS, Reid BJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use, body mass index, and anthropometry in relation to genetic and flow cytometric abnormalities in Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Aug;11(8):745-52
785. Thomas SJ, Almers L, Schneider J, Graham JE, Havel PJ, Corley DA. Ghrelin and Leptin Have a Complex Relationship with Risk of Barrett's Esophagus. *Dig Dis Sci*. 2015 Sep 22
786. Cook MB, Shaheen NJ, Anderson LA, Giffen C, Chow WH, Vaughan TL, Whiteman DC, Corley DA. Cigarette smoking increases risk of Barrett's esophagus: an analysis of the Barrett's and Esophageal Adenocarcinoma Consortium. *Gastroenterology*. 2012 Apr;142(4):744-53
787. Anaparthi R, Gaddam S, Kanakadandi V, Alsop BR, Gupta N, Higbee AD, Wani SB, Singh M, Rastogi A, Bansal A, Cash BD, Young PE, Lieberman DA, Falk GW, Vargo JJ, Thota P, Sampliner RE, Sharma P. Association between length of Barrett's esophagus and risk of high-grade dysplasia or adenocarcinoma in patients without dysplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013 Nov;11(11):1430-6
788. Rugge M, Zaninotto G, Parente P, Zanatta L, Cavallin F, Germanà B, Macrì E, Galliani E, Iuzzolino P, Ferrara F, Marin R, Nisi E, Iadecola G, Deboni M, Bellumat

- A, Valiante F, Florea G, Della Libera D, Benini M, Bortesi L, Meggio A, Zorzi MG, Depretis G, Miori G, Morelli L, Cataudella G, d'Amore ES, Franceschetti I, Bozzola L, Paternello E, Antonini C, Di Mario F, Dal Bò N, Furlanetto A, Norberto L, Polese L, Iommarini S, Farinati F, Battaglia G, Diamantis G, Realdon S, Guido E, Mastropaolo G, Canova D, Guerini A, Franceschi M, Zirillo M. Barrett's esophagus and adenocarcinoma risk: the experience of the North-Eastern Italian Registry (EBRA). *Ann Surg*. 2012 Nov;256(5):788-94; discussion 794-5
789. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997 Dec 15;90(12):5002-12.
790. Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, et al. Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7 [J]. *Blood*, 2000, 95(9):2813-2820
791. Bitan M, Shapira MY, Resnick IB, et al. Successful transplantation of haploidentically mismatched peripheral blood stem cells using CD133 + purified stem cells [J]. *Exp Hematol*, 2005, 33(6):713-718.
792. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR2 and AC133 by circulating human CD34 (+) cells identifies a population of functional endothelial precursors.[J]. *Blood*, 2000, 95(3):952-958.
793. Uchida N, Buck DW, He D, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(26): 14720-14725.
794. Corbeil D, R?per K, Hellwig A, et al. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem*, 2000, 275(8):5512-5520.
795. Richardson GD, Robson CN, Lang SH, et al. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci*, 2004, 117(16): 3539-3545.
796. Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M, et al. Human circulating AC133 + stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest*, 2004, 114(2):182-195.
797. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003 Sep 15;63(18):5821-8.
798. Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O, et al. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007, 6(1):92-97.
799. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(3):313-323.

800. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice [J]. *Nature*, 2007, 445(7123):106-110.
801. Yin S, Li J, Hu C, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer*, 2007, 120(7): 1444-1450.
802. Meregalli M, Farini A, Belicchi M, Torrente Y. CD133(+) cells isolated from various sources and their role in future clinical perspectives. *Expert Opin Biol Ther*. 2010 Nov;10(11):1521-8
803. Jankowski J, Barr H, Wang K, Delaney B. Diagnosis and management of Barrett's oesophagus. *BMJ*. 2010 Sep 10;341:c4551
804. Xu J, Stolk JA, Zhang X, Silva SJ, Houghton RL, Matsumura M, Vedvick TS, Leslie KB, Badaro R, Reed SG. Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray. *Cancer Res*. 2000 Mar 15;60(6):1677-82.
805. Thisse B, el Messal M, Perrin-Schmitt F. The twist gene: isolation of a *Drosophila* zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic Acids Res*. 1987 Apr 24;15(8):3439-53.
806. Lee KW, Kim JH, Han S, Sung CO, Do IG, Ko YH, Um SH, Kim SH. Twist1 is an independent prognostic factor of esophageal squamous cell carcinoma and associated with its epithelial-mesenchymal transition. *Ann Surg Oncol*. 2012 Jan;19(1):326-35
807. Xie F, Li K, Ouyang X. Twist, an independent prognostic marker for predicting distant metastasis and survival rates of esophageal squamous cell carcinoma patients. *Clin Exp Metastasis*. 2009;26(8):1025-32.
808. Ru GQ, Wang HJ, Xu WJ, Zhao ZS. Upregulation of Twist in gastric carcinoma associated with tumor invasion and poor prognosis. *Pathol Oncol Res*. 2011 Jun;17(2):341-7
809. Zhu DY, Guo QS, Li YL, Cui B, Guo J, Liu JX, Li P. Twist1 correlates with poor differentiation and progression in gastric adenocarcinoma via elevation of FGFR2 expression. *World J Gastroenterol*. 2014 Dec 28;20(48):18306-15.