

AVALIAÇÃO DOS DANOS DO DNA NA MUCOSA ESOFÁGICA E SANGUE PERIFÉRICO DE PORTADORES DA DOENÇA DO REFLUXO GASTROESOFÁGICO

Evaluation of DNA damage in the esophageal mucosa and peripheral blood of patients with gastroesophageal reflux disease

Edilene Lúcia **BERTOLOZZO**¹, Dertia Villalba **FREIRE-MAIA**¹, Mauro Masson **LERCO**²,
Marcelo Sady **PLÁCIDO**¹, Maria Aparecida Coelho de Arruda **HENRY**²

Trabalho realizado no ¹Departamento de Genética do Instituto de Biociências de Botucatu e ²Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

RESUMO - Racional - A doença do refluxo gastroesofágico é a afecção digestiva de maior prevalência. Os portadores podem apresentar na evolução algumas complicações, sendo o esôfago de Barrett a de maior importância, tendo em vista seu potencial de malignidade. Todavia os processos inflamatórios do trato gastrointestinal podem apresentar degeneração maligna. **Objetivos** - Avaliar os possíveis danos do DNA em portadores de esofagite de refluxo gastroesofágico de vários graus e verificar a aplicação do ensaio Cometa na detecção dos mesmos. **Métodos** - Foram estudados 25 pacientes distribuídos em quatro grupos: controle (n=5), esofagite leve (n=8), esofagite severa (n=5) e câncer (n=7). O ensaio Cometa foi realizado no sangue periférico (linfócitos) e biópsia do terço distal do esôfago. **Resultados** - O ensaio Cometa detectou danos no DNA nos pacientes com esofagite leve e severa (sangue periférico e biópsia), sendo que na esofagite severa a intensidade dos danos foi maior (p<0,05). Os danos do DNA dos pacientes com esofagite severa e câncer não mostraram diferença significativa e a intensidade dos mesmos corresponde ao ensaio Cometa classe 4 (maior que 95% de danos). **Conclusões** - 1) As frequências de quebras do DNA da mucosa esofágica e linfócitos estão diretamente relacionadas ao grau de inflamação; 2) a esofagite severa apresenta praticamente a mesma frequência de danos no DNA do câncer esofágico; 3) o ensaio Cometa mostrou-se muito sensível para a detecção dos danos do DNA.

DESCRITORES - Esofagite péptica. Dano ao DNA. Ensaio em Cometa.

Correspondência:

Maria Aparecida Coelho de Arruda Henry,
e-mail: rhenry@ibb.unesp.br

Fonte de financiamento: não há
Conflito de interesses: não há

Recebido para publicação: 08/06/2010
Aceito para publicação: 04/10/2010

HEADINGS - Esophagitis, peptic. DNA Damage. Comet assay.

ABSTRACT - Background - The gastroesophageal reflux disease is the most prevalent digestive disorder. Patients with it may present some complications during its development, and Barrett's esophagus is the most important in view of its potential malignancy. However, the inflammatory processes of the gastrointestinal tract may show malignant degeneration. **Aim** - To assess possible DNA damage in patients with gastroesophageal reflux esophagitis of various degrees and to evaluate the application of the Comet assay in its detection. **Methods** - Twenty-five patients were studied. They were divided into four groups: control (n=5), mild esophagitis (n=8), severe esophagitis (n=5) and cancer (n=7). The Comet assay was performed on peripheral blood cells (lymphocytes) and biopsy of the distal esophagus. **Results** - The Comet assay detected DNA damage in patients with mild and severe esophagitis (peripheral blood and biopsy), and damage intensity was greater in severe esophagitis (p<0,05). DNA damage in patients with severe esophagitis and cancer did not show significant difference, and its intensity corresponds to class-4 Comet assay (greater than 95% of damage). **Conclusions** - 1) The frequencies of DNA breakage in the esophageal mucosa and lymphocytes are directly related to inflammation level; 2) severe esophagitis shows virtually the same DNA damage frequency as that of esophageal cancer; 3) the Comet assay showed to be very sensitive for DNA damage detection.

INTRODUÇÃO

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) constitui importante afecção do trato gastrointestinal, tendo em vista a elevada e crescente incidência, a intensidade dos sintomas e a gravidade das complicações, dentre as quais o esôfago de Barrett (EB) destaca-se como a mais importante³. O EB representa o último estágio da esofagite desencadeada pela DRGE, na qual o epitélio escamoso distal exposto cronicamente ao conteúdo gastroduodenal é substituído pelo epitélio colunar metaplásico¹⁴. O risco de desenvolvimento de câncer em pacientes com EB não está bem estabelecido e as taxas variam de 0,4 a 1,5% por ano de seguimento¹⁷.

Todavia qualquer processo inflamatório do trato gastrointestinal predispõe a degeneração maligna⁵, fato que deve ocorrer não só com o EB como também nos estágios menos avançados da esofagite¹.

Além disso, produtos bacterianos liberados no local da inflamação podem causar danos ao DNA e estes podem representar a fase inicial da carcinogênese¹².

Os objetivos deste trabalho foram estudar os possíveis danos no DNA da mucosa esofágica e sangue periférico de pacientes com esofagite de refluxo em diferentes graus e verificar a aplicação do ensaio Cometa como auxiliar no diagnóstico dos danos do DNA e risco ao câncer do esôfago.

MÉTODO

O projeto deste trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, tendo sido aprovado (ofício 187/2001). Todos os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram estudados 25 indivíduos (21 homens e quatro mulheres), com idades variando entre 15 e 85 anos (média: 57,32 ± 18,00 anos) (Tabela 1).

TABELA 1 - Aspectos demográficos, observados nos pacientes dos quatro grupos estudados

Grupo	N	Idade média	Masculino	Feminino
Controle	5	53 ± 20,63	3	2
Esofagite leve	8	50,12 ± 18,58	6	2
Esofagite severa	5	51,8 ± 18,07	5	0
Câncer	7	65,42 ± 14,08	7	0
Total	25	57,6 ± 18,0	21	4

Após avaliação clínica os indivíduos foram submetidos à endoscopia digestiva alta e divididos em quatro grupos, na dependência do achado endoscópico¹⁸: grupo controle (mucosa normal), grupo esofagite leve (esofagite de refluxo graus I e II), grupo esofagite severa (esofagite de refluxo graus III e IV), grupo câncer (carcinoma espinocelular do esôfago).

Durante o exame endoscópico foram coletadas quatro biópsias do esôfago distal e 5 ml de sangue periférico. Duas amostras das biópsias foram colocadas em frascos contendo solução salina balanceada de Hanks e as demais em meio de congelamento.

Todas as amostras foram encaminhadas para análise dos danos do DNA, utilizando o ensaio Cometa²⁰.

As células da mucosa esofágica e linfócitos foram isolados por digestão de proteínas e colagenase, segundo a técnica descrita por Pool-Zobel, et al.¹⁶. A seguir as células foram submetidas ao teste de viabilidade com solução de brometo de etídio.

Determinação dos danos de DNA

A técnica utilizada para determinação dos danos do DNA foi a descrita por Singh, et al.²⁰, modificada por Klaude, et al.¹¹, conforme protocolo de Speit e Hartmann²².

O estudo das lâminas permitiu a análise em teste cego de 5000 células, sendo 50 por lâmina, totalizando 200 células por indivíduo.

A análise das células foi feita pelo sistema de imagem em microscópio de epifluorescência (Axiophot II, Zeiss) e aumento de 400X. Foram visualizadas imagens com contornos circulares (sem danos do DNA – classe 0) e estruturas em forma de "Cometas" (com danos no DNA – Classes 1 a 4). O ensaio Cometa classe 4 representa danos do DNA em percentual superior a 95%.

A extensão de cada imagem significa a distância da migração da fita de DNA danificada. Em cada lâmina, a quantidade de cometas foi multiplicada pelo valor de sua classe, dando origem aos escores de cada lâmina, que podem variar de 0 (sem danos) a 200 (máximo de danos). Os escores de cada lâmina foram somados, resultando nos escores finais.

A quantificação dos danos no DNA das células foi realizada pelo "Internative Image Analysis System Comet Assay II", da Percentive Instruments. Os parâmetros medidos foram o momento de cauda (comprimento da cauda x intensidade da cauda ou frequência do DNA migrado) e o total de escores nos grupos.

Para a análise estatística foi utilizado o teste de Tukey, que permitiu a comparação do momento de cauda e total dos escores nos quatro grupos estudados.

RESULTADOS

Na Tabela 2 estão expostas as médias dos parâmetros avaliados no sangue, segundo grupos e testes estatísticos.

Na Tabela 3 estão as médias dos parâmetros avaliados nas biópsias segundo grupos e testes estatísticos.

Considerando o parâmetro momento de cauda (Figura 1) foi observada que nas biópsias houve diferença significativa entre os grupos controle,

TABELA 2 - Médias dos parâmetros avaliados no sangue segundo grupos e testes estatísticos

Parâmetros		
Grupos	Momentos da cauda	Escore
Controle	0,004 ± 0,008 a	1,400 ± 1,14 a
Esofagite leve	0,018 ± 0,024 a	42,250 ± 28,64 b
Esofagite severa	0,605 ± 0,402 b	143,600 ± 14,82 c
Câncer	1,183 ± 1,129 b	167,286 ± 22,60 c

Nota: média de grupos seguidos de letras iguais não diferem significativamente (0,05)

TABELA 3 - Médias dos parâmetros avaliados nas biópsias segundo grupos e testes estatísticos

Parâmetros		
Grupos	Momentos da cauda	Escore
Controle	0,014 ± 0,029 a	2,00 ± 2,00 a
Esofagite leve	0,305 ± 0,374 b	77,88 ± 28,00 b
Esofagite severa	4,962 ± 1,116 c	220,00 ± 12,64 c
Câncer	4,838 ± 3,296 c	256,42 ± 12,38 d

Nota: média de grupos seguidos de letras iguais não diferem significativamente (0,05)

esofagite leve, esofagite severa e câncer, porém os grupos esofagite severa e câncer não mostraram diferença significativa ($p > 0,05$). A Tabela 2 mostra que no sangue os grupos controle e esofagite leve não mostraram diferença significativa, ao se considerar o parâmetro momento de cauda. Todavia os valores observados nestes grupos são menores que os dos grupos esofagite severa e câncer ($p < 0,05$).

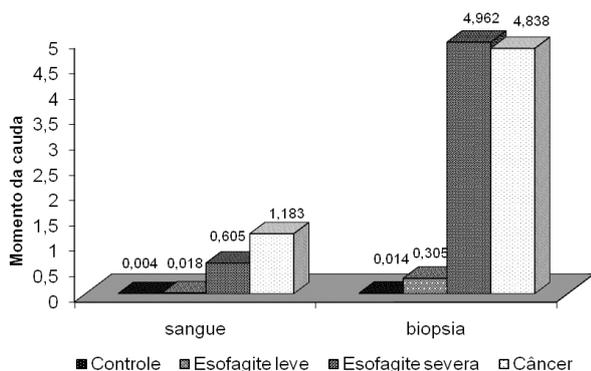


FIGURA 1 - Ensaio Cometa avaliado nos quatro grupos analisando o parâmetro momento de cauda (linfócitos, biópsias)

Para os escores (Figura 2) foi observado que ao se considerar as biópsias, os quatro grupos estudados diferem entre si (Tabela 3). Com relação ao sangue, os grupos controle, esofagite leve e esofagite severa diferem entre si ($p < 0,05$), porém os grupos esofagite severa e câncer não mostraram diferença significativa (Tabela 2).

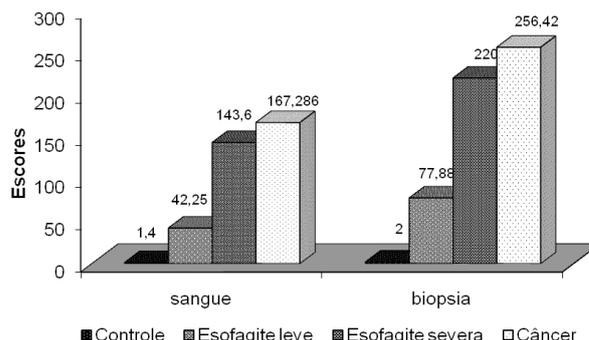


FIGURA 2 - Ensaio Cometa avaliando nos quatro grupos, analisando o parâmetro escores (linfócitos, biópsias)

DISCUSSÃO

Nesta pesquisa foram estudados oito indivíduos com esofagite leve e cinco com esofagite severa. A idade média dos pacientes com esofagite severa foi de $61,8 \pm 18,07$ anos, mais elevada que a observada naqueles com esofagite leve ($50,12 \pm 18,58$ anos), sugerindo que a mucosa esofágica sofreu a ação lesiva do suco gástrico por maior tempo, resultando em processo inflamatório grave. Resultado semelhante foi observado por Tseng, et al.²⁶, em estudo epidemiológico realizada na China.

Além dos pacientes com esofagite, foram estudados também sete indivíduos com carcinoma espinocelular do esôfago. Neste grupo todos os pacientes eram homens, confirmando os dados de literatura, segundo a qual a doença tem predileção por indivíduos do gênero masculino^{6,8,27}. A idade dos pacientes com câncer do esôfago ($65,42 \pm 14,08$ anos) não difere da referida pela maioria dos autores^{6,27}. Os pacientes deste grupo não receberam terapia neoadjuvante (quimioterapia e/ou radioterapia) antes da coleta do sangue ou biópsia do esôfago distal, conduta que provocaria danos do DNA²³.

A presente pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar os danos do DNA da mucosa esofágica e sangue periférico de portadores de esofagite de refluxo gastroesofágico.

O DNA não é uma molécula estável e frequentemente está exposta a diversos agentes, naturais ou artificiais, que podem provocar-lhe danos⁴. Em condições normais, cerca de 99% dos danos do DNA podem ser reparados, mas aproximadamente 1% pode permanecer no genoma da célula⁷. Os danos do DNA não reparados podem resultar em perda de informação genética, ou interferência na transcrição e replicação, sendo portanto deletérios ao hospedeiro⁴.

Outro aspecto de grande importância é que os danos no DNA podem induzir à mutação^{10,24}. Tal instabilidade genética pode estar ligada a várias doenças, entre elas o câncer^{2,9}.

Assim, a detecção de danos do DNA constitui

importante conduta em pesquisas ligadas a genética toxicológica e epidemiologia molecular^{19,25}.

Nesta pesquisa foi utilizado o ensaio Cometa ou Single Cell Gel Electrophoresis, teste indicador de genotoxicidade, pois quantifica os danos do DNA. O ensaio Cometa foi utilizado por vários pesquisadores^{12,14}.

A avaliação dos danos do DNA no sangue periférico (Tabela 2 – momento de cauda), mostrou que nos grupos controle e esofagite leve os valores não diferem. Todavia nos grupos esofagite severa e câncer os valores são maiores que aqueles dos dois grupos anteriores (diferença significativa). Nos grupos esofagite severa e câncer os valores observados não mostram diferença significativa. Ao se considerar o parâmetro escores (Tabela 2) foi observado que nos grupos controle, esofagite leve e esofagite severa os valores diferem entre si, com danos mais significativos no grupo esofagite severa ($143,6 \pm 14,82$) que no grupo esofagite leve ($42,5 \pm 28,64$). Nos grupos esofagite severa e câncer os valores observados não mostram diferença significativa ($143,6 \pm 14,82$ X $167,28 \pm 22,60$). A comparação de destes resultados com a literatura está prejudicada, pois não encontrou-se trabalhos semelhantes no levantamento bibliográfico.

A tabela 3 demonstra que ao se analisar os danos do DNA na mucosa do esôfago, os valores observados nos grupos controle, esofagite leve e esofagite severa diferem entre si, sendo mais elevados no grupo esofagite severa ($4,96 \pm 1,11$) que na esofagite leve ($0,305 \pm 0,37$). Os grupos esofagite severa e câncer não apresentam diferença significativa ($4,96 \pm 1,11$ X $5,24 \pm 3,29$). Estes resultados foram observados ao se considerar o parâmetro momento de cauda, os quais concordam com os publicados por Ladeira, et al.¹². Estes autores estudaram biópsias da mucosa gástrica de pacientes com gastrite leve e severa e observaram que quanto maior a gravidade do processo inflamatório maior a intensidade dos danos do DNA.

Nos pacientes dos grupos esofagite severa e câncer os danos do DNA correspondem ao ensaio Cometa classe 4, com percentual acima de 95%.

Ao se considerar o parâmetro escores, os valores observados nas biópsias dos pacientes controle, esofagite leve, esofagite severa e câncer diferem entre si, sendo mais elevados na esofagite severa ($220 \pm 12,64$) que na esofagite leve ($77,88 \pm 28$).

Nos processos inflamatórios, uma variedade de fagócitos (neutrófilos, monócitos e macrófagos) é capaz de gerar radicais livres em respostas a mediadores pró-inflamatórios²¹. Os radicais livres induzem consequências nocivas ao DNA da célula, podendo induzir quebras do DNA e outras modificações genéticas que são potencialmente carcinogênicas³.

Neste estudo, através da análise dos dados obtidos e levando-se em conta o grau de inflamação da mucosa, pode-se constatar que o aumento da frequência de quebras do DNA está relacionado ao aumento da intensidade de inflamação da mucosa,

com diferenças significativas entre os danos do DNA na mucosa normal, esofagite leve, severa e câncer.

Deve-se salientar que o ensaio Cometa é uma técnica muito sensível, que permite a avaliação dos danos no DNA de diferentes populações de células, além de permitir detectar diferenças existentes na atuação do mecanismo de reparo.

Com base nestes dados sugere-se a possibilidade de que a própria inflamação exerce forte efeito genotóxico e conseqüente instabilidade genômica nas células, aumentando a probabilidade de degeneração maligna.

CONCLUSÕES

As frequências de quebras no DNA da mucosa esofágica e nos linfócitos do sangue periférico estão diretamente relacionadas ao grau de inflamação; a esofagite severa apresenta praticamente a mesma frequência de danos no DNA do câncer esofágico; o ensaio Cometa mostrou-se muito sensível para a detecção dos danos do DNA, parecendo ser promissora como teste prognóstico de susceptibilidade para degeneração maligna.

REFERÊNCIAS

1. Andreollo NA, Lopes LR, Coelho-Neto JS. Doença do refluxo gastroesofágico: qual a eficácia dos exames no diagnóstico? *Arq Bras Cir Dig*. 2010; 23(1):6-10.
2. Ames BN. Mutagenesis and carcinogenesis: endogenous and exogenous factors. *Env Mol Mutagen* 1989; 14: suppl 16. p. 66-77.
3. Baik SC, Youn HS, Chung ME, Lee WK, Cho MJ, Ko GH, Park CK, Kasai H, Rhee K. Increased oxidative DNA damage in infected human gastric mucosa. *Câncer Res* 1996; 56: 1279-82.
4. Bernstein C, Bernstein H. Aging, sex and DNA repair. New York. Academic Press 1991. p. 15-25.
5. Boland CR, Luciani MG, Gasche C, Goel A. Infection, inflammation and gastrointestinal cancer. *Gut* 2005; 54: 1321-31.
6. Cho SH, Shim HJ, Lee SR, Ahn JS, Yang DH, Kim YK, Nam TK, Lee JJ, Kim HJ, Chung JI. Concurrent chemoradiotherapy with S – 1 and cisplatin in advanced esophageal cancer. *Diseases of the esophagus* 2008; 21: 697-703.
7. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidants vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* 1994; suppl. 3A: 5S – 13S.
8. Henry MACA, Lerco MM, Oliveira WK. Câncer do esôfago em pacientes com megaesôfago chagásico. *Arq Gastroent* 2007; 44: 151-5.
9. Higginson, J. Changing concepts in câncer prevention: limitations and implications for future research in environmental carcinogenesis. *Câncer Res* 1988; 48: 1381-89.
10. Kings JS, Philips JW, Morgan WF. The role DNA Double strand break rejoining in chromosome damage in repair. In: Natarajan AT. Chromosomal Alteration. Berlin: Springer – Verlag 1994. p. 65-5.
11. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnston GN. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mut Res* 1996; 363: 89-96.
12. Ladeira MSP, Rodrigues MAM, Salvadori DMF, Queiroz DMM, Freire, Maia DV. DNA damage in patients infected by *Helicobacter pylori*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 631-7.
13. Moraes-Filho JP, Cecconello I, Gama-Rodrigues JJ, Paula Castro L, Henry MACA, Meneghelli V, Quigley E. Brazilian consensus on gastroesophageal reflux disease: proposals for assessment, classification and management. *Amer J Gastroent* 2002; 97: 241-8.

14. Olliver JR, Hardie LJ, Gong YY, Dexter S, Chalmers D, Harris KM, Wild CP. Risk factors, DNA damage, and disease progression in Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 620.
15. Piseigna, J, Holtmann G, Howdwn CW, Katelaris PH, Sharma P, Spechler S. Review article: oesophageal complications and consequences of persistent gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20(suppl 9): 47-56.
16. Pool-Zobel BL, Bub AH, Wollowski I, Rechmmer G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of human intervention trial with carotenoid rich foods. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1847-50.
17. Reis LFL, Gomes LI, Brentani RR. Biologia molecular no câncer. In: Gama-Rodrigues JJ, Machado MCC, Rasslan S. *Clínica Cirúrgica*. Barueri, SP – Manole, 2008, p. 1636-43.
18. Savary G e Miller M. The esophagus. *Handbook and atlas of endoscopy*. Solothum: Verlag Gassmann, 1978; p. 135-42.
19. Schottenfeld D e Beebe-Dimmer J. Chronic inflammation a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 69-83.
20. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184-91.
21. Sokol RJ, Hoffenberg EJ. Antioxidantes na doença gastrointestinal pediátrica. *Clinicas Pediatr AM Norte*, Rio de Janeiro, 1997, v. 8, p. 457-72.
22. Speit G, Hartmann A. The contribution of excision repair to the DNA effects in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 1995; 10: 555-9.
23. Terciotti Jr V, Lopes LR, Coelho Neto JS, Andreollo NA. Aspectos atuais da terapêutica neoadjuvante no carcinoma epidermóide de esôfago. *Revisão da literatura*. *Arq Bras Cir Dig* 2009; 22: 33-40.
24. Terzoudi GI, Pantelias GE. Conversion of DNA damage into chromosome damage in response to cell cycle regulation of chromatin condensation after irradiation. *Mutagenesis* 1997; 14: 271-6.
25. Tice RR. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillis DH, Venis S. *Env Mol Mutag*, Oxford, Bios Scientific Publishers, 1995. p. 315-333.
26. Tseng PH, Lee YC, Chiu HM, Huang SP, Liao WC, Chen CC, Wang CC, Wang HP, Wu MS, Lin JT. Prevalence and clinical characteristics of Barrett's esophagus in a Chinese general population. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 1074-8.
27. Valladares G, Brecht CG, Dias Lan LC, Souza Filho ZA, Tomasich FDS, Malafaia O. Esofagogastrectomia com linfadenectomia em dois campos no câncer do esôfago torácico. *Rev Col Brás Cir* 2008; 35: 374-81.