

MELATONINA ASOCIADA A INHIBICION ACIDA COMO ESTRATEGIA DE QUIMIOPREVENCION EN ESOFAGO DE BARRETT.



Trabajo Fin de Master
Master en Iniciación a la Investigación en Medicina
Facultad de Medicina
Universidad de Zaragoza

Pedro Lacarta García

INDICE

Introducción.....	pág. 2
Objetivo.....	pág. 9
Material y Métodos.....	pág. 9
Bibliografía.....	pág. 16

INTRODUCCION

El esófago de Barrett (EB) es una de las patologías más fascinantes en Gastroenterología. Su asociación con adenocarcinoma de esófago (ADC), el explosivo crecimiento en Europa y los Estados Unidos desde 1980, y el potencial fácil diagnóstico de lesiones preneoplásicas con el seguimiento y monitorización que hacen de ella una enfermedad atractiva tanto para los clínicos como para investigadores. La patología recibió el nombre del Dr. Norman Barrett, quien en 1950 describió un estómago intratorácico secundario a "esófago corto congénito" (1). Poco después este error fue subsanado, y era la condición que se definió como una metaplasia columnar reemplazando el escamoso epitelio en el esófago distal (1), que aclaró el hecho de que un esófago corto pudo ser una observación equívoca, siendo este un esófago normal en longitud, pero que tiene un epitelio interior diferente. En 1961 Hayward sugirió que sólo una metaplasia mayor de 3 cm por encima del cardias era anormal, pudiéndose considerar una mucosa transicional (cardial) entre el epitelio escamoso de esófago y el epitelio columnar gástrico, hasta 3 cm de largo en un adulto sano. Curiosamente, a pesar de su carácter puramente especulativo, esta descripción se convertiría en dogma durante más de 30 años (1). Chandrasoma et al. (2), en un estudio de necropsia, reveló que este epitelio cardial (mucosa de células columnares) estaba prácticamente ausente en los individuos menores de 20 años, y su presencia longitud incrementaba con la edad, y sugirió que este "epitelio transicional" no era normal metaplásico. Oberg et al. (3) estudiaron la asociación entre epitelio cardial y exposición ácida utilizando distal pH-metría esofágica y manometría esofágica y demostraron que el epitelio cardial era significativamente más común en pacientes con reflujo gastroesofágico (RGE) y esfínter manométricamente incompetente, concluyendo que este cambio puede ser causado por reflujo gastroesofágico y no era atribuible a la infección con Helicobacter pylori, que sólo se encontraba en el 11% de los pacientes con metaplasia.

Estos hechos fueron determinantes para nuestra comprensión actual y la definición de esta enfermedad (4). Se admite que esta enfermedad se adquiere casi exclusivamente por reflujo gastroesofágico, pero la controversia se mantiene cuando se trata de definir el EB. La definición británica y japonesa (5) considera que "es un esófago donde el epitelio escamoso ha sido parcialmente reemplazado por una metaplasia de epitelio cilíndrico que es macroscópicamente visible. Un diagnóstico positivo de metaplasia cilíndrica requiere la observación por encima de la unión gastroesofágica así como la confirmación histológica." Sin embargo, la definición de las guías americanas y europeas, consideran EB la condición en la que la metaplasia intestinal (MI) puede ser demostrada por histología (6,7), y algunos autores mantienen que no puede ser diagnosticado en ausencia de células caliciformes (8). La falta de una definición universalmente aceptada para EB, con las variantes antes mencionadas, se ha

traducido en confusión y dificultades para comparar los diversos estudios sobre este tema.

Un aspecto particularmente interesante del EB es la distribución en "mosaico" de los cambios en las células, por lo general con metaplasia cardial, metaplasia intestinal, y incluso con zonas de displasia. Diferentes estudios han demostrado que la metaplasia intestinal se encuentra en la porción más proximal del epitelio cilíndrico (9). Sin embargo, lo más importante en términos clínicos es el hecho de que sólo la metaplasia intestinal puede seguir la secuencia de displasia de bajo grado (DBG), de displasia de alto grado (DAG), y adenocarcinoma (ADC) (10). Por lo tanto la mayoría de autores consideran al EB cualquier metaplasia columnar endoscópicamente visible en el esófago distal, donde la histología demuestra la presencia de células caliciformes secretoras de mucina, que es característico de metaplasia intestinal (10). Sin embargo, estudios recientes muestran que la mucosa cardial es la metaplasia más comúnmente encontrados en esófago ADC (11), y que la presencia de la mucosa glandular sin metaplasia intestinal en el esófago tiene un riesgo similar de neoplasia en comparación con los casos con metaplasia intestinal (12). Estos nuevos datos llevan a reconsiderar la necesidad de células caliciformes en las biopsias de esófago para el diagnóstico de EB.

Como lesión premaligna la metaplasia intestinal puede progresar a displasia de bajo grado (DBG), displasia de alto grado o neoplasia intraepitelial. DBG se caracteriza por mantener su arquitectura glandular, los núcleos aumentados tanto en número como en tamaño y que son por lo general alargados y estratificados hasta dos tercios de la célula, aunque nunca alcanzando el tercio luminal o polo de la célula, y sin perder nunca su posición perpendicular con respecto a la membrana basal. Hay hipercromía nuclear, presencia de mitosis sin características atípicas, y la disminución de mucina citoplasmática. La DAG se presenta con distorsión de la arquitectura, con ramificación glandular, transformación de las vellosidades en la superficie de la mucosa, puentes intraglandulares epiteliales y una agrupación de la glándula compacta. Un severo aumento en el número y tamaño de los núcleos puede ser visto, junto con pleomorfismo nuclear, contorno irregular e hipercromía nuclear. Existe también una pronunciada estratificación nuclear con pérdida de la polaridad nuclear, con muchos núcleos alcanzando el polo luminal. Aumento en el número de mitosis siendo éstas atípicas. Pueden verse nucleolos prominentes. Generalmente, no existe secreción de mucina. Se considera neoplasia intraepitelial si la lámina propia está ilesa. El ADC muestra los cambios mencionados anteriormente y además pérdida completa de la arquitectura glandular e invasión de la lámina propia.

La incidencia del adenocarcinoma de esófago (ACE) ha aumentado significativamente en los últimos años en el mundo occidental (13). Se cree que este rápido incremento se debe al aumento de la incidencia y prevalencia de la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), ya que hoy está bien establecido el hecho de que el ACE se origina a partir de epitelio metaplásico columnar de tipo intestinal del esófago o Esófago de Barrett (EB), que a su vez es consecuencia de la ERGE, como ya se ha mencionado. El EB es así el principal factor predisponente para el desarrollo de ACE, estimándose que se desarrolla en un 10% de individuos con ERGE, y que su presencia aumenta el riesgo de desarrollar ACE entre 30 y 125 veces. La conversión anual de EB a cáncer es de 0.5-1%/año.

En la actualidad, y como ya se ha explicado, se conoce bien que la progresión del esófago normal a ACE constituye un proceso complejo con varias etapas caracterizadas por cambios histológicos en la mucosa: inflamación, metaplasia, displasia (bajo y alto grado), carcinoma *in situ* y finalmente adenocarcinoma invasivo. La frecuencia del diagnóstico de EB ha aumentado de forma alarmante en el mundo occidental, incluido nuestro país. En nuestro centro, en los últimos 25 años, se han diagnosticado 474 casos nuevos de EB, de los que 256 eran de segmento largo. La incidencia ajustada ha pasado de 0,81 a 11,91 casos/100.000 habitantes en el primer y último cuartil del periodo evaluado. En términos de prevalencia, el incremento ha sido de 23,7 veces, lo que no se ha correspondido con un incremento del número de endoscopias altas, ya que éste solo aumentó 1,9 veces. La incidencia de displasia fue de 1 caso por 47 pacientes-año y de 1 caso de ACE cada 120 pacientes y año.

El ACE tiene muy mal pronóstico, con una supervivencia a 5 años de un 10% a pesar de la aplicación de nuevas modalidades terapéuticas. Por esta razón, en los últimos años, la investigación en el ACE se ha centrado en comprender los cambios biológicos y moleculares que tienen lugar en la secuencia metaplasia-displasia-AC con el objetivo de diseñar estrategias de quimioprevención de ACE en pacientes con EB.

En la actualidad, el manejo terapéutico de los pacientes con Barrett se limita a la inhibición ácida con Inhibidores de la bomba de protones (IBPs). Existen estudios que sugieren que el tratamiento con IBPs podría reducir el riesgo de desarrollar cáncer en pacientes con EB (14-16). Así, se ha visto que la normalización del pH intraesofágico utilizando inhibidores de la bomba de protones (IBPs) durante 6 meses disminuye la proliferación y aumenta la diferenciación celular en el epitelio metaplásico de Barrett. Más aún, se ha demostrado que los pacientes tratados con IBPs, además de disminución de la proliferación, presentan menos anomalías del ciclo celular en biopsias de Barrett que los pacientes tratados con anti H2 en los que no se controlaba adecuadamente la secreción ácida. Finalmente, se ha visto que los pacientes tratados con IBPs tienen una disminución significativa del riesgo de desarrollar displasia en el

epitelio de Barrett respecto a los pacientes que no son tratados o lo son con anti H2 (17). Sin embargo, la terapia con IBPs no elimina de manera absoluta el riesgo de desarrollar displasia y por tanto adenocarcinoma. Se hace pues necesario encontrar nuevos agentes quimioprotectores que asociados a los IBPs consigan frenar de una forma más efectiva la progresión neoplásica del EB.

En la actualidad se barajan diversas estrategias de quimioprevención. Entre los agentes que están siendo objeto de investigación se encuentran el ácido acetil salicílico, la vitamina A o los antioxidantes entre otros. Respecto a estos últimos, existen evidencias a diversos niveles que avalan su potencial aplicación en la prevención del adenocarcinoma de esófago. A nivel experimental en modelos de adenocarcinoma esofágico inducido por reflujo gastroduodenal en ratas se ha demostrado que la progresión neoplásica de la mucosa esofágica se asocia con un aumento paralelo de los niveles de anión superóxido y peroxinitritos en la mucosa esofágica (18). En biopsias humanas de Barrett también se han demostrado niveles elevados de radicales libres (19). Diversos estudios han puesto de manifiesto que la progresión de EB a adenocarcinoma se acompaña además de una disminución de los sistemas antioxidantes. Así, en la rata, la actividad superóxido dismutasa disminuye de manera significativa después de la realización de una esofagoyeyunostomía (18). En humanos, también se ha visto una disminución en la expresión de la enzima manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) en pacientes con EB con displasia de bajo o alto grado (19). De esta manera, el exceso de producción de radicales libres junto con un sistema antioxidante insuficiente contribuye a perpetuar un estado de estrés oxidativo en el esófago de estos pacientes. Este estrés oxidativo es capaz de lesionar las diferentes macromoléculas celulares, incluyendo el ADN. En efecto, los radicales libres son considerados hoy en día potentes carcinógenos capaces tanto de iniciar como de promover el cáncer, bien por efecto directo (oxidación, nitración, halogenación de ADN, ARN y lípidos), o indirectamente, a través de las moléculas resultantes de la reacción de los radicales libres con las proteínas, lípidos y carbohidratos que a su vez forman aductos de ADN.

La detección de estas lesiones inducidas por los ROS a nivel molecular en muestras de tejido de EB y adenocarcinoma esofágico refuerza la hipótesis de que el estrés oxidativo sea un factor causal en la adenocarcinogénesis esofágica. Chen et al. (20) demostraron que el daño oxidativo del ADN (8-hydroxy-2'-deoxyguanosina), proteína (contenido carbonilo) y lípidos (ácido tiobarbitúrico) en el esófago de la rata después de una anastomosis esofagoduodenal era muy superior al de las ratas control no operadas. Estos autores demostraron además que en este modelo las células columnares eran diana de los radicales libres, ya que estas células presentaban una sobreexpresión de dos genes de respuesta al estrés oxidativo, la hemo oxidasa 1 y la metalotionina. Un estudio reciente ha demostrado que incluso concentraciones

fisiológicas de óxido nítrico (NO) pueden producir daño en el ADN en células de Barrett sin displasia, con displasia de alto grado o células de adenocarcinoma (21). En este mismo estudio, demostraron que tanto el ácido como las sales biliares y en particular el ácido deoxicólico inducen la liberación de ROS y a su vez producen lesiones cromosómicas. Además se ha visto que el aumento de los niveles intracelulares de ROS inducidos por ácidos biliares no conjungados, producen una activación de las vías de señalización PI3K y ERK1/2, y como consecuencia la expresión de COX-2, que se sabe que está implicada en la carcinogénesis esofágica (22, 23). Aunque la mayor parte de la evidencia deriva de modelos experimentales, algunos estudios han puesto de manifiesto la presencia de daño oxidativo en la secuencia humana esofagitis-metaplasia-displasia-adenocarcinoma. Shivo et al. (24) encontraron un aumento de los aductos de ADN en la mucosa de pacientes con esofagitis, EB o adenocarcinoma en comparación con la mucosa de pacientes sin patología esofágica. Otro marcador de lesión oxidativa del ADN, 8-hidroxideoxiguanosina, se ha encontrado aumentada en pacientes con metaplasia de Barrett con y sin displasia así como con adenocarcinoma en comparación con los controles sanos. En otro estudio, el daño del ADN, medido mediante el “ensayo cometa” era superior en la mucosa de Barrett comparado con la mucosa normal escamosa o gástrica del mismo paciente. En dicho estudio, la magnitud del daño del ADN presente en el tejido de Barrett resultó ser un factor de riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma, dado que en un modelo de regresión logística, los pacientes con daño en el ADN en el más alto cuartil tendían aumento del riesgo de desarrollar ACE de 9.4 veces superior a los que se encontraban en el cuartil inferior (25).

Tabla 1. Cambios genéticos en EB (26)

-
- Cromosómicos
 - Perdida de heterocigosidad
 - Aneuploidía
 - Inestabilidad cromosómica
 - Delecciones: APC (adenomatous polyposis gene), MCC and DCC (colorectal cáncer), RB1 (retinoblastoma)
 - Moleculares (cambios en la expresión normal de los genes)
 - Amplificación (cyclin D1, c-erbB2)
 - Mutación (p53, K-ras)
 - Sobreexpresión (COX-2, bcl2)
-

Delección o hipermetilación (p16)

Infraexpresión (cadherin)

Diversos estudios han evaluado el uso de diversas sustancias antioxidantes “barredoras” de radicales libres como agentes terapéuticas en la prevención del EB y su progresión a EAC. La mayoría de ellos han demostrado un efecto beneficioso del tratamiento con antioxidantes en la prevención de ambos (27). En un estudio realizado por el grupo de investigación del Servicio de Aparato Digestivo del HCU Lozano Blesa, la administración de SOD (orgoteína) disminuyó significativamente la incidencia de metaplasia intestinal y adenocarcinoma en un modelo de reflujo gastroduodenal en rata (19). En este estudio, la administración de SOD se asoció a una disminución del riesgo relativo del 68% de desarrollar Barrett y del 76% para adenocarcinoma. En otro estudio en este mismo modelo, el tratamiento con MnSOD produjo un descenso del daño oxidativo (peroxidación lipídica y 8-hydroxyguanosina), junto con una disminución en la incidencia del EB y ACE.

Las evidencias del efecto beneficioso de los antioxidantes en la prevención del ACE humano derivan de estudios epidemiológicos. Recientemente, un estudio caso-control ha demostrado que la ingesta baja de vitamina C y E se correlacionan con el desarrollo de ACE (28). Otro estudio caso-control ha puesto de manifiesto que la ingesta de vitamina C, beta-caroteno y alfa tocoferol se asocian con una disminución de ACE y carcinoma escamoso (29). En este estudio, los individuos que consumían más cantidad de estos tres antioxidantes tenían una disminución de un 40-50% del riesgo de desarrollar ambos tipos de cáncer. Hay que destacar que esta asociación inversa era incluso mayor en sujetos con reflujo gastroesofágico, en los que presumiblemente hay mayor estrés oxidativo. Los resultados de un metaanálisis publicado recientemente incluyendo 10 estudios sugieren en efecto que la ingesta de antioxidantes puede proteger del adenocarcinoma de esófago (30).

A la vista de estas evidencias, parece pertinente la realización de un ensayo clínico en humanos que determine si, en efecto, la administración de antioxidantes es eficaz en la prevención del ACE en pacientes con EB. Entre los diferentes antioxidantes posibles, la melatonina reúne una serie de características que hacen de ella la candidata idónea (31). La N-acetyl-5-metoxi-triptamina o melatonina es un producto derivado del metabolismo del aminoácido triptófano. En mamíferos, su síntesis ocurre principalmente en la glándula pineal, a través de un fino control por el sistema nervioso. Otros tejidos también sintetizan melatonina, destacando, por su tasa de producción, la retina, el hipotálamo y el tracto gastrointestinal. A diferencia de otros antioxidantes, la melatonina es un barredor tanto de especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido y el radical hidroxilo, como de especies reactivas de nitrógeno, incluyendo NO y peroxinitritos (32). La melatonina también puede actuar

sobre enzimas relacionados con el sistema de defensa frente a radicales libres, bien estimulando la actividad de enzimas que intervienen en su eliminación como la superóxido dismutasa y la glutation peroxidasa, o bien inhibiendo aquellos que promueven su formación como la óxido nítrico sintetasa (32). La acción antioxidante de la melatonina se ve favorecida además por su doble comportamiento lipo e hidrosoluble, peculiaridad que le permite una fácil difusión en todos los compartimientos celulares. La melatonina además aumenta la eficiencia de la cadena respiratoria, aumentando la síntesis de ATP (33). Además, la melatonina tiene la capacidad de bloquear los factores de transcripción inducidos por citoquinas proinflamatorias. El conjunto de estas acciones que presenta la melatonina no se reúnen en ninguna otra molécula antioxidante disponible. Además de estas propiedades como antioxidante, la melatonina tanto a dosis fisiológicas como farmacológicas ha demostrado tener efectos antitumorales en diversos modelos *in vitro* e *in vivo* de neoplasia como mama, próstata, hipófisis, melanomas, carcinoma de pulmón, cáncer de colon, de útero y gliomas (34). A pesar de que los resultados han sido muy variables, desde una respuesta oncostática a ninguna, quizá debido a las diferentes condiciones experimentales tales como dosis, duración del tratamiento, momento de administración, etc., un hallazgo común de todos estos estudios *in vivo* ha sido la ausencia de efectos secundarios. La melatonina se ha probado también en algunos ensayos clínicos como terapia adyuvante en diversos tipos de tumores como mama, pulmón o melanoma, donde se ha visto respuesta en algunos casos pero también que aumenta la sensibilidad a algunos citostáticos.

En conclusión, las evidencias abrumadoras de la importancia de los radicales libres en la progresión del daño esofágico, de su mediación en la progresión de esofagitis a Esófago de Barrett y adenocarcinoma en humanos, junto a los datos experimentales que señalan un efecto potente de los agentes antioxidantes en la prevención del daño y de la progresión tumoral a adenocarcinoma esofágico, refuerzan la necesidad de un estudio piloto en humanos. La seguridad clínica de la melatonina junto a su potente efecto antioxidante ante los mediadores de lesión por radicales libres vistos en la lesión esofágica por reflujo gastroesofágico, hacen de ella el candidato ideal para ser evaluada como agente quimiopreventivo en pacientes con Esófago de Barrett.

JUSTIFICACION Y RELEVANCIA CLINICA

La esofagitis por reflujo y en general las lesiones localizadas en el esófago (esófago de Barrett y carcinoma) se encuentran entre las patologías más prevalentes del aparato digestivo y más rebeldes al manejo médico-quirúrgico. De hecho la frecuencia de esta patología está aumentando de forma casi espectacular en el mundo occidental, como lo demuestra el hecho de que en nuestro medio, la incidencia por ejemplo de Barrett

diagnosticado se haya multiplicado por 18 en los últimos 25 años. El esófago de Barrett es una de las patologías relacionadas con el reflujo gastroesofágico que mayor interés suscitan tanto por el desconocimiento de los mecanismos íntimos que desembocan en su aparición, como por su condición de enfermedad pre-neoplásica. Las actuales terapéuticas han demostrado que ni el tratamiento con inhibidores de la bomba de protones, ni la cirugía antirreflujo reducen la longitud del esófago de Barrett y no parecen alterar la posibilidad de progresión a adenocarcinoma. En los últimos años, numerosos estudios señalan que los antioxidantes pueden ser de utilidad como agentes quimioprofilácticos. Dado que estos fármacos son bien tolerados y están exentos de efectos secundarios se considera llegado el momento de su paso a la clínica. Este estudio piloto trata de evaluar su efecto en esta indicación midiendo parámetros subclínicos que pueden señalar de forma precoz su utilidad y que podría servir para lanzar un ensayo de mayor envergadura a nivel nacional con "endpoints" clínicos multicéntricos en el seno de sociedades científicas de la especialidad.

OBJETIVO

Establecer si la melatonina previene la progresión neoplásica del esófago de Barrett. Específicamente, determinar si la melatonina reduce el estrés oxidativo de la mucosa esofágica de Barrett tras 6 meses de tratamiento continuado.

Como objetivos secundarios adicionales se evaluará si la melatonina afecta a otros mecanismos asociados a progresión neoplásica en pacientes con esófago de Barrett, incluyendo proliferación y apoptosis, así como marcadores moleculares de progresión: 17pLOH, 9pLOH, metilación de p16 y presencia de anomalías en el contenido de ADN (tetraploidía y/o aneuploidía).

MATERIAL Y METODOS

Con objeto de llevar a cabo el objetivo clínico se ha diseñado un ensayo clínico piloto en fase IV, abierto y aleatorizado. Se incluyen pacientes de ambos sexos (>18 años) diagnosticados de Esófago de Barrett ≥ 2 cm en endoscopia rutinaria o revisión (no dirigida específicamente a la inclusión de pacientes para este estudio), sin esofagitis, que firmen el consentimiento informado. Se excluyen pacientes que cumplan los siguientes criterios.

Criterios de Exclusión:

- a) Presencia en la endoscopia basal de displasia de alto grado o carcinoma.
- b) Cirugía gástrica o esofágica previa.
- c) Pacientes en tratamiento con AINEs (incluyendo AAS y coxibs); Se permite el uso de un máximo de 5/días al mes, durante el periodo del estudio.
- d) Enfermedades malignas < 5 años
- e) Enfermedades hematológicas graves; anemia Hb< 9.5 gr/dL., Trastornos de la coagulación
- f) Cardiopatía congestiva moderada o severa; Hipertensión no controlada;
- g) Enfermedad hepática moderada o severa; Enfermedad renal moderada o severa;
- h) Necesidad de toma de corticoides (se permite terapia local o inhalada)
- i) Pacientes que estén o precisen tomar misoprostol, anticoagulantes (warfarina) Se permite historia de uso previo si lo han dejado 2 meses antes del inicio del estudio.
- j) Pacientes que sufran de enfermedad inflamatoria intestinal crónica;
- k) Alergia a IBPs

Fuente de pacientes: El servicio de Aparato Digestivo del HCU tiene registrados en base de datos los pacientes con EB. El registro incluye más de 450 casos en los últimos 20 años, de los que más de 200 se encuentran en seguimiento y control por este centro (Alcedo et al. Dis Esophagus).

Se trata de un estudio abierto aleatorizado donde los pacientes reciben uno de los dos tratamientos siguientes:

- Grupo 1: Inhibidor de la bomba de protones (fármaco y dosis igual al que tomaba antes de la inclusión si el paciente estaba estable y asintomático).
- Grupo 2: Inhibidor de la bomba de protones y melatonina 6mg/12 horas (CIRCADIN 3 comprimidos/12 h). La aleatorización se realizará a través de un listado generado por ordenador, que se conoce tras la firma del consentimiento informado y la inclusión del paciente en el estudio.

Protocolo de visitas

Visita 0 (dentro de los 20 días previos a V1):

- a) Endoscopia basal con toma de biopsias (solicitada de manera rutinaria)
- b) Revisión de los criterios de inclusión y exclusión;
- c) Propuesta de entrada y consentimiento informado.

Visita 1 (Día 0):

- a) Historia clínica y exploración;
- b) Hemograma y Bioquímica rutinaria;
- c) Prescripción de la medicación acorde a la aleatorización.

Visita 2 (Día 30±5):

- a) Revisión síntomas y exploración;
- b) Revisión de la medicación tomada;
- c) Prescripción de medicación del estudio

Visita 3 (día 90±7):

- a) Revisión síntomas y exploración;
- b) Revisión de la medicación tomada;
- c) Prescripción de medicación del estudio

Visita 4 (Día 180±14):

- a) Revisión clínica;
- b) Hemograma y Bioquímica rutinaria;
- c) Revisión de la medicación tomada).
- d) Endoscopia y biopsias de acuerdo al protocolo.

En caso de salida prematura se efectuará endoscopia final para inclusión en análisis ITT.

En la endoscopia se recogerá la presencia de úlcera esofágica y el tamaño de la misma, así como de erosiones, petequias o estenosis. Se graduará la presencia de esofagitis según la clasificación de Los Angeles. Se medirá la distancia a cardias. En cuanto al

Esófago de Barrett se dejará constancia de la longitud y extensión de la mucosa metaplásica según la clasificación de Montreal, si existen islotes de mucosa escamosa intercalada en la mucosa metaplásica, la presencia de anillos esofágicos y si existe irregularidad de la línea Z. Las biopsias se tomaran en cada centímetro en 2 cuadrantes diferentes a los tomados en el centímetro anterior (cada 2 centímetros se habrán obtenido biopsias de los 4 cuadrantes).

En estómago se recogerá la presencia de úlceras especificando su tamaño y localización, la existencia de hernia de hiato. De la misma manera que en el esófago se recogerá la presencia de erosiones, petequias o estenosis. En duodeno se constatará la presencia de erosiones o úlceras y el tamaño y localización de las mismas. Se tomarán dos biopsias adicionales de duodeno como control para los estudios immunohistoquímicos y de antro pilórico para determinar la presencia de Helicobacter pylori. Las biopsias se fijaran en formaldehido al 10% y parafina y serán enviadas al patólogo central. Dos patólogos independientes efectuarán los estudios histopatológicos. Dicha endoscopia se repetirá en la última visita.

En cuanto a la historia clínica se recogerá una serie de antecedentes personales como son sexo, edad, antecedentes familiares directos de cáncer de Esófago, antecedentes familiares directos de historia RGE, antecedentes de otros cánceres GI. Se interrogará al paciente acerca de sus hábitos dejando constancia de si el paciente es exfumador o fumador y los cigarrillo/día que consume así como de si tiene hábito enólico reflejando el consumo de alcohol en gramos semanales. Se investigarán antecedentes de RGE en el paciente así como una anamnesis para determinar sus antecedentes de médicos y quirúrgicos. Se registrará la medicación habitual que tome el paciente.

Asimismo el paciente responderá a un cuestionario con una serie de ítems en el que tendrá que reflejar si presenta alguno de los síntomas gastrointestinales incluidos clasificándolos entre ninguno, leve, moderado, grave. Los síntomas son: pirosis, regurgitación, disfagia, odinofagia, nausea, vómitos, dolor torácico, dolor en epigastrio, ardor epigástrico, desconfort en epigastrio, otros síntomas (campo abierto).

Se hará una exploración física sistemática del paciente y se extraerá una analítica con una bioquímica básica (glucosa, urea, creatinina, iones) y un hemograma. Esta analítica se repetirá en la última visita. En la segunda y tercera visita se reevaluarán los síntomas y se reexplorará al paciente.

DETERMINACIONES:

a) Marcadores de estrés oxidativo:

1. Producción de peroxinitritos: La presencia de peroxinitritos se determinará mediante tinción inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal anti-nitrotirosina (Chemicon, Temecula, CA, USA).

2. Daño oxidativo del ADN: Se determinarán los niveles de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine en las biopsias de Barrett. Para ello se extraerá el ADN mediante un kit comercial de Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit). Una vez extraído se digerirá con DNAsa I, fosfatasa alcalina, nucleasa P1 y fosfodiesterasas I y II. La cuantificación de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosina se realizará mediante enzimoinmunoensayo (Bioxytech 8-OHdG-EIA kit, OXIS Health Products).

b) Marcadores de progresión:

En primer lugar se establecerá un diagnóstico del tipo de lesión (mucosa de Barrett sin displasia, mucosa de Barrett con displasia de bajo grado en endoscopias basal y mucosa de Barrett sin displasia, mucosa de Barrett con displasia de bajo grado, alto grado o adenocarcinoma en la endoscopia final). Los patólogos no conocerán el tratamiento recibido por los pacientes. En todas las biopsias se estudiará:

- i. **proliferación celular** (antígeno ki67-mib1) por morfometría automatizada por ordenador (NIH-Image 6.1). La muestra entera de cada biopsia se digitalizará y se obtendrá una media (índice) de células epiteliales proliferantes vs total de células en glándulas.
- ii. **Apoptosis:** Se analizará por inmunohistoquímica (caspasa 3 activa). La muestra entera de cada biopsia se digitalizará para el estudio morfométrico al igual que en el caso de la proliferación.
- iii. **Marcadores moleculares de progresión:** Los marcadores a evaluar son: 17pLOH, 9pLOH, metilación de p16 y presencia de anomalías en el contenido de ADN (tetraploidía y/o aneuploidía).

Para determinar la presencia o ausencia de **17pLOH y 9pLOH** se utilizarán secciones de tejido de 10 µm de grosor teñidas con Hematoxilina-Eosina (H&E). Se realizará microdissección de las áreas de tejido que contengan el mayor grado de lesión histológica mediante captura por láser (LCM, laser capture microdissection). Se procederá a extraer el ADN de las células capturadas mediante un kit comercial de Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit). Con objeto de obtener suficiente cantidad de ADN para el análisis de LOH, el ADN obtenido se amplificará mediante whole-genome amplification utilizando un kit de Amersham (illustra GenomaPhi V2 DNA Amplification kit). De acuerdo con estudios previos, se evaluarán 13 microsatélites: para 17p: D17S1298 (3.87 Mbp), D17S1537 (6.10 Mbp), TP53-ALU (AAAAT)n en intron 1 (7.77

Mbp), TP53 (CA)n (7.77 Mbp), D17S786 (9.01 Mbp), D17S974 (10.72 Mbp), D17S1303 (11.06 M y los loci 9p D9S2169 (5.19Mbp), D9S935 (5.19 Mbp), D9S925 (18.28 Mbp), D9S932 (24.43 Mbp), D9S1121 (25.39 Mbp), y D9S1118 (31.92 Mbp). Los productos de PCR se analizarán en un secuenciador automático. La pérdida de heterocigosidad se determinará según la relación entre la altura de los picos de las muestras de tejido metaplásico en relación con el tejido control (se utilizará el ADN obtenido de sangre periférica de los pacientes).

La **cuantificación de ADN** para determinar la presencia de anomalías en el contenido del mismo (tetraploidía y/o aneuploidía) se determinará mediante citometría estática en las muestras de Barrett fijadas e incluidas en parafina. Existen trabajos recientes que avalan el uso de esta técnica para el estudio de anomalías en el contenido de ADN en biosias de esófago de Barrett fijadas en formol y parafinadas (Fang et al. Am J Gastroenterol 2004;99:1887-1894; Yu et al. Lab Investigation 2007; 87: 466-472). Se obtendrán 2 secciones adyacentes (de 5 µm de espesor): una para tinción con H&E y otra para tinción con reactivo de Feulgen (Feulgen Stain Kit, Artisan™, Dako Cytomation). El área de interés (área que contenga el mayor grado de lesión histológica) se identificará microscópicamente y se señalará en las secciones teñidas con H&E. El área correspondiente en la sección adyacente teñida con el reactivo de Feulgen se seleccionará para el análisis de ADN. Por medio de un software de análisis de imagen y a través de una cámara de vídeo integrada en el microscopio, que capta escalas de grises, se obtendrán los histogramas de ADN. Como control se utilizarán las células no epiteliales presentes en la muestra. Se seleccionarán alrededor de 50 células control y 200 células epiteliales. Las imágenes digitalizadas de los núcleos de las células a analizar se guardan de forma individualizada y se convierten en una serie de pixels que son cuantificados mediante el valor de la densidad óptica integrada (IOD), que representa el contenido de ADN. Al valor medio de IOD de las células control se le asigna un índice de ADN (ID) con un valor de 1, que nos sirve como control interno diploide de referencia para calcular el ID de las células epiteliales a estudio. Se obtendrán histogramas de ADN representando la frecuencia de distribución de los valores de ID en la población de células a estudio.

Para el análisis del estado de metilación de p16, en primer lugar las muestras de ADN serán tratadas con bisulfito sódico. La conversión con bisulfito se realizará con el EZ DNA Methylation Kit™ (Zymo Research). Para la cuantificación del grado de metilación se utilizará el kit PyroMark p16 (Biotage). El producto de PCR obtenido así se analizará mediante el sistema de pirosecuenciación PSQ96MA (Biotage) y se cuantificará mediante el software Pyro Q-CpG™, que nos da el porcentaje de ADN metilado.

Los datos se recogerán en CRFs e introducidos en una base de datos. Se registrarán los efectos adversos potenciales que serán comunicados a la AEM. Los investigadores revisarán bimensualmente conjuntamente con las 4 personas ajenas al ensayo, el grado de seguridad del estudio.

El estudio estadístico de los resultados obtenidos se efectuará mediante los paquetes informáticos SPSS y BMDP en colaboración con el grupo de apoyo metodológico del ICS. Los datos se evaluarán desde una perspectiva temporal y en función de la intensidad o grado de respuesta. El tamaño muestral en el estudio clínico se ha estimado basado en los datos de estudios anteriores donde se estiman reducciones de estrés oxidativo en tejido superiores al 25% con el agente activo melatonina, frente a cambios mínimos en el grupo que solo toma IBP. Se ha estimado que una muestra mínima de 35 pacientes/ grupo detectara las diferencias estimadas entre grupos (valor beta 80%; valor alfa-error tipo I, 5%). Con una pérdida de hasta un 10% de pacientes por grupo se precisan incluir un total de 80 pacientes. El plan estadístico prevé presentar los datos mediante análisis descriptivo. Se analizara la distribución de las variables aplicando entonces test paramétricos o no paramétricos. Los datos relativos a los objetivos primarios se analizarán mediante análisis por intención de tratar modificado (todos los pacientes con endoscopia previa y final independientemente del tiempo de evolución) y por protocolo (aquellos con cumplimiento >75% y seguimiento completo). La concordancia entre los 2 patólogos se efectuará estimando el índice de concordancia Kappa. Se estima que se utilizarán test no paramétricos (Mann Witney y Kruskal-Walis) para las comparaciones entre grupos diferentes e intervenciones terapéuticas. Se efectuarán 2 tipo de estudios: cuantitativos basados en los índices de oxidación y morfométricos de proliferación y apoptosis, etc... No se ha previsto un análisis intermedio.

BIBLIOGRAFIA

1. Burdiles P, Csendes A, Smok G, Braghetto I, Korn O. Progression from intestinal metaplasia to adenocarcinoma in Barrett's esophagus: usefulness of endoscopic surveillance]. Rev Med Chil 2003; 131: 587-96.
2. Chandrasoma PT, Der R, Ma Y, Dalton P, Taira M. Histology of the gastroesophageal junction: an autopsy study. Am J Surg Pathol 2000; 24: 402-9.
3. Oberg S, DeMeester TR, Peters JH, Hagen JA, Nigro JJ, DeMeester SR, et al. The extent of Barrett's esophagus depends on the status of the lower esophageal sphincter and the degree of esophageal acid exposure. J Thorac Cardiovasc Surg 1999; 117: 572-80.
4. DeMeester SR, DeMeester TR. Columnar mucosa and intestinal metaplasia of the esophagus: fifty years of controversy. Ann Surg 2000; 231: 303-21.
5. Playford RJ. New British Society of Gastroenterology (BSG) guidelines for the diagnosis and management of Barrett's oesophagus. Gut 2006; 55: 442.
6. Sampliner RE. Updated guidelines for the diagnosis, surveillance, and therapy of Barrett's esophagus. Am J Gastroenterol 2002; 97: 1888-95.
7. Wang KK, Sampliner RE. Updated guidelines 2008 for the diagnosis, surveillance and therapy of Barrett's esophagus. Am J Gastroenterol 2008; 103: 788-97.
8. Batts K. Barrett's esophagus, more steps forward. Hum Pathol 2001; 32: 357-9.
9. Chandrasoma PT, Der R, Dalton P, Kobayashi G, Ma Y, Peters J, et al. Distribution and significance of epithelial types in columnar-lined esophagus. Am J Surg Pathol 2001; 25: 1188-93.
10. Spechler SJ. Clinical practice. Barrett's esophagus. N Engl J Med 2002; 346: 836-42.
11. Takubo K, Aida J, Naomoto Y, Sawabe M, Arai T, Shiraishi H, et al. Cardiac rather than intestinal-type background in endoscopic resection specimens of minute Barrett adenocarcinoma. Hum Pathol 2009; 40: 65-74.
12. Kelty CJ, Gough MD, Van Wyk Q, Stephenson TJ, Ackroyd R. Barrett's oesophagus: intestinal metaplasia is not essential for cancer risk. Scand J Gastroenterol 2007; 42: 1271-4.
13. Vizcaino AP, Moreno V, Lambert R, et al. Time trends incidence of both major histological types of esophageal adenocarcinoma in selected countries, 1973-1995. Int J Cancer 2002;99: 860-68.
14. Ouatu-Lascar R, Fitzgerald RC, Triadafilopoulos G. Differentiation and proliferation in Barrett's esophagus and the effects of acid suppression. Gastroenterology. 1999;117(2):327-35.
15. Peters FT, Ganesh S, Kuipers EJ, et al. Effect of elimination of acid reflux on epithelial cell proliferative activity of Barrett esophagus. Scand J Gastroenterol. 2000;35(12):1238-44.
16. Umansky M, Yasui W, Hallak A, et al. Proton pump inhibitors reduce cell cycle abnormalities in Barrett's esophagus. Oncogene. 2001;20(55):7987-91.
17. El-Serag HB, Aguirre TV, Davis S, et al. Proton pump inhibitors are associated with reduced incidence of dysplasia in Barrett's esophagus. Am J Gastroenterol. 2004;99(10):1877-83.
18. Piazuelo E, Cebrián C, Escartín A, et al. Superoxide dismutase prevents development of adenocarcinoma in a rat model of Barrett's esophagus. World J Gastroenterol. 2005;11:7436-43.

19. Jiménez P, Piazuelo E, Sánchez MT, et al. Free radicals and antioxidant systems in reflux esophagitis and Barrett's esophagus. *World J Gastroenterol.* 2005;11:2697-703.
20. Chen X, Ding YW, Yang G, et al. Oxidative damage in an esophageal adenocarcinoma model with rats. *Carcinogenesis.* 2000;21(2):257-63.
21. Clemons NJ, McColl KE, Fitzgerald RC. Nitric oxide and acid induce double-strand DNA breaks in Barrett's esophagus carcinogenesis via distinct mechanisms. *Gastroenterology.* 2007;133:1198-209.
22. Jenkins GJ, D'Souza FR, Suzen SH, et al. Deoxycholic acid at neutral and acid pH, is genotoxic to oesophageal cells through the induction of ROS: The potential role of anti-oxidants in Barrett's oesophagus. *Carcinogenesis.* 2007;28:136-42.
23. Song S, Guha S, Liu K, et al. COX-2 induction by unconjugated bile acids involves reactive oxygen species-mediated signalling pathways in Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *Gut.* 2007;56:1512-21.
24. Sihvo EI, Salminen JT, Rantanen TK, et al. Oxidative stress has a role in malignant transformation in Barrett's oesophagus. *Int J Cancer.* 2002;102:551-5.
25. Räsänen JV, Sihvo EI, Ahotupa MO, et al. The expression of 8-hydroxydeoxyguanosine in oesophageal tissues and tumours. *Eur J Surg Oncol.* 2007;33:1164-8.
26. Ciriza-de-los-Ríos C. Barrett's esophagus – a review. *Rev Esp Enferm Dig* 2010;102 (4):257-269.
27. Kumagai H, Mukaisho K, Sugihara H, et al. Thioproline inhibits development of esophageal adenocarcinoma induced by gastroduodenal reflux in rats. *Carcinogenesis.* 2004;25:723-7.
28. Böllschweiler E, Wolfgarten E, Nowroth T, et al. Vitamin intake and risk of subtypes of esophageal cancer in Germany. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128: 575–80.
29. Terry P, Lagergren J, Ye W, Nyrén O, Wolk A. Antioxidants and cancers of the esophagus and gastric cardia. *Int J Cancer.* 2000;87:750-4.
30. Kubo A, Corley DA. Meta-analysis of antioxidant intake and the risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol.* 2007;102:2323-30.
31. Korkmaz A, Reiter RJ, Topal T, et al. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med* 2009; 15: 43-50.
32. Antolín I, Rodríguez C, Sáinz RM, et al. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 1996; 10: 882-890.
33. Martín M, Macías M, Escames G, et al. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red *in vivo*. *J Pineal Res* 2000a;28:242-248.
34. Jung B, Ahmad N. Melatonin in cancer management: Progress and promise. *Cancer Res* 2006; 66: 20: 9789-9793.