

LEVI LORENZO MELO

**INFLUÊNCIA DO REFLUXO DE CONTEÚDOS
GÁSTRICO E GASTRODUODENAL, INDUZIDOS
CIRURGICAMENTE, NA CARCINOGENESE
ESOFÁGICA - MODELO EXPERIMENTAL EM
RATAS *WISTAR***

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Disciplina de
Gastroenterologia, para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Kruel

PORTO ALEGRE
1997

FICHA CATALOGRÁFICA

M528i Melo, Levi Lorenzo

Influência do refluxo de conteúdos gastroduodenal e gástrico, induzidos cirurgicamente, na carcinogênese esofágica - modelo experimental em ratas Wistar / Levi Lorenzo Melo ; orient. Cleber Dario Pinto Kruel. – Porto Alegre : UFRGS, 1997.

87 fls.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia.

1. Refluxo gastroesofágico. 2. Refluxo gastroduodeno-esofágico. 3. Neoplasias experimentais. 4. Esôfago. 5. Carcinoma de células escamosas. 6. Adenocarcinoma. 7. Dietilnitrosamina. I. Kruel, Cleber Dario Pinto.

CDU 616.32

CDD 616.32

Dedico esta dissertação aos meus pais, **José Niceas Melo e Amélia Aguirre Lorenzo**, que sempre me incentivaram nos caminhos da Medicina, e à **Dr.^a Jucelei de Fátima Vizioli**, que durante todo o tempo esteve ao meu lado apoiando o desenvolvimento da mesma.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração de várias pessoas. Para algumas, gostaria de externar meu agradecimento especial.

Ao Prof. Cleber Dario Pinto Krueel pela orientação e pelo estímulo à realização deste trabalho.

À colega Dr.^a Lúcia Maria Kliemann, pela análise histológica, pelo apoio e colaboração.

Ao Dr. Leandro Totti Cavazzola, pelo auxílio na realização do experimento, revisão bibliográfica, e apronto final do trabalho.

Ao colega Dr. Roberto Arenhart Pessini, pela idéia e estímulo inicial.

A Dr.^a Maria Isabel Edelweiss, pelo auxílio na revisão final.

Ao Dr. Rafael Boeno, Dr. Paulo Silber e Dr. Rafael Grossi, pela ajuda na realização do experimento.

À Dr.^a Mara de Souza Motta e Dr.^a Luisa Maria Gomes de M. Braga, médicas veterinárias da FEPPS, pelo apoio na realização do experimento.

Ao Sr. Carlos Alberto de Araújo, funcionário da FEPPS, responsável pelo cuidado com as ratas no biotério.

À Sr.^a Rosália Graebin Guimarães, funcionária do Serviço de Patologia do HCPA, responsável pela preparação da diluição do carcinógeno.

À Sr.^a Elhane Gomes, funcionária do Serviço de Patologia do HCPA, responsável pelo corte e coloração das lâminas para análise histológica.

À Sr.^a Luciana Bertoldi Nucci, estatística do Grupo de Pesquisa e Pós-graduação, pelo auxílio e orientação na análise estatística.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiii
1 - INTRODUÇÃO	01
1.1 - EPIDEMIOLOGIA	01
1.2 - FATORES DE RISCO	02
1.3 - REFLUXOS ÁCIDO E ALCALINO; ESÔFAGO DE BARRETT	04
1.4 - GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR NO CÂNCER ESOFÁGICO	09
1.5 - NITROSAMINAS E CIRURGIA PARA REFLUXO	11
2 - OBJETIVOS	13
3 - MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 - ANIMAIS, AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO E ALIMENTAÇÃO	14
3.2 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	16
3.3 - CIRURGIA	18
3.3.1 - MODELO DE REFLUXO GASTRO-ESOFÁGICO (CARDIOPLASTIA)	18
3.3.2 - MODELO DE REFLUXO GASTRODUODENO- ESOFÁGICO (ESOFAGODUODENOSTOMIA)	18

3.4 - CARCINÓGENO	21
3.5 - SACRIFÍCIO	21
3.6 - NECRÓPSIA	22
3.7 - MACROSCOPIA	23
3.8 - HISTOLOGIA	23
3.9 - ANÁLISE HISTOLÓGICA	26
3.10 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4 - RESULTADOS	29
5 - DISCUSSÃO	46
6 - CONCLUSÕES	51
7 - PERSPECTIVAS	52
ANEXO A	53
ANEXO B	54
ANEXO C	55
ANEXO D	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ABSTRACT	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Hipótese da evolução do adenocarcinoma a partir da metaplasia de Barrett.

Página 07

FIGURA 2: Disposição das gaiolas no Biotério da DPEA da FEPPS

Página 15

FIGURA 3: Diagrama seqüencial evolutivo do experimento, em semanas

Página 17

FIGURA 4: Modelo da cirurgia para refluxo gastro-esofágico (cardioplastia)

Página 19

FIGURA 5: Modelo da cirurgia para refluxo gastroduodeno-esofágico (esofagoduodenostomia)

Página 20

FIGURA 6: Exemplo da disposição dos esôfagos em forma de “rocambolé” para posterior inclusão em parafina

Página 24

FIGURA 7: A (HE - 25 X) e B (HE - 100 X) - Demonstração da forma de inclusão dos esôfagos, tipo “rocambolé”, permitindo a visualização de todo o espécime no mesmo corte histológico, para análise microscópica

Página 25

FIGURA 8: Esôfago com mucosa normal - Estágio 1 - macroscopia - Rata 70 - Grupo 4

Página 31

FIGURA 9: Esôfago com mucosa normal - Estágio 1 - microscopia - Rata 70 - Grupo 4 - A (HE - 25 X) e B (HE - 100 X): presença de epitélio escamoso estratificado, com ausência de infiltrado inflamatório

Página 32

FIGURA 10: Esôfago com papiloma - Estágio 2 - macroscopia - Rata 66 - Grupo 4

Página 33

FIGURA 11: Esôfago com papiloma - Estágio 2 - microscopia - Rata 66 - Grupo 4 - **A (HE - 25 X)** e **B (HE - 100 X)**: lesão epitelial escamosa exofítica, benigna, sem caráter invasivo; destacam-se a hiperplasia epitelial e hiperqueratose

Página 34

FIGURA 12: Esôfago de Barrett - Estágio 3 - macroscopia - Rata 32 - Grupo 2

Página 35

FIGURA 13: Esôfago de Barrett - Estágio 3 - microscopia - Rata 32 - Grupo 2 - **A (HE - 25 X)**: da esquerda para a direita: ulceração epitelial, epitélio glandular tipo intestinal, pequeno segmento de epitélio escamoso e novamente epitélio glandular do tipo intestinal; **B (HE - 100 X)**: ressalta-se o epitélio glandular tipo intestinal com a interposição de epitélio escamoso entre ele

Página 36

FIGURA 14: Esôfago com adenocarcinoma - Estágio 6 - macroscopia - Rata 34 - Grupo 2

Página 37

FIGURA 15: Esôfago com adenocarcinoma - Estágio 6 - microscopia - Rata 34 - Grupo 2 - **A (HE - 25 X)**: neoplasia de padrão glandular e caráter infiltrativo, com focos de supuração; **B (HE - 100 X)**: nota-se pequena área de epitélio escamoso abaixo da qual identifica-se lesão glandular, invasiva

Página 38

FIGURA 16: Esôfago com carcinoma epidermóide - Estágio 6 - macroscopia - Rata 85 - Grupo 5

Página 39

FIGURA 17 : Esôfago com carcinoma epidermóide - Estágio 6 -
microscopia - Rata 85 - Grupo 5 - **A (HE - 25 X)**: pequena área, à esquerda,
de epitélio escamoso; adjacente a ela, extenso segmento desprovido de
epitélio preservado, onde identificam-se numerosas pequenas ilhotas de
epitélio escamoso neoplásico que compromete mucosa e submucosa,
estendendo-se até a camada muscular, porém sem invadi-la; **B (HE - 100 X)**:
nota-se o segmento de epitélio preservado e as formações de epitélio
neoplásico, percebendo-se a formação de queratina em cada uma delas;
ressalta-se o infiltrado inflamatório adjacente à lesão, bem como a hemorragia

Página 40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Descrição das alterações microscópicas do esôfago nos diferentes grupos, por estágios

Página 30

TABELA 2 - Comparação entre os grupos 1 e 2 (diferença significativa)

Página 41

TABELA 3 - Comparação entre os grupos 1 e 3 (diferença não significativa)

Página 41

TABELA 4 - Comparação entre os grupos 1 e 4 (diferença não significativa)

Página 41

TABELA 5 - Comparação entre os grupos 1 e 5 (diferença significativa)

Página 42

TABELA 6 - Comparação entre os grupos 1 e 6 (diferença não significativa)

Página 42

TABELA 7 - Comparação entre os grupos 2 e 3 (diferença significativa)

Página 42

TABELA 8 - Comparação entre os grupos 2 e 4 (diferença significativa)

Página 43

TABELA 9 - Comparação entre os grupos 2 e 5 (diferença não significativa)

Página 43

TABELA 10 - Comparação entre os grupos 2 e 6 (diferença significativa)

Página 43

TABELA 11 - Comparação entre os grupos 3 e 4 (diferença não significativa)

Página 44

TABELA 12 - Comparação entre os grupos 3 e 5 (diferença significativa)
Página 44

TABELA 13 - Comparação entre os grupos 3 e 6 (diferença não significativa)
Página 44

TABELA 14 - Comparação entre os grupos 4 e 5 (diferença significativa)
Página 45

TABELA 15 - Comparação entre os grupos 4 e 6 (diferença não significativa)
Página 45

TABELA 16 - Comparação entre os grupos 5 e 6 (diferença significativa)
Página 45

LISTA DE ABREVIATURAS

CEA:	antígeno cárcino embriônico
DRGE:	doença do refluxo gastro-esofágico
DMAE:	Departamento Municipal de Água e Esgotos
DEN:	diethylnitrosamina
DMNM:	2,6-dimethylnitrosomorpholine
DPEA:	Divisão de Produção e Experimentação Animal
FEPPS:	Fundação Estadual de Proteção e Pesquisa em Saúde
HCPA:	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
H2O:	água
IB:	Instituto de Biociências
MNAN:	N-amyl-n-methylnitrosamine
RGDE:	refluxo gastroduodeno-esofágico
RGE:	refluxo gastro-esofágico
T0:	tempo zero
T8:	tempo 8 semanas
T10:	tempo 10 semanas
T30:	tempo 30 semanas
UFRGS:	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

RESUMO

Estudos em seres humanos e animais demonstram que a exposição do esôfago a conteúdo duodenal e gástrico pode ser importante no desenvolvimento do esôfago de Barrett e suas complicações, incluindo adenocarcinoma e carcinoma epidermóide. A diethylnitrosamina (DEN) é um carcinógeno que estimula o desenvolvimento do carcinoma epidermóide no esôfago de camundongos. Os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito do refluxo de conteúdo gastroduodenal e gástrico na indução de carcinogênese esofágica. Os refluxos de conteúdo gastro-esofágico (RGE) e gastroduodeno-esofágico (RGDE) foram produzidos por cardioplastia e esofagoduodenostomia, com fechamento do cárdia e preservação gástrica, respectivamente. O carcinógeno utilizado foi a DEN diluída na água de beber, 3 dias por semana, por 20 semanas consecutivas. Cem (100) ratas Wistar foram divididas em 6 grupos. Grupo 1 (18 ratas): cardioplastia sem DEN; Grupo 2 (18 ratas): esofagoduodenostomia sem DEN; Grupo 3 (10 ratas): somente água; Grupo 4 (17 ratas): cardioplastia com DEN; Grupo 5 (17 ratas): esofagoduodenostomia com DEN; Grupo 6 (20 ratas): somente DEN. O RGE isolado induziu papilomatose ou ulceração em 22,2% das ratas, e, quando associado a DEN, o fez em 47,1%. O RGDE isolado induziu esofagite acentuada, papilomatose ou ulceração em 61,1% das ratas, esôfago de Barrett em 16,7%, e adenocarcinoma de esôfago em 16,7%; quando associado a DEN, 23,5% das ratas apresentaram esofagite acentuada, papilomatose ou ulceração, enquanto 76,5% evoluíram a carcinoma de esôfago, sendo 70,6% carcinoma epidermóide e 5,9% adenocarcinoma. Ratas tratadas somente com água não apresentaram alterações histológicas da mucosa esofágica. Ratas tratadas somente com DEN desenvolveram papilomas em 50,0% dos casos e permaneceram histologicamente inalteradas em 50,0%. Não houve desenvolvimento de displasia de baixo ou alto grau em nenhum grupo. Como conclusões, observamos que: 1) o RGDE é significativamente mais deletério para a mucosa esofágica do que o RGE; 2) neste estudo, o RGE não demonstrou potencial carcinogênico em relação ao esôfago; 3) o RGDE isolado é um carcinógeno esofágico, produzindo esôfago de Barrett e adenocarcinoma do esôfago; 4) a oncogênese esofágica causada pelo RGDE é potencializado pela DEN, induzindo carcinoma epidermóide de esôfago; 5) neste estudo, a DEN isolada não gerou tumores no esôfago de ratas.

PALAVRAS CHAVE: Refluxo gastroduodeno-esofágico
Refluxo gastro-esofágico
Carcinogênese esofágica experimental
Diethylnitrosamina
Carcinoma epidermóide de esôfago
Adenocarcinoma de esôfago

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - EPIDEMIOLOGIA

Os tumores malignos do esôfago podem ter origem epitelial (carcinomas), mesenquimal (sarcomas), ou serem mistos (STERNBERG et al., 1994; DAMJANOV & LINDER, 1996).

O carcinoma epidermóide de esôfago é o tipo histológico predominante, representando 95% das neoplasias que acometem este órgão (BARROS, 1992; CALETTI, 1993; STERNBERG et al., 1994; SCHIRMER, 1995). O adenocarcinoma originado em áreas com epitélio de Barrett predomina entre as outras neoplasias do esôfago (MALAFAIA, 1990; STERNBERG et al., 1994; SCHIRMER, 1995).

Diferenças geográficas na mortalidade por câncer de esôfago têm sido encontradas não só entre diferentes países, como também entre regiões de um mesmo país, por vezes com importantes variações em áreas circunvizinhas (GHADIRIAN, THOUÉZ, SIMARD, 1988; PROLLA, DIETZ, DA COSTA, 1993; MUÑOZ & CASTELLSAGUÈ, 1994). Há uma grande variabilidade na incidência do câncer de esôfago no mundo, com áreas que atingem altos índices, tais como 150/100.000 hab./ano em Henan, na China (LAM, 1986), sendo 70,93/100.000 hab./ano para os homens e 36,65/100.000 hab./ano para as mulheres, quando corrigido para o índice da população mundial “standard” (ZENG & ZENG, 1996) e 73/100.000 hab./ano em Transkei, na África do Sul (WARWICK & HARINGTON, 1973; ROSE & McGLASHAN, 1975; ROSE & FELLINGHAN, 1981), e áreas de baixos índices, tais como 2,6/100.000 hab./ano nos Estados Unidos (YANG & DAVIS, 1988) e 3/100.000 hab./ano no Canadá (AYIOMAMITIS, 1988).

No Brasil, esta variabilidade também é encontrada. O estado do Rio Grande do Sul caracteriza-se como área endêmica para câncer de esôfago, atingindo índices de 27/100.000 hab./ano (PROLLA, 1992). Dentro do próprio território do estado do Rio Grande do Sul, há índices que variam de 16,49/100.000 hab./ano (microrregião da Campanha) a 4,74/100.000 hab./ano (microrregião de Soledade) (PROLLA et al., 1993). A taxa de mortalidade por câncer de esôfago neste estado brasileiro o colocam no quinto lugar no mundo em relação a este índice, superado por Henan (China), Gonbad (Irã), Transkei (África do Sul) e Bretagne (França) (BARROS, 1992).

1.2 - FATORES DE RISCO

De acordo com BARROS (1992), os fatores de risco para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide do esôfago enquadram-se em três categorias:

- primeira: a exposição prolongada a agentes químicos e/ou físicos, principalmente os ambientais;
- segunda: as deficiências nutricionais de vitaminas e micronutrientes;
- terceira: certas doenças raras.

Sabe-se que o álcool e o tabaco têm um papel importante na patogênese do carcinoma do esôfago. Isoladamente, o aumento do número de cigarros fumados, ou um consumo maior de álcool estão positivamente correlacionados com um aumento no risco de desenvolvimento da neoplasia de esôfago. Quando houve associação entre estes fatores, ocorreu um efeito sinérgico, aumentando em 6 vezes o risco relativo da população exposta a desenvolver a doença quando comparado à população em geral (VICTORA et al., 1987; YU et al., 1988; NOTANI, 1988; LA-VECCHIA & NEGRI, 1989, BARROS, 1992). Em subgrupos populacionais não expostos ao consumo de álcool e/ou tabaco, os coeficientes de mortalidade para neoplasia do esôfago foram inferiores àqueles da população em geral (BARROS, 1992). O álcool é considerado como um potencializador sinérgico na indução de tumores epiteliais, produzindo lesões inflamatórias e estimulando a proliferação celular epitelial. Já o tabaco tem efeito carcinogênico dose dependente (BARROS, 1992).

VICTORA et al. (1987), em estudo caso-controle em população do Rio Grande do Sul, identificaram o hábito da ingestão do mate ou chimarrão, em altas temperaturas (acima de 70°centígrados), como tendo um risco relativo isolado 2 vezes superior na relação entre bebedores e não-bebedores para desenvolvimento de neoplasia esofágica. BARROS (1992) cita o chimarrão como fator contribuinte à etiologia do carcinoma epidermóide do esôfago, não como substância carcinogênica, mas sim como substância que, se ingerida continuamente em altas temperaturas, causaria lesões térmicas da mucosa esofágica, facilitando a ação de substâncias carcinogênicas nesta mucosa. YIORIS, IVANKOVIC, LEHNERT (1984) induziram experimentalmente neoplasia esofágica em ratos *Wistar* pela ingestão de

líquidos quentes, a qual facilitou a ação de uma substância carcinogênica, a metil-nitro-nitrosoguanidina. KRUEL et al. (1996a) observaram um significativo aumento no índice de tumores em um grupo de camundongos que recebeu água quente (temperatura entre 60°C e 70°C) associado a diethylnitrosamina (DEN) quando comparado a um grupo que recebeu água em temperatura ambiente e DEN.

BARROS (1992) definiu como grupo de “maior risco” para o desenvolvimento de lesões precursoras para neoplasias de esôfago aqueles indivíduos com consumo maior do que 80 gramas de etanol/dia por mais de 10 anos e consumo maior do que 20 cigarros ou assemelhados/dia por mais de 10 anos e consumo maior do que 500 ml/dia de chimarrão por mais de 10 anos.

O estado nutricional e riscos associados em populações sob alto risco para o desenvolvimento para câncer de esôfago têm sido estudados. Há uma associação entre as carências de vitaminas e/ou micronutrientes e o aparecimento de doenças crônicas degenerativas, tais como câncer e doenças cardiovasculares. Assim, deficiências de riboflavina, vitamina A, vitamina E e ácido fólico (JASKIEWICZ et al., 1988), riboflavina, retinol e zinco (WAHRENDORF et al., 1989), riboflavina, caroteno e retinol (ZARIDZE et al., 1986), zinco e outros microelementos (BARCH, 1989), zinco (MELLOW et al., 1983), foram implicadas como fatores de risco para o desenvolvimento da neoplasia de esôfago em populações expostas. Já dietas ricas em frutas frescas e vegetais foram identificadas como fatores de proteção para carcinogênese esofágica (VICTORA et al., 1987). Vitaminas C e E desenvolvem um mecanismo de ação que inibe carcinogênese química, como por exemplo, a formação de nitrosaminas carcinogênicas (CHEN, BOISSONNEAULT, GLAUERT, 1988; BARCH, 1989). Suplementação de vitaminas e minerais na dieta, especialmente beta-carotenos, vitamina E e selênio, determinou um papel de proteção no risco para desenvolver câncer (MOBARHAN, 1994). Em estudo experimental, o uso de vitamina E desempenhou uma função antioxidante que retardou a incidência de câncer esofágico em animais imunocomprometidos e imunocompetentes (ODELEYE et al., 1992).

Vários tipos de papilomavírus têm sido detectados em espécimes de câncer esofágico, mas evidências epidemiológicas e experimentais do seu papel na carcinogênese esofágica não estão bem claras (IARC, 1995).

Doenças raras como a síndrome hereditária *Tylosis palmaris et plantaris* (hiperceratose das palmas e plantas) e a presença de membranas mucosas no terço superior do esôfago (Síndrome de Plummer-Winson ou Patterson-Kelly) são descritas como patologias associadas com o carcinoma epidermóide de esôfago (CORREA, 1982; ASHWORTH et al., 1991; RISK et al., 1994).

1.3 - REFLUXOS ÁCIDO E ALCALINO; ESÔFAGO DE BARRETT

Normalmente o esôfago não é exposto ao refluxo de conteúdo gastroduodenal, exceto ocasional e rapidamente, devido à competência do esfíncter esofágico inferior e a habilidade do esôfago em carregar conteúdo refluído de volta ao estômago. Isto pode ser confirmado pela monitorização por 24 horas do esôfago inferior, o qual demonstra que o pH esofágico normalmente permanece entre 5 e 7, bem acima do pH gástrico. Entretanto, alguns pacientes apresentam incompetência do esfíncter esofágico inferior ou alteração no clareamento esofágico e, nestes pacientes, o esôfago é exposto ao conteúdo gastroduodenal mais frequentemente, podendo causar alterações na mucosa (HARMON, JOHNSON, MAYDONOVITCH, 1981).

O esôfago de Barrett é a condição na qual o epitélio estratificado escamoso da mucosa esofágica é substituído, em tamanhos variáveis no terço distal, por epitélio colunar (BARRET, 1950; GILLEN et al., 1988; CONIO, 1993; SPECHLER, 1994a). Histologicamente podem ser distinguidos três tipos de epitélio metaplásico no esôfago: um tipo cárdico ou juncional, um tipo fúndico e um tipo colunar especializado (intestinal) (SPECHLER & GOYAL, 1986; HAMEETEMAN et al., 1989; SPECHLER et al., 1994b), sendo somente este último (tipo intestinal) associado a alterações pré-neoplásicas (esôfago de Barrett) (SPECHLER, 1996). A prevalência do esôfago de Barrett na população em geral é desconhecida. Estudos epidemiológicos em necrópsias indicaram uma prevalência 16 vezes maior do que estudos de casos diagnosticados de esôfago de Barrett na comunidade em geral (376/100.000 X 22,6/100.000). Isto sugere que há muitas pessoas com esôfago de Barrett não diagnosticado na população em geral (CAMERON et al., 1990; CAMERON, 1994).

O esôfago de Barrett é uma doença adquirida (BREMNER, LYNCH, ELLIS Jr., 1970) estando geralmente associado com doença do refluxo

gastroesofágico (DRGE) crônica (PETERS & KLEIBEUKER, 1993), devido ou ao refluxo de conteúdo ácido ou de conteúdo duodenal, ou de ambos (PERA et al., 1993b). Apesar do esôfago de Barrett poder afetar crianças, a metaplasia intestinal especializada não tem sido relatada em crianças com menos de 5 anos de idade. A ausência do epitélio intestinal no esôfago de recém-nascidos e crianças pequenas apóia a condição metaplásica adquirida (SPECHLER, 1994a). O esôfago de Barrett pode ser complicado por estenose, ulceração, hemorragia, perfuração ou malignização (DeMEESTER et al., 1990). Os pacientes com DRGE crônica têm um risco 100 vezes maior que a população em geral para desenvolver adenocarcinoma (THOMAS & SOBIN, 1995). As razões pelas quais somente alguns pacientes com DRGE desenvolveram esôfago de Barrett e somente alguns destes desenvolveram complicações não são conhecidas (ATTWOOD et al., 1989; DeMEESTER et al., 1990).

O refluxo crônico de suco gástrico está relacionado como um importante agente associado a esôfago de Barrett (LI et al., 1992), aumentando o risco de desenvolvimento do adenocarcinoma de esôfago e cárdia (CHOW et al., 1995). Estudos implicaram o refluxo duodenogástrico no desenvolvimento de esofagite (SCHMID, DeTARNOWSKY, LAYDEN, 1981; GILLEN et al., 1988), esôfago de Barrett (IFTIKHAR et al., 1993) e outras complicações (ATTWOOD et al., 1993; MIWA, HATTORI, MIYAZAKI, 1995) devido ao efeito do pH alcalino no esôfago. Já LI et al. (1992) afirmaram que bile e secreções pancreáticas não estão envolvidas na patogênese do esôfago de Barrett.

Defeito mecânico no esfíncter esofágico inferior e refluxo de suco gástrico ácido associado com conteúdo duodenal demonstraram ser importantes determinantes para o desenvolvimento de lesões na mucosa esofágica de pacientes com DRGE (STEIN et al., 1992; VAEZI & RICHTER, 1995a; VAEZI, SINGH, RICHTER, 1995b), inclusive metaplasia colunar (HOEFT et al., 1996). A lesão de mucosa em pacientes com DRGE está relacionada com um pH do suco gástrico menor que 2 ou maior que 7 (BREMNER et al., 1992). O refluxo combinado de suco gástrico e duodenal causou lesões mais severas na mucosa esofágica do que o suco gástrico isolado (KAUER et al., 1995). Pacientes com esôfago de Barrett complicado mostraram um aumento de exposição de suco ácido ($\text{pH} < 4$) e alcalino ($\text{pH} > 7$) comparativamente aos pacientes com esofagite e voluntários normais (ATTWOOD et al., 1989; ATTWOOD et al., 1993).

Estudos demonstraram uma relação entre esôfago de Barrett e o desenvolvimento de adenocarcinoma de esôfago sobre a metaplasia colunar (PERA et al., 1993a; CLARK et al., 1994), devido à progressão histopatológica da mucosa de metaplasia tipo intestinal para displasia, carcinoma *in situ*, e adenocarcinoma invasivo (**FIGURA 1**) (PERA et al., 1993c; PETERS & KLEIBEUKER, 1993), num período de aproximadamente 20 anos (ARMSTRONG, BLUM, SAVARY, 1992), com incidência de 125 pacientes-ano de seguimento ou 800/100.000 pacientes (SPECHLER, 1992; SPECHLER, 1994b). A displasia severa na mucosa do esôfago de Barrett foi descrito como um marcador morfológico e precursor do desenvolvimento do adenocarcinoma (LEE, 1985; HAMEETEMAN et al., 1989; ALTORKI et al., 1991; MIROS, KERLIN, WALKER, 1991; CLARK et al., 1994). A eliminação do refluxo de conteúdo duodenal bilioso em pacientes com diagnóstico de esôfago de Barrett pareceu inibir a progressão de metaplasia para adenocarcinoma (PERA et al., 1993c). Em ressecções esofágicas “profiláticas” realizadas em pacientes com um diagnóstico pré-operatório de displasia de alto grau identificada em espécimes de biópsias endoscópicas, o exame microscópico dos espécimes ressecados revelou uma percentagem relativa maior de câncer invasivo (38-50%) (ALTORKI et al., 1991; PERA et al., 1992; RICE et al., 1993). Endoscopias digestivas repetidas devem ser realizadas naqueles pacientes cujas repetidas biópsias endoscópicas demonstram persistência da displasia de baixo-grau (SPECHLER & GOYAL, 1986).

A freqüência do adenocarcinoma está aumentando nos países do norte, principalmente nos Estados Unidos (BLOT, DEVESA, FRAUMENI Jr., 1993). Adultos freqüentemente apresentam segmentos não reconhecidos de epitélio colunar especializado (metaplasia intestinal) na junção gastro-esofágica; isto pode ser a razão fundamental do crescimento da freqüência do câncer da junção gastro-esofágica nos Estados Unidos e na Europa (SPECHLER et al., 1994b).

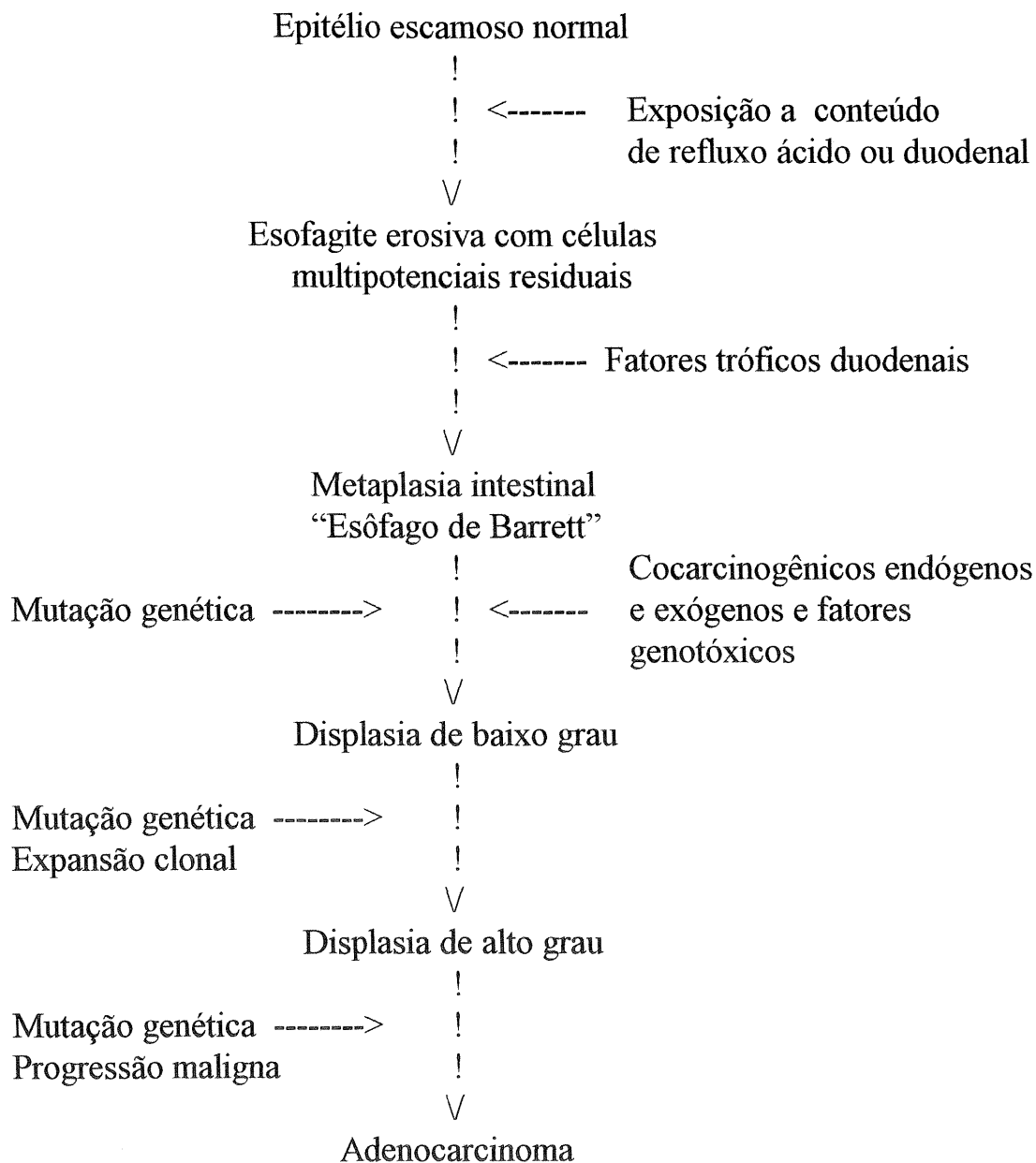


FIGURA 1 - Hipótese da evolução do adenocarcinoma a partir da metaplasia de Barrett (PERA et al., 1993c).

O refluxo alcalino tem sido implicado como potencial gerador de alterações na mucosa esofágica em estudos em animais e humanos, devido à destruição tecidual resultante da exposição do esôfago a enzimas duodenais. A detecção de sais biliares no esôfago de muitos pacientes com esofagite demonstrou a presença de refluxo duodenogástrico e gastroesofágico (JOHNSSON et al., 1988; GOTLEY, MORGAN, COOPER, 1988; KAUER et al., 1995). Pacientes com refluxo alcalino desenvolveram complicações sérias do refluxo mesmo na ausência de sintomas típicos de pirose (PELLEGRINI et al., 1978). Quando houve sintomas de pirose, o refluxo de bile determinou mais sintomas do que refluxo ácido isolado (SINGH, BRADLEY, RICHTER, 1993).

Na presença de ácido gástrico, pepsina e sais biliares conjugados foram descritos como as substâncias responsáveis pela maior injúria na patogênese da esofagite por refluxo ácido e alcalino e, em contraste, quando o ácido estava ausente, tripsina e especialmente sais biliares desconjugados foram os fatores mais patogênicos (KIVILAAKSO, FROMM, SILEN, 1980; SALO, LEHTO, KIVILAAKSO, 1983). Em um estudo em coelhos, a tripsina demonstrou ser o agente mais nocivo na esofagite por refluxo alcalino em termos de causar erosão da mucosa, inflamação e hemorragia (LILLEMOE, JOHNSON, HARMON, 1983). Em ratos submetidos a refluxo pancreático, houve uma incidência de 79% de esofagite, e somente 28% quando ocorreu o refluxo isolado de bile. Isto sugere que a bile, sozinha, não causou esofagite; porém, na presença de suco pancreático, atuou como potencializador deste (LAMBERT, 1962). Contrariamente, GOTLEY, APPLETON, COOPER, (1992), encontraram que a medida do tempo de exposição alcalina do esôfago não foi útil na avaliação clínica do refluxo duodeno-esofágico de bile e que ácidos biliares e tripsina não foram importantes na patogênese da esofagite de refluxo.

O refluxo alcalino de conteúdo duodenal foi implicado com o desenvolvimento de carcinoma epidermóide de esôfago (SETO et al. (1991), adenocarcinoma do esôfago (ATTWOOD et al., 1992) ou ambos (PERA et al., 1989; PERA et al., 1993b; MIWA et al., 1995).

1.4 - GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR NO CÂNCER ESOFÁGICO

Em ambos os tipos de câncer esofágico (carcinoma epidermóide ou adenocarcinoma), o papel da agregação genética/familiar, bem como dos mecanismos subjacentes à interação entre vários fatores de risco, permanece mal definido. O conhecimento das bases moleculares e genéticas do desenvolvimento do câncer progrediu consideravelmente durante a última década. A integração do conhecimento com epidemiologia, patologia e clínica pode produzir grandes benefícios em estudos da etiopatogênese, e aperfeiçoar uma adequada seleção e terapia do câncer esofágico (MONTESANO, HOLLSTEIN, HAINAUT, 1996).

Marcadores tumorais têm sido estudados para identificação de malignidade esofágica ou para monitorar terapia. O CA 19-9 estudado isoladamente mostrou uma sensibilidade de 34% e especificidade de 84% (McKNIGHT, MANNELL, SHPERLING, 1989). Em outro estudo, o antígeno cárcino embriônico (CEA) apresentou-se alterado em 39% dos pacientes com carcinoma epidermóide do esôfago, o CA 50 aumentou em 41%, e o CA 19-9 elevou-se em 13% dos pacientes; quando analisados juntos, elevaram os níveis de sensibilidade para 59%. O aumento dos níveis de CEA foram significativamente maiores em tumores esofágicos intratorácicos quando comparados aos tumores esofágicos cervicais. Os pacientes com níveis de CEA mais elevado apresentaram uma sobrevida de até 6 meses, enquanto aqueles com CEA mais baixo sobreviveram entre 6 e 18 meses. Não foi encontrada uma correlação entre a elevação dos níveis dos marcadores tumorais e o estágio ou diferenciação tumoral (MUNCK-WIKLAND et al., 1988).

Marcadores epiteliais, tais como atividade aumentada na mucosa da ornitina decarboxilase, produção de sulfomucina, aneuploidia nuclear do DNA, e, recentemente, análise molecular, têm sido propostos para identificar aqueles pacientes com risco aumentado para malignização da metaplasia intestinal do Barrett para o adenocarcinoma (PERA et al., 1993c).

O *c-erbB-2* é um suposto gene proto-oncológico que normalmente dirige a síntese de um receptor de fator de crescimento localizado na membrana celular. A manifestação exagerada de *c-erbB-2* tem sido associada à transformação maligna de certas linhas celulares humanas e tem sido encontrada em adenocarcinomas do esôfago. Entretanto, a importância da

manifestação exagerada do *c-erbB-2* na carcinogênese esofágica não está clara. Em um estudo, usando técnicas imunoistoquímicas, encontrou-se uma manifestação exagerada de *c-erbB-2* nas membranas celulares de 8 de 31 adenocarcinomas (26%) que surgiram em esôfagos de Barrett. Em contraste, não foi observada nenhuma manifestação exagerada de membrana de *c-erbB-2* no epitélio colunar esofágico não maligno, associado a 20 destes tumores, mesmo que este epitélio exibisse mudanças displásicas. Estes achados sugerem que a manifestação exagerada de *c-erbB-2* ocorre mais tarde no desenvolvimento de alguns adenocarcinomas esofágicos. Portanto, não é provável que a imunoreatividade do *c-erbB-2* seja um precoce e útil biomarcador para o potencial maligno em pacientes com esôfago de Barrett (SPECHLER, 1996).

Células heterozigotas normais têm duas cópias de cada gene no genoma - uma cópia de gene (alela) é herdada da mãe e a outra do pai. A inibição da proliferação celular que é mediada por genes supressores do tumor, geralmente requer que apenas uma das duas cópias de gene supressor de tumor permaneça intacta. A perda da função supressora do tumor ocorre se ambas as alelas são deletadas ou se uma é deletada e o gene remanescente torna-se disfuncional devido a uma mutação. Em células malignas, portanto, a descoberta freqüente de uma deleção alélica (a tão chamada perda da heterozigocidade) sugere que a alela perdida pode ter sido um gene supressor de tumor. Revisões sobre biologia celular e molecular do câncer esofágico têm sido publicadas (ROSEN, 1994; ROTH, 1994; STEMMERMANN et al., 1994). O mais importante dos genes supressores de tumor é o gene *p53* localizado no braço curto do cromossomo 17p. Mutações no gene *p53* estão entre as anormalidades genéticas mais comumente documentadas em câncer em humanos (HOLLSTEIN et al., 1996), funcionando como um “promotor de tumores” através de mecanismos ainda desconhecidos (MONTESANO et al., 1996). O ponto de controle da fase G1 do ciclo celular parece particularmente dependente do gene supressor de tumores *p53* (GALMICHE & FLÉJOU, 1996). Estudos têm analisado a ocorrência de mutações do *p53* no câncer esofágico. Entre 240 casos de carcinoma epidermóide de esôfago analisados na literatura, em 110 (45,8%) foram encontrados mutações as quais foram confirmadas e identificadas pela seqüência do DNA. A prevalência de mutações do *p53* é maior nos adenocarcinomas, com 46 casos de mutações do *p53* identificados em 64 pacientes estudados (71,8%) (MONTESANO et al., 1996). No carcinoma epidermóide, a freqüência de mutações do *p53* varia de acordo com a região geográfica, devido a diferentes fatores etiológicos, sendo maior em áreas de maior risco como a Normandia (França) e Uruguai

(HOLLSTEIN et al., 1991). As mutações do *p53* são distribuídas em: transições (45%), transversões (34%), e troca de estrutura (21%) (AUDRÉZET et al., 1993). A detecção de mutações do *p53* em ao menos alguma lesão pré-neoplásica indica que a desregulação do *p53* é provavelmente um evento precoce na carcinogênese esofágica (MONTESANO et al., 1996). O gene supressor tumoral *p53* desempenha um papel importante na progressão neoplásica da mucosa de Barrett (FLÉJOU et al., 1996), e a perda da função do gene supressor tumoral *p53* é considerado um evento crítico na seqüência Barrett - displasia - carcinoma (ROSEN, 1994; POLKOWSKI et al., 1996). Em metaplasia de Barrett tipo intestinal, as mutações do *p53* ocorrem freqüentemente (CAMPOMENOSI et al., 1996). A mutação do *p53* parece desempenhar um papel de acumulação de outras mutações no câncer de esôfago, na resistência relativa deste tumor à quimioterapia citotóxica, e no rápido desenvolvimento de resistência às drogas (ROSEN, 1994).

Diferentemente, perda da heterozigocidade por erro de replicação no cromossomo *3p* é um evento precoce envolvido no desenvolvimento do carcinoma epidermóide do esôfago, podendo ser útil como indicador prognóstico deste tumor (OGASAWARA et al., 1996).

1.5 - NITROSAMINAS E CIRURGIA PARA REFLUXO

O uso de nitrosaminas como promotores ou copromotores de carcinogênese esofágica tem sido relatado em vários estudos. Cerca de 130 diferentes nitrosaminas foram testadas na carcinogênese em ratos, com 66 (51%) destas produzindo tumores no esôfago de ratos, comparados com 44% no fígado e 38% na mucosa nasal (LIJINSKY, 1992).

A dietilnitrosamina (DEN) induziu 18% de carcinoma epidermóide de esôfago em camundongos tratados por 22 semanas com a droga diluída na água de beber (CLAPP & CRAIG, 1967). Em outro estudo, em 6 meses de tratamento com DEN diluído em água de beber, houve indução de 202 tumores em 20 camundongos da cepa C57B1 (RUBIO, 1988). KRUEL (1992) referiu desenvolvimento de carcinogênese esofágica em camundongos *mus musculus* da cepa CF1, de forma abrupta, em torno de 150 dias, após administração oral de DEN.

AZE et al. (1993) demonstraram, em ratos, que a administração de etanol tem um efeito de acréscimo no desenvolvimento de tumores esofágicos induzidos por DEN, quando administrados durante a fase inicial da carcinogênese.

Injeções subcutâneas de N-amil-n-metilnitrosamina (MNAN) por 8 semanas em ratos submetidos a cirurgia para produção de refluxo de conteúdo duodenal demonstraram o desenvolvimento de carcinoma epidermóide de esôfago (SETO et al., 1991). Por via intraperitoneal, a MNAN desenvolveu carcinoma epidermóide de esôfago em ratos em 40 a 65% por períodos de 6 a 12 semanas (BULAY & MIRVISH, 1979).

Administração subcutânea de 2,6-dimetilnitrosomorfoline (DMNM) por 10 semanas em ratos submetidos a refluxo de secreção pancreática e pancreato-biliar desenvolveu neoplasia de esôfago (metade adenocarcinoma e metade carcinoma epidermóide) em 13 e 33% respectivamente (PERA et al., 1993b). Ratos submetidos a esofagojejunostomia desenvolveram adenocarcinoma de esôfago quando associados a injeção subcutânea de DMNM (PERA et al., 1989).

Neste estudo, optou-se por utilizar a dietilnitrosamina (DEN). Trata-se de uma substância química do grupo das nitrosaminas, de peso molecular 102,1, constituída de um radical nitroso ligado a quatro átomos de carbono e dez de hidrogênio (C₄ H₁₀ N₂ O). É um carcinógeno completo, produzindo indução e promoção tumoral em várias espécies animais, com preferência pelo sistema respiratório, sistema digestivo alto, fígado e rins. Sua ativação ocorre por oxigenação de um carbono alfa pela alfa hidroxilação, através de um sistema enzimático do fígado, não totalmente esclarecido. Administrada na água de beber, na concentração de 0,04 ml/1.000 ml, durante três dias, tornou-se a dose preconizada em vários modelos experimentais. Tem ela a finalidade de diminuir a mortalidade pela ação hepatotóxica da DEN (KRUEL, 1992).

2 - OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- 1) descrever as alterações da mucosa esofágica em ratas *Wistar* submetidas ou não a ingestão de dietilnitrosamina;
- 2) descrever as alterações da mucosa esofágica em ratas *Wistar* com refluxo de conteúdo gástrico e gastroduodenal para o esôfago, submetidas ou não a ingestão de dietilnitrosamina;
- 3) analisar a prevalência das lesões malignas encontradas no esôfago de ratas *Wistar* com refluxo gastro-esofágico e submetidas ou não a ingestão de dietilnitrosamina;
- 4) analisar a prevalência das lesões malignas encontradas no esôfago de ratas *Wistar* com refluxo gastroduodenal para o esôfago e submetidas ou não a ingestão de dietilnitrosamina.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - ANIMAIS, AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO E ALIMENTAÇÃO

A amostra foi constituída inicialmente por 110 ratas da espécie *Rattus norvegicus*, da cepa *Wistar*, fornecidas pelo Biotério do Instituto de Biociências (IB) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Com 4 semanas de vida eram transferidas ao Biotério da Divisão de Produção e Experimentação Animal (DPEA) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) para adaptação do ambiente e alimentação por mais 4 semanas. Foram divididas em 22 gaiolas plásticas brancas de 414 X 344 X 168 mm, cada gaiola contendo 5 ratas, divididas em 6 grupos conforme descrito mais adiante.

Todos os animais foram mantidos no biotério convencional, sob fluxo contínuo de ar. Foram alimentados desde o nascimento até 21 dias de vida com aleitamento materno. Após este período, com água e ração *ad libitum* para roedores PURINA® (ANEXO A).

A ração era trocada 2 vezes por semana e foi utilizada até o final do experimento. A água de beber provinha da rede de abastecimento de Porto Alegre (DMAE), estando sempre à disposição dos animais e era trocada 3 vezes por semana (até a 10ª semana de vida).

Cada gaiola plástica era mantida tampada por grade metálica e o fundo forrado com serragem esterilizada previamente em autoclave. As gaiolas eram higienizadas três vezes por semana. As ratas permaneceram sempre na mesma gaiola até o final do experimento (FIGURA 2).



FIGURA 2: Disposição das gaiolas no Biotério da DPEA da FEPPS

3.2 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento consistiu na indução de esofagocarcinogênese, utilizando-se uma combinação dos modelos de KRUEL (1992) e ATTWOOD et al. (1992).

As 110 ratas foram distribuídas em 6 grupos assim constituídos:

- Grupo 1 (20 ratas): submetidas a cirurgia (cardioplastia), tomaram somente água durante todo o experimento;
- Grupo 2 (20 ratas): submetidas a cirurgia (esofagoduodenostomia), tomaram somente água durante todo o experimento;
- Grupo 3 (10 ratas): sem cirurgia, tomaram somente água durante todo o experimento;
- Grupo 4 (20 ratas): submetidas a cirurgia (cardioplastia), tomaram DEN diluída em água de beber;
- Grupo 5 (20 ratas): submetidas a cirurgia (esofagoduodenostomia), tomaram DEN diluída em água de beber;
- Grupo 6 (20 ratas): sem cirurgia, tomaram DEN diluída em água de beber.

O diagrama seqüencial evolutivo do experimento está demonstrado na **FIGURA 3**.

O experimento em si iniciava quando as ratas atingiam a 8ª semana de vida (data da cirurgia - T8) e estendia-se até a 30ª semana de vida (data do sacrifício - T30).

3.3 - CIRURGIA

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados nos grupos 1, 2, 4 e 5, quando as ratas atingiam a 8ª semana de vida, com peso médio de 250 gramas, em modelo semelhante ao de ATTWOOD et al. (1992).

Após um jejum de 8 a 12 horas, as ratas eram anestesiadas com uma injeção intraperitoneal de tiopental na dose de 25 mg/kg. Após tricotomia do abdômen, as ratas eram colocadas em decúbito dorsal sobre um campo estéril e uma assepsia preliminar era realizada com iodoform aquoso. Realizava-se, então, uma incisão na linha média abdominal, com retração do fígado e exposição do estômago, duodeno e porção intra-abdominal do esôfago.

3.3.1 - MODELO DE REFLUXO GASTRO-ESOFÁGICO (CARDIOPLASTIA) (grupos 1 e 4)

O esôfago terminal era reparado e realizava-se uma incisão longitudinal em todas as camadas da parede anterior da junção esôfago-gástrica, com cerca de 6 mm de extensão, a qual era fechada transversalmente com sutura contínua, em plano único, com fio prolene 7-0 (**ANEXO B**), criando-se, então, uma esofagogastroplastia semelhante à piloroplastia a Heinecke-Mikulicz (**FIGURA 4**).

3.3.2 - MODELO DE REFLUXO GASTRODUODENO-ESOFÁGICO (ESOFAGODUODENOSTOMIA) (grupos 2 e 5):

Após liberação do duodeno, realizava-se uma duodenotomia longitudinal com 1 cm de extensão a 1 cm do piloro; a seguir, fechava-se a junção gastro-esofágica com sutura com fio prolene 6-0 (**ANEXO B**); após, abria-se o esôfago terminal longitudinalmente 1 cm acima da ligadura anterior e, então, realizava-se uma anastomose esôfago-duodenal látero-lateral, em plano único, com fio prolene 7-0, contínuo (**FIGURA 5**).

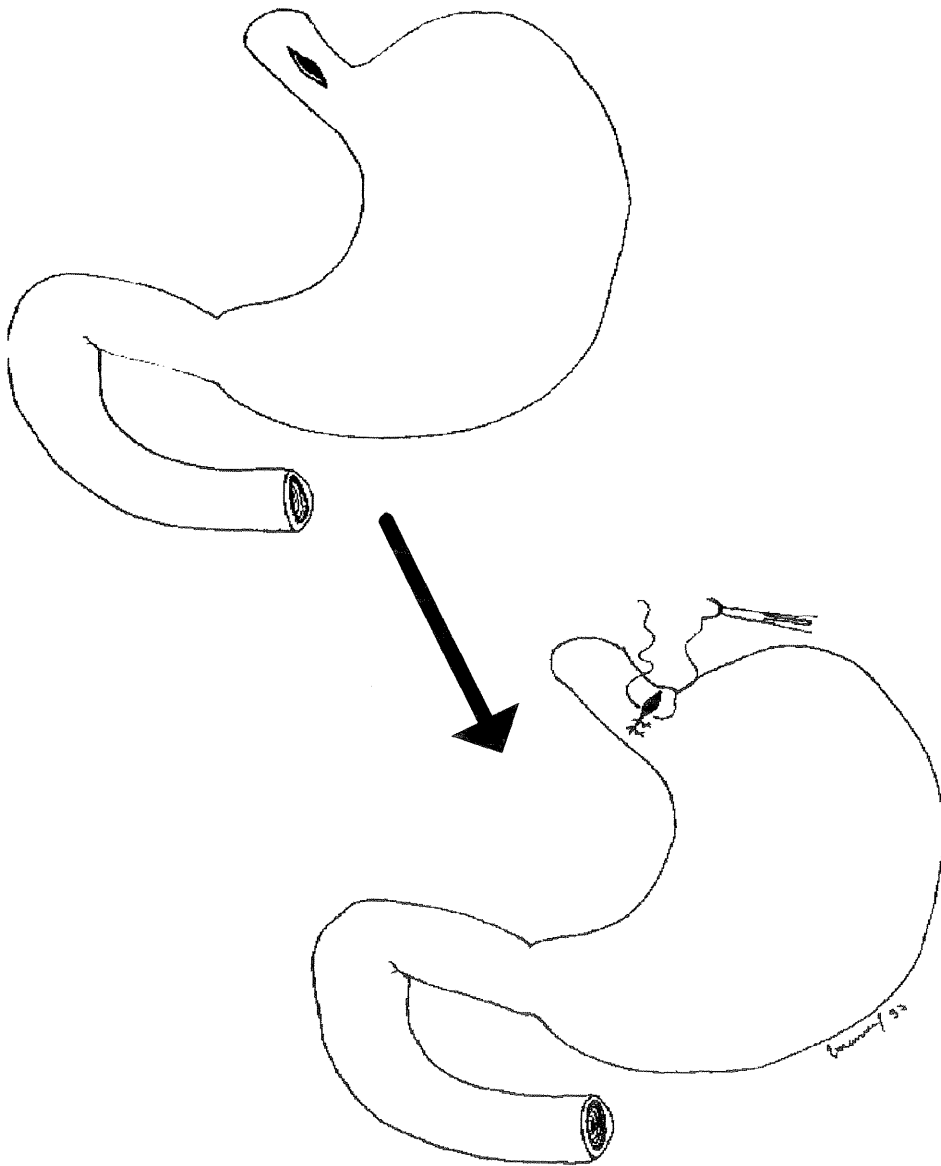


FIGURA 4: Modelo da cirurgia para refluxo gastro-esofágico (cardioplastia)

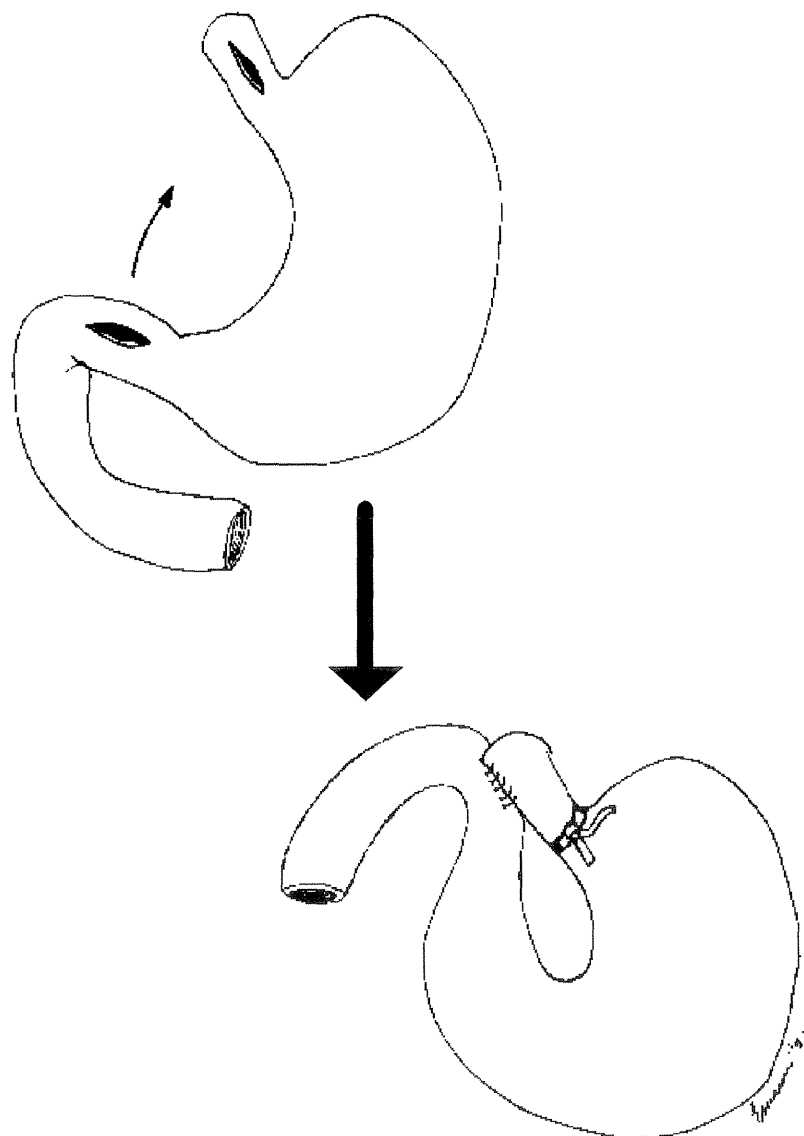


FIGURA 5: Modelo da cirurgia para refluxo gastroduodeno-esofágico (esofagoduodenostomia)

Após, realizava-se revisão da hemostasia e fechava-se a cavidade abdominal com suturas contínuas do peritônio com prolene 6-0 e da pele com mononylon 5-0 (ANEXO B).

As ratas eram mantidas em jejum até 6 horas de pós-operatório, água entre 6 e 24 horas e, após, dieta normal.

3.4 - CARCINÓGENO

A DEN diluída na água de beber foi preparada no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A diluição era realizada sempre às segundas-feiras, na dose de 0,04 ml de DEN para cada litro de água (0,04 ml/l). Os frascos eram colocados à disposição dos animais, como única opção de ingestão hídrica, nas terças-feiras, às 8 horas, e retirados e desprezados nas sextas-feiras, às 8 horas, sendo substituídos por frascos com água sem DEN durante 4 dias (sextas, sábados, domingos e segundas-feiras), havendo 2 trocas de frascos de água neste período. Essa alternância foi mantida durante todo o experimento (20 semanas).

A administração de carcinógeno químico iniciou-se na 10^a semana de vida das ratas (2^a semana de pós-operatório).

Os animais dos grupos 1, 2 e 3 receberam apenas água para beber (fonte DMAE - Porto Alegre) durante todo o experimento, trocada 3 vezes por semana, até a 30^a semana de vida.

Os animais dos grupos 4, 5 e 6 receberam DEN (N-nitrosodiethylamine - C₄ H₁₀ N₂ O) (ANEXO C) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) diluída na água de beber, durante 20 semanas (entre a 10^a e a 30^a semana de vida), 3 dias por semana, consecutivamente.

3.5 - SACRIFÍCIO

Com 30 semanas de vida as ratas foram sacrificadas com inalação de éter etílico em campânula de vidro fechada.

3.6 - NECRÓPSIA

O tempo decorrido entre a morte do animal e a coleta do material nunca ultrapassou cinco minutos.

Uma incisão mediana na pele era feita desde a região sub-mentoniana até a região púbica, com ressecção do plastrão esterno-costal e incisão do peritônio, no sentido cérvico-púbico, com exposição ampla das cavidades abdominal e torácica, bem como da região cervical.

Nos grupos 1, 3, 4 e 6 (ratas submetidas a cardioplastia ou não operadas), o estômago era identificado e tracionado suavemente no sentido póstero-anterior, com discreta tração do esôfago, o que permitia sua dissecação no hiato esofágico, mediastino e região cervical. Seccionava-se o piloro, liberando-se o estômago do baço e do pâncreas e o esôfago era então seccionado junto à faringe, com isso retirando-se, em bloco, o esôfago e o estômago. Os conjuntos eram abertos longitudinalmente e estendidos sobre papel filtro úmido, onde eram fotografados.

Nos grupos 2 e 5 (ratas submetidas a esofagoduodenostomia), iniciava-se a liberação pelo duodeno, seccionando-o na 2ª porção; a seguir, liberava-se o estômago e o esôfago como anteriormente descrito; o esôfago, estômago e duodeno eram retirados em bloco. Os conjuntos eram abertos longitudinalmente, de forma a demonstrar a anastomose esôfago-duodenal e o fechamento do cárdia, e estendidos sobre papel filtro úmido para serem fotografados.

Após a identificação fotográfica, todos os espécimes eram envolvidos por papel filtro, de forma a mantê-los distendidos, e colocados um a um em frascos com formalina tamponada a 10%, para posterior descrição macroscópica.

A seguir, toda a cavidade peritoneal, fígado, intestino delgado e cólon eram inspecionados em busca de outras lesões concomitantes ou metástases.

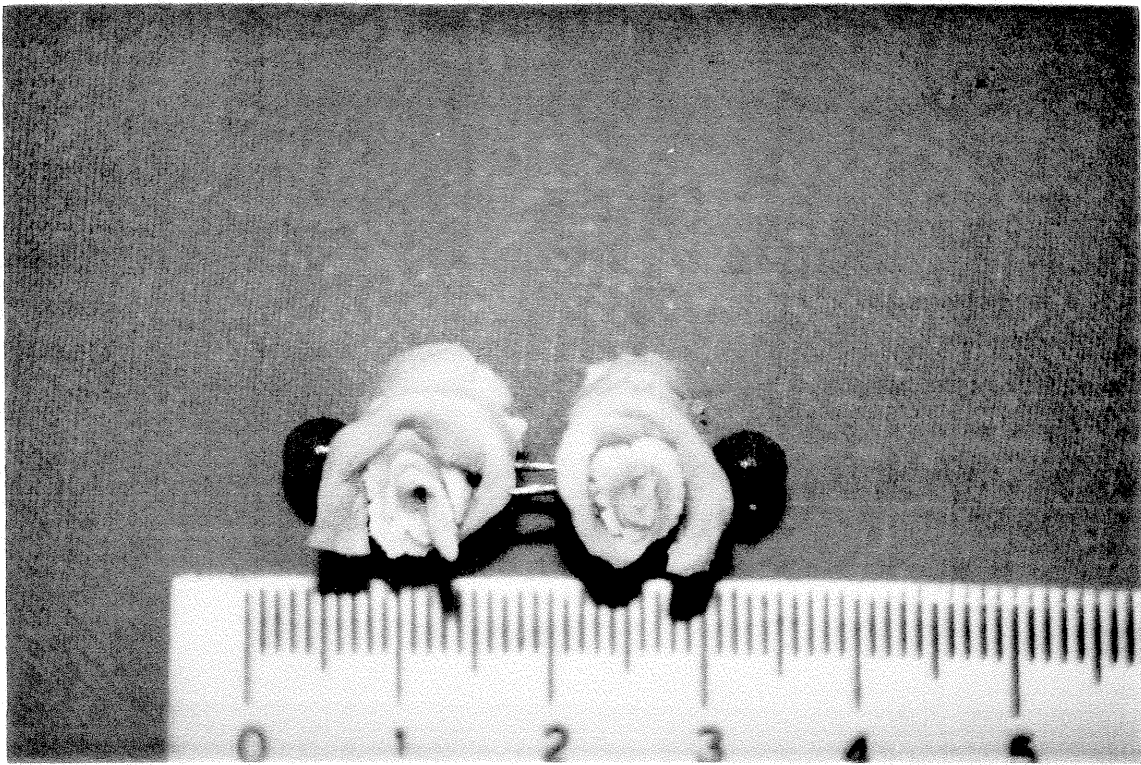


FIGURA 6: Exemplo da disposição dos esôfagos em forma de “rocambole” para posterior inclusão em parafina

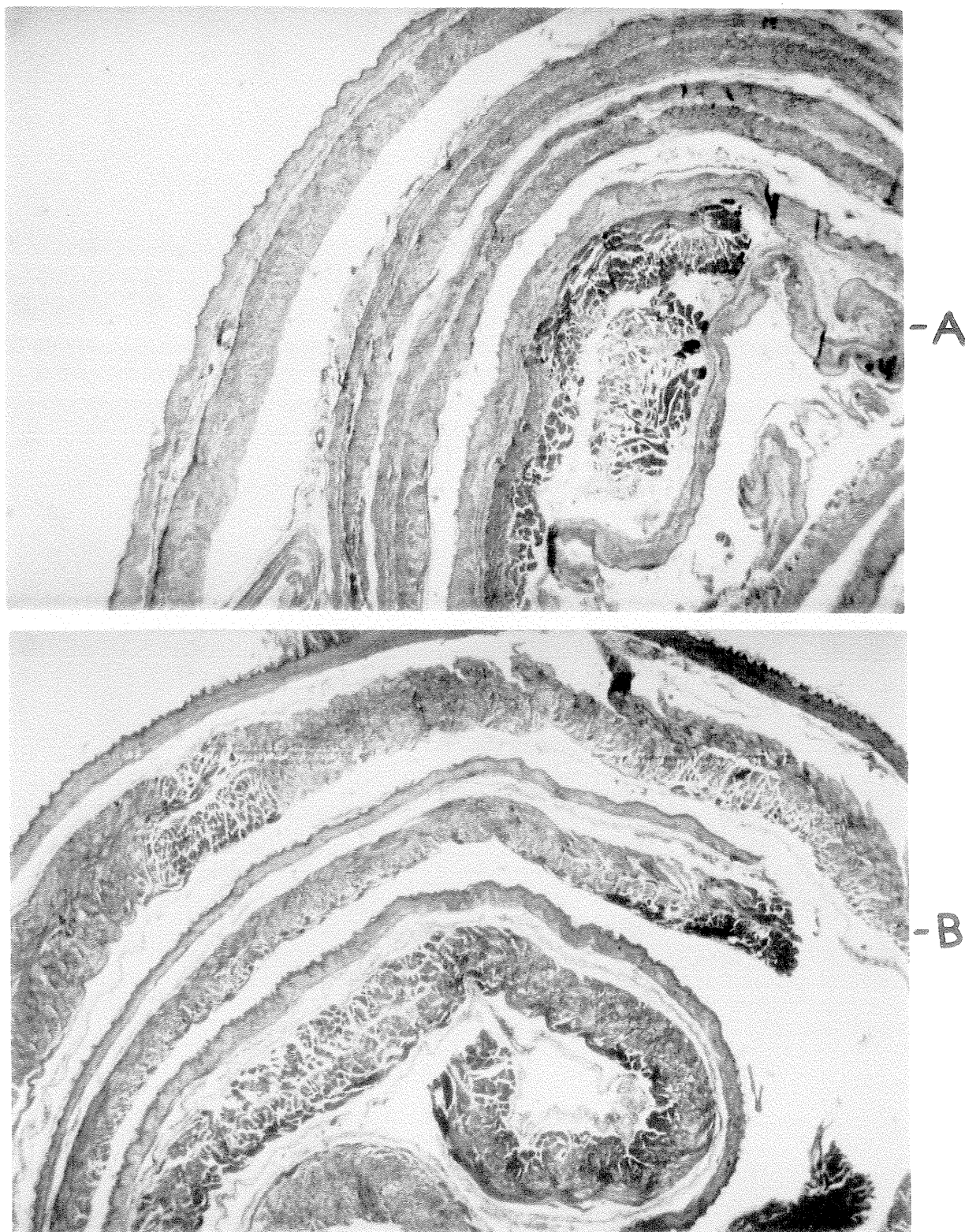


FIGURA 7: A (HE - 25 X) e B (HE 100 X) - Demonstração da forma de inclusão dos esôfagos, tipo “rocambole”, permitindo a visualização de todo o espécime no mesmo corte histológico, para análise microscópica

3.9 - ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os cortes histológicos foram todos examinados em microscópio óptico comum por uma mesma patologista que desconhecia o tipo de tratamento realizado no espécime em estudo.

As alterações histopatológicas, conforme descrições de ACKERMAN (1978), RUBIO (1982, 1983, 1989), KRUEL (1992), CHANDRASOMA (1993), ROBBINS & COTRAN (1994), DAWSEY et al. (1994c), KRUEL et al. (1996b), LEVER (1997), foram classificadas como:

1) Esôfago normal: uma fileira de células basais localizadas entre a borda do epitélio e a submucosa, com núcleos ovais ou arredondados; apresenta um estrato córneo que ocupa um terço ou até metade da espessura epitelial; não se define a muscular da mucosa e são vistas algumas papilas rudimentares; a lâmina própria, se presente, geralmente contém poucas células inflamatórias mononucleares esparsas.

2) Esofagite crônica: leve - projeção de papilas epiteliais em até um terço da espessura do epitélio e/ou infiltrado inflamatório no terço inferior da espessura do epitélio; moderada - projeção de papilas epiteliais em até dois terços da espessura do epitélio; acentuada - projeção de papilas epiteliais em mais de dois terços da espessura do epitélio.

3) Hiperplasia epitelial: espessamento (leve, moderado ou intenso) do epitélio devido a um aumento do número de células, podendo ocorrer alongamento das papilas da lâmina própria.

4) Papilomatose: proliferação das papilas subepiteliais causando ondulações irregulares da superfície epitelial.

5) Ulceração: defeito local ou escavação na superfície do órgão a qual é produzida pela perda de tecido necrótico, com processo inflamatório (neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos).

6) Esôfago de Barrett (metaplasia intestinal): situação na qual a porção distal do esôfago está recoberta por epitélio colunar (glandular), do tipo intestinal.

7) Displasia leve (de baixo grau): alteração das camadas celulares basais atingindo até um terço da espessura do epitélio, com núcleos pleomórficos; ocorrem mitoses no terço inferior do epitélio, fora da camada basal.

8) Displasia moderada (de alto grau): atipia celular mais marcada, com núcleo hipercromático e polimórfico; ocorre crescimento irregular do epitélio escamoso; maturação citoplasmática em direção à superfície era ainda evidente embora menos distinto que na displasia leve.

9) Displasia acentuada (de alto grau): as alterações displásicas atingem toda a espessura do epitélio, que é composto de células marcadamente anormais; a polaridade nuclear está perdida; a maturação citoplasmática ocorre em grande parte da camada epitelial.

10) Adenocarcinoma: neoplasia maligna de origem em células epiteliais com padrão microscópico de crescimento glandular, com ruptura da membrana basal e invasão dos tecidos adjacentes.

11) Carcinoma epidermóide: invasão da submucosa por epitélio escamoso neoplásico no qual identifica-se núcleo hipercromático aumentado de volume; evidente aumento da relação núcleo/citoplasma; citoplasma queratinizado, núcleo com cromatina de granulação grosseira, mas de distribuição irregular; as células malignas são encontradas abaixo da lâmina própria, com inquestionável invasão do estroma.

Depois de realizada a tabulação, os dados foram classificados em seis estágios, em ordem crescente, sempre conforme a maior severidade do diagnóstico de cada peça em estudo:

- Estágio I: esôfago normal, esofagite crônica leve, hiperplasia epitelial leve ou moderada;

- Estágio II: hiperplasia epitelial acentuada, esofagite crônica moderada ou acentuada, papilomatose, ulceração;

- Estágio III: esôfago de Barrett (metaplasia intestinal);

- Estágio IV: displasia leve (lesão de baixo grau);

- Estágio V: displasia moderada ou acentuada (lesão de alto grau);
- Estágio VI: adenocarcinoma ou carcinoma epidermóide.

3.10 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Os dados deste estudo são categóricos e este teste se presta para a comparação dos diferentes estágios nos diferentes grupos.

Como existiu diferença significativa entre os 6 grupos em relação aos diferentes estágios, realizou-se um procedimento de comparações múltiplas adequado para localizar em qual(is) grupo(s) estavam as diferenças encontradas. Para este teste de comparações múltiplas utilizou-se um nível de significância de 10% ($\alpha = 0,1$) (devido ao número de grupos). Este teste compara um grupo com outro sem desprezar a existência dos outros 4 grupos (DANIEL, 1978).

4 - RESULTADOS

Dez ratas (9,0%) morreram antes de completar o experimento (30 semanas de vida), sendo 5 após cardioplastia e 5 após esofagoduodenostomia. A causa das mortes foi a indução anestésica em 5 ratas, abscesso intra-abdominal múltiplo em 1 rata, deiscência da sutura da parede abdominal no 4º dia de pós-operatório em 1 rata, dilatação gástrica sem causa definida em 1 rata, necrose da parede esofágica distal em 2 ratas. As 100 ratas restantes sobreviveram até 30 semanas e são o objeto deste estudo.

As alterações microscópicas do esôfago das ratas estão demonstradas na **TABELA 1**. Nota-se que houve desenvolvimento de neoplasia esofágica (estágio 6) somente nos grupos submetidos a refluxo de conteúdo gastroduodenal (grupos 2 e 5), sendo 3 ratas (16,7%) com adenocarcinoma no grupo tratado com água (grupo 2), e 13 ratas (76,5%) no grupo tratado com DEN (grupo 5), das quais 1 rata (5,9%) com adenocarcinoma e 12 ratas (70,6%) com carcinoma epidermóide.

No grupo controle com água (grupo 3), todos os esôfagos foram considerados como histologicamente normais (estágio 1) (**FIGURAS 8 e 9 (A e B)**). No grupo controle com DEN (grupo 6), 50,0% dos esôfagos apresentaram-se como normais (estágio 1) do ponto de vista histológico, e 50,0% desenvolveram papilomas (estágio 2) (**FIGURAS 10 e 11 (A e B)**).

Em relação aos grupos submetidos a cardioplastia, com refluxo gástrico, aquele tratado com água (grupo 1) apresentou-se em 77,8% como histologicamente normal (estágio 1), 16,7% desenvolveram papilomas, e 5,5% desenvolveram ulceração (22,2% - estágio 2); no grupo tratado com DEN (grupo 4), 52,9% foram considerados como normais (estágio 1), 35,3% desenvolveram papilomas, 5,9% desenvolveram hiperplasia epitelial acentuada, e 5,9% desenvolveram esofagite crônica acentuada (47,1% - estágio 2).

TABELA 1 - Descrição das alterações microscópicas do esôfago nos diferentes grupos, por estágios

Gr. Experimento n.º	n inicial	n final	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Estágio 5		Estágio 6	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1 RGE + H2O	20	18	14	77,8	4	22,2	--	---	--	---	--	---	--	---
2 RGDE + H2O	20	18	1	5,5	11	61,1	3	16,7	--	---	--	---	3	16,7
3 H2O	10	10	10	100,0	---	---	--	---	--	---	--	---	--	---
4 RGE + DEN	20	17	9	52,9	8	47,1	--	---	--	---	--	---	--	---
5 RGDE + DEN	20	17	---	---	4	23,5	--	---	--	---	--	---	13	76,5
6 DEN	20	20	10	50,0	10	50,0	--	---	--	---	--	---	--	---

$$X^2 = 60,59$$

$$p < 0,00001$$

Nos grupos submetidos a esofagoduodenostomia, com refluxo gastroduodenal, houve o maior número de alterações histológicas diagnosticadas. No grupo tratado com água (grupo 2), somente 5,5% apresentaram epitélio normal (estágio 1), enquanto 22,2% desenvolveram esofagite crônica moderada ou acentuada com papilomas ou ulceração, 11,2% desenvolveram esofagite moderada com erosões, 11,2% esofagite acentuada com ulceração, 5,5% esofagite moderada com papiloma, 5,5% esofagite moderada com hiperplasia epitelial acentuada e 5,5% papilomas (61,1% - estágio 2), 16,7% desenvolveram esôfago de Barrett (estágio 3) (FIGURAS 12 e 13 (A e B)) e 16,7% desenvolveram adenocarcinoma (estágio 6) (FIGURAS 14 e 15 (A e B)). Não houve desenvolvimento de displasia de baixo ou alto grau (estágios 4 ou 5) em nenhum caso. Já no grupo tratado com DEN (grupo 5), em nenhum caso o epitélio esofágico foi considerado como histologicamente normal (estágio 1); não houve o desenvolvimento de esôfago de Barrett (estágio 3) nem displasia de baixo ou alto grau (estágios 4 ou 5) em nenhum caso; 5,9% apresentaram esofagite moderada com ulceração e hiperplasia epitelial acentuada, 5,9% desenvolveram esofagite moderada com úlcera esofágica, 5,9% hiperplasia epitelial acentuada com úlcera e 5,9% desenvolveram esofagite moderada (23,5 % - estágio 2); 76,5% desenvolveram carcinoma de esôfago (estágio 6),

sendo 5,9% adenocarcinoma e 70,6% carcinoma epidermóide (FIGURAS 16 e 17 (A e B)).

Em nenhum grupo foi feito o diagnóstico histológico de displasia de baixo ou alto grau no epitélio esofágico (estágios 4 ou 5). Não foram encontradas metástases nas ratas que desenvolveram adenocarcinoma (4 ratas) ou carcinoma epidermóide (12 ratas). Nenhum carcinoma foi encontrado no estômago, intestino delgado ou nos cólons.



FIGURA 8: Esôfago com mucosa normal - Estágio 1 - macroscopia - Rata 70 - Grupo 4

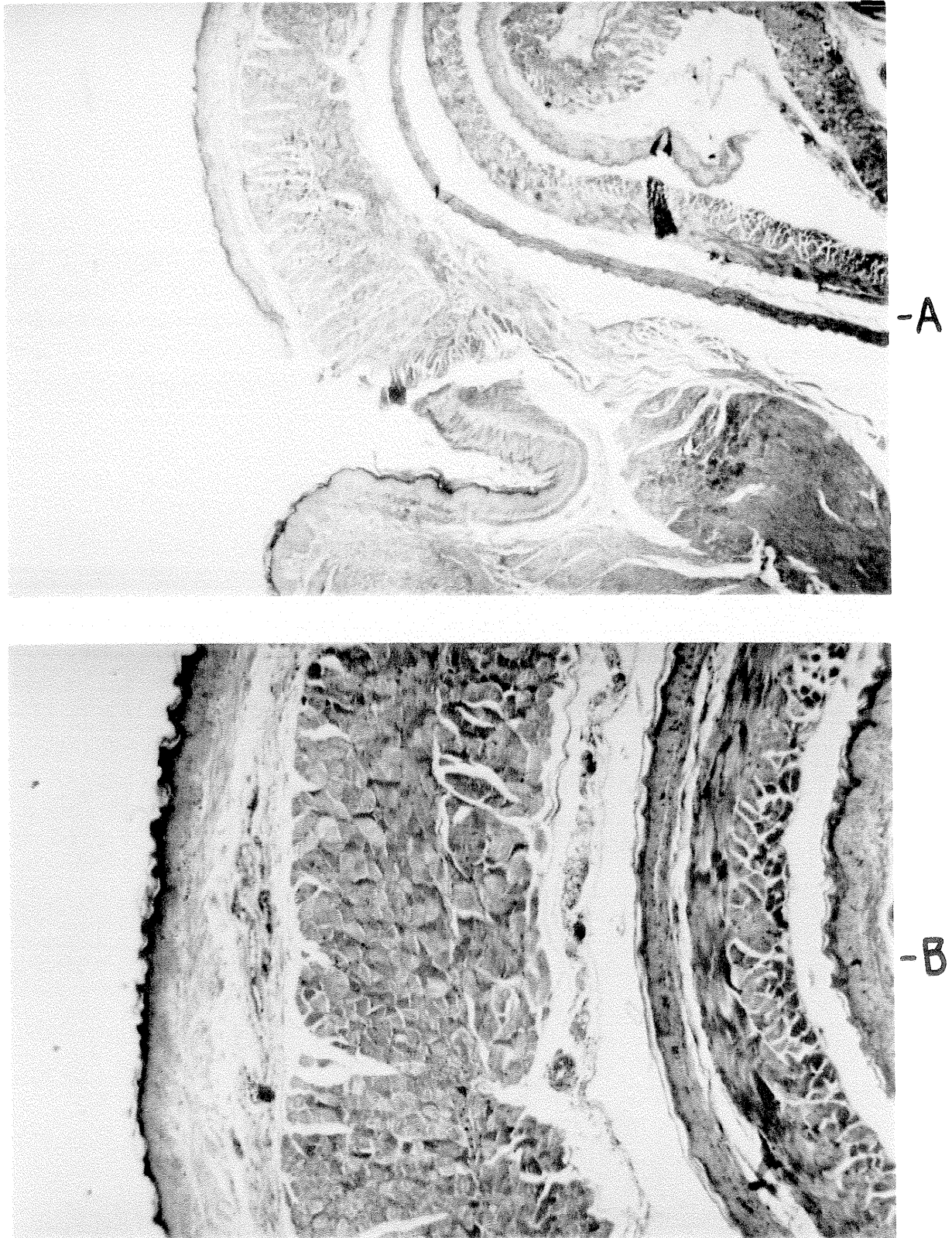


FIGURA 9: Esôfago com mucosa normal - Estágio 1 - microscopia - Rata 70 - Grupo 4 - A (HE - 25 X) e B (HE - 100 X): presença de epitélio escamoso estratificado, com ausência de infiltrado inflamatório

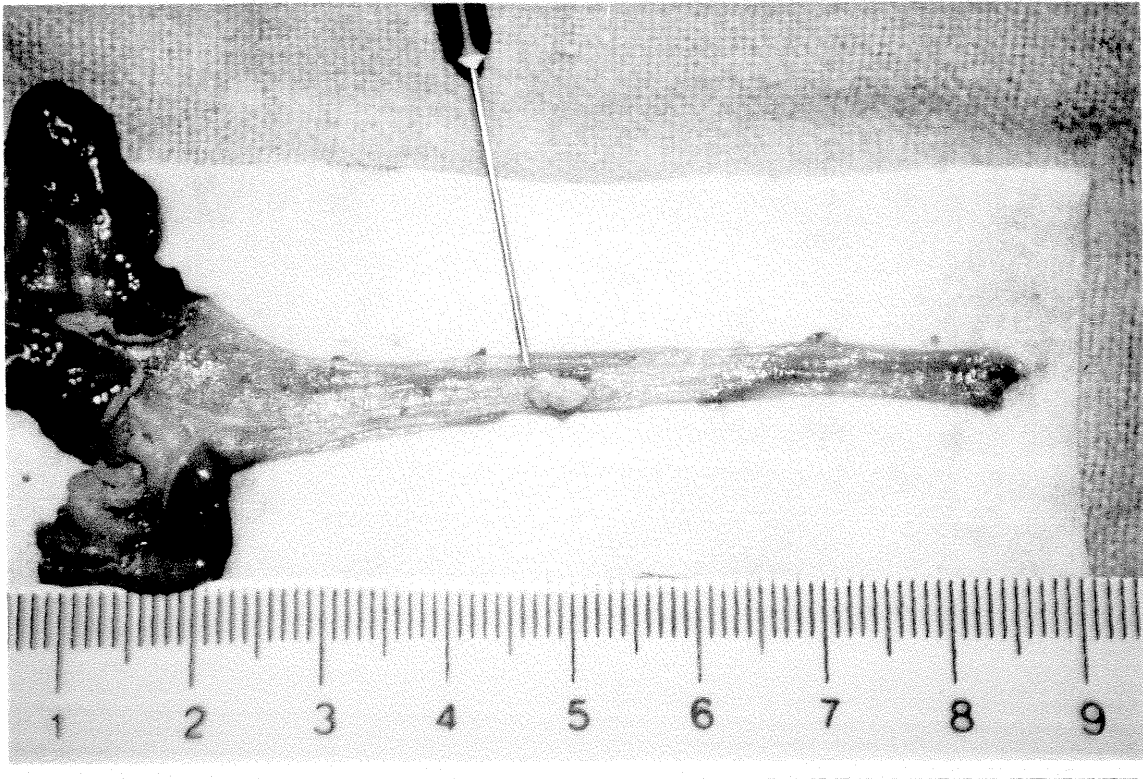
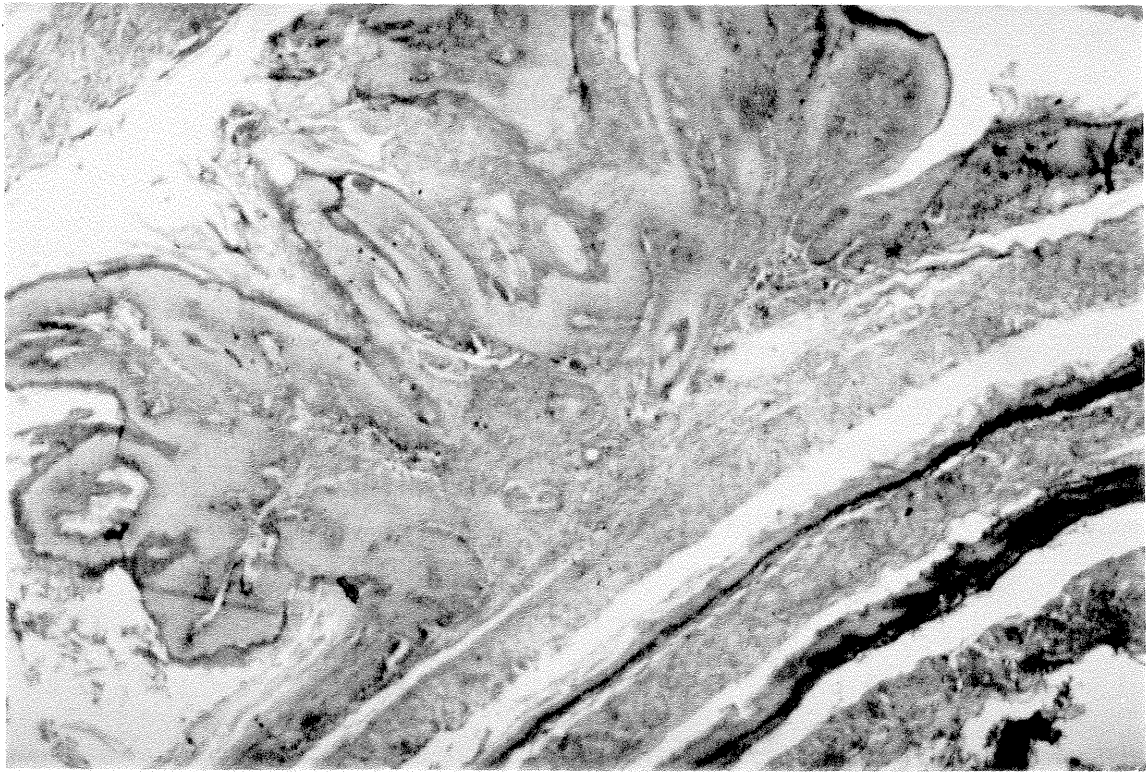
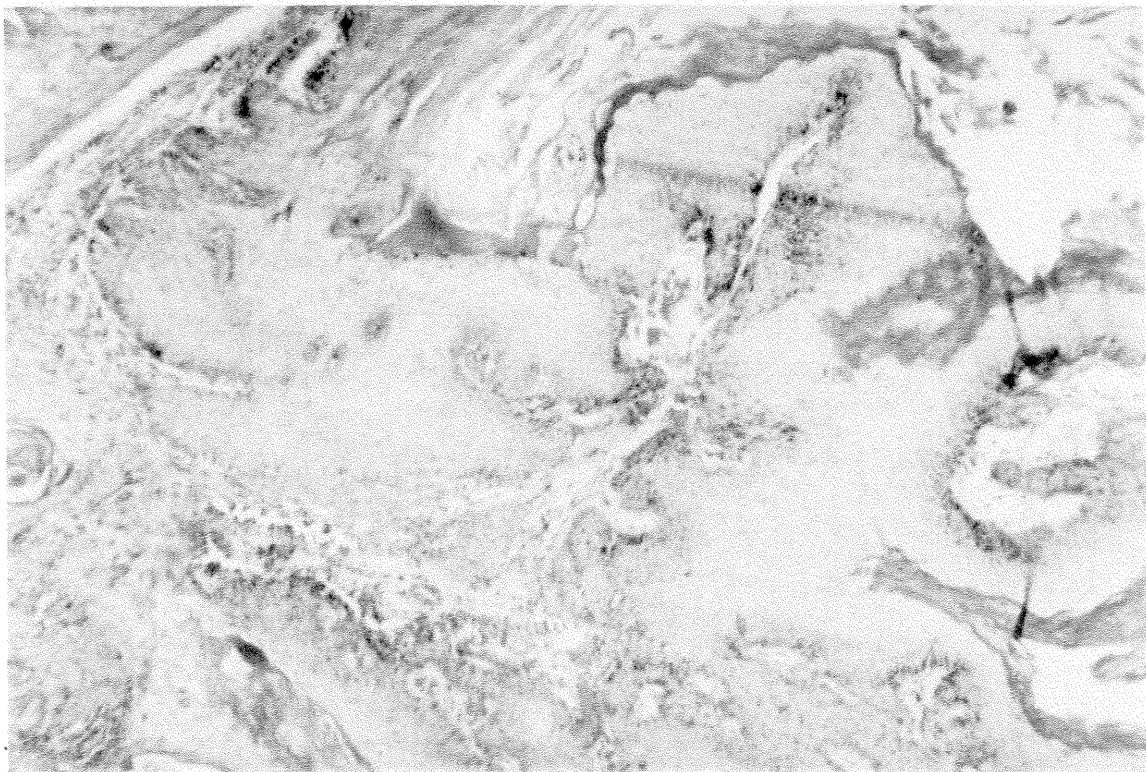


FIGURA 10: Esôfago com papiloma - Estágio 2 - macroscopia - Rata 66 - Grupo 4



-A



-B

FIGURA 11: Esôfago com papiloma - Estágio 2 - microscopia - Rata 66 - Grupo 4 - A (HE - 25 X) e B (HE - 100 X): lesão epitelial escamosa exofítica, benigna, sem caráter invasivo; destacam-se a hiperplasia epitelial e hiperqueratose

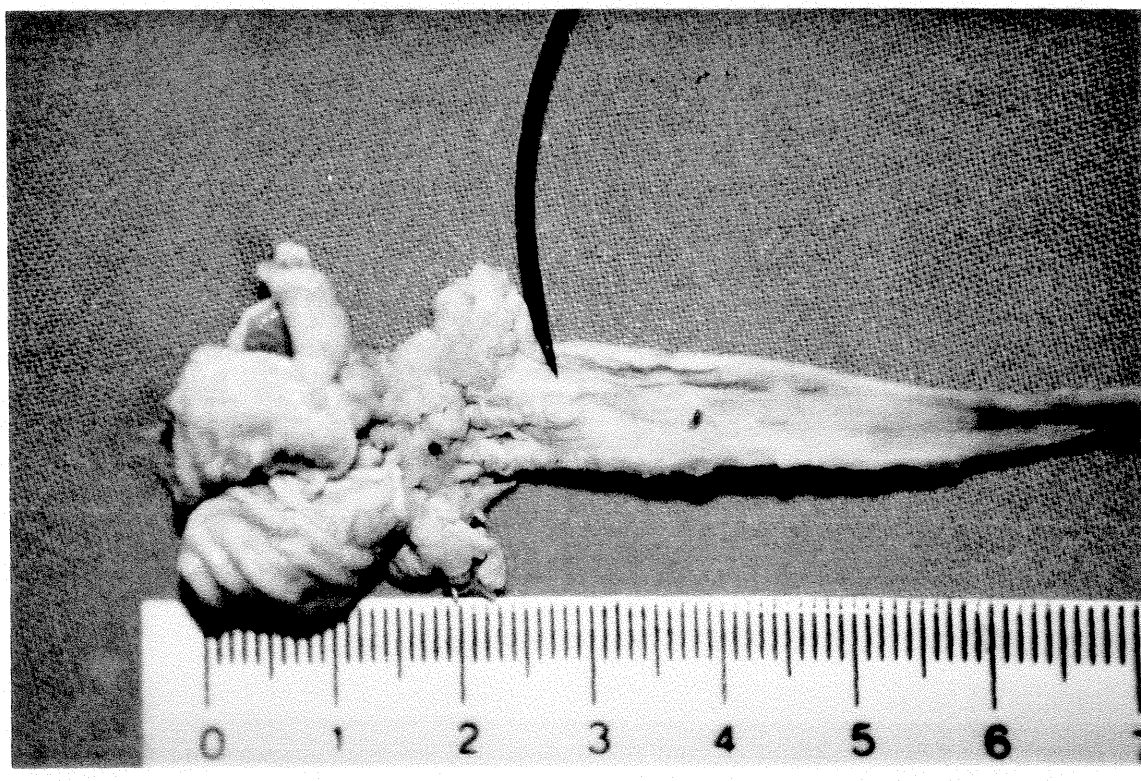
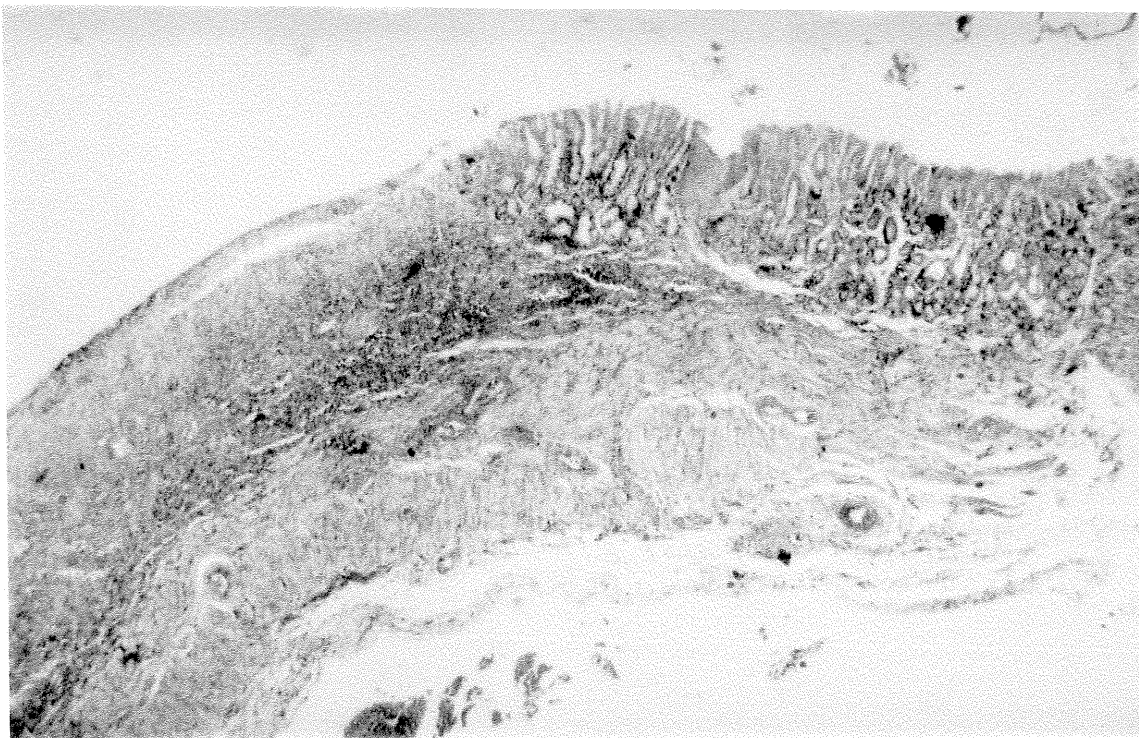
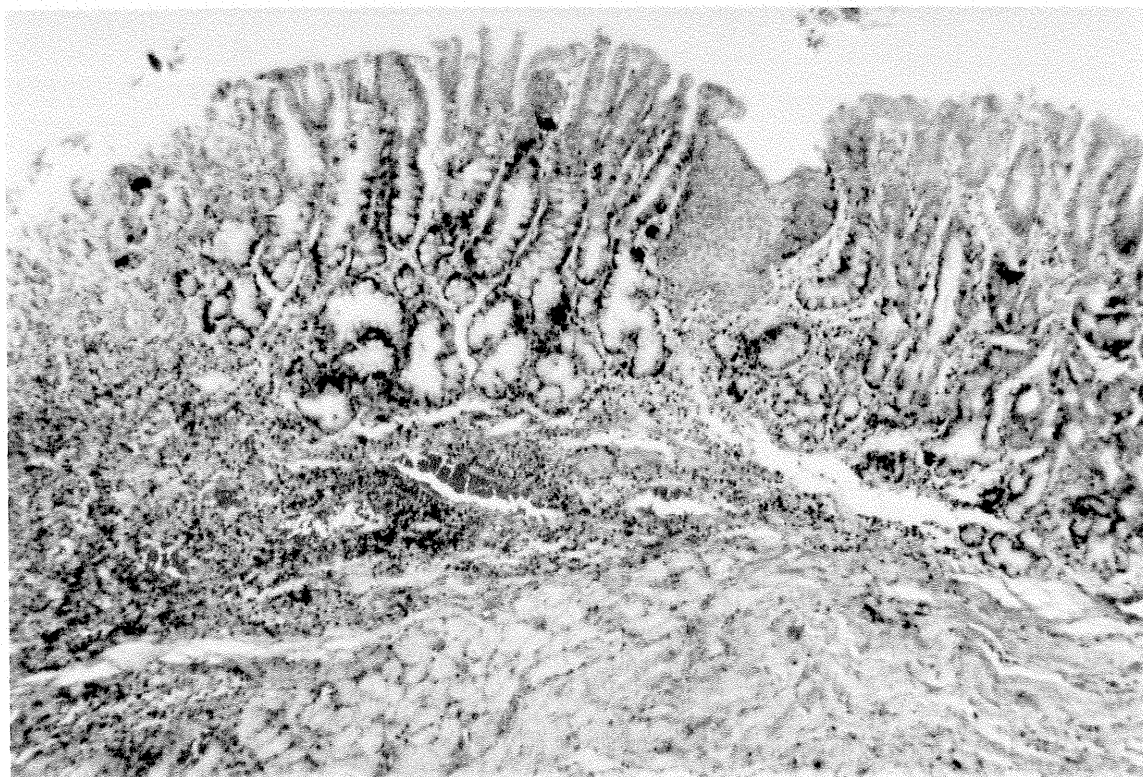


FIGURA 12: Esôfago de Barrett - Estágio 3 - macroscopia - Rata 32 - Grupo 2



36

-A



-B

FIGURA 13: Esôfago de Barrett - Estágio 3 - microscopia - Rata 32 - Grupo 2 - **A (HE - 25 X):** da esquerda para a direita: ulceração epitelial, epitélio glandular tipo intestinal, pequeno segmento de epitélio escamoso e novamente epitélio glandular do tipo intestinal; **B (HE - 100 X):** ressalta-se o epitélio glandular tipo intestinal com a interposição de epitélio escamoso entre ele



FIGURA 14: Esôfago com adenocarcinoma - Estágio 6 - macroscopia - Rata 34 - Grupo 2

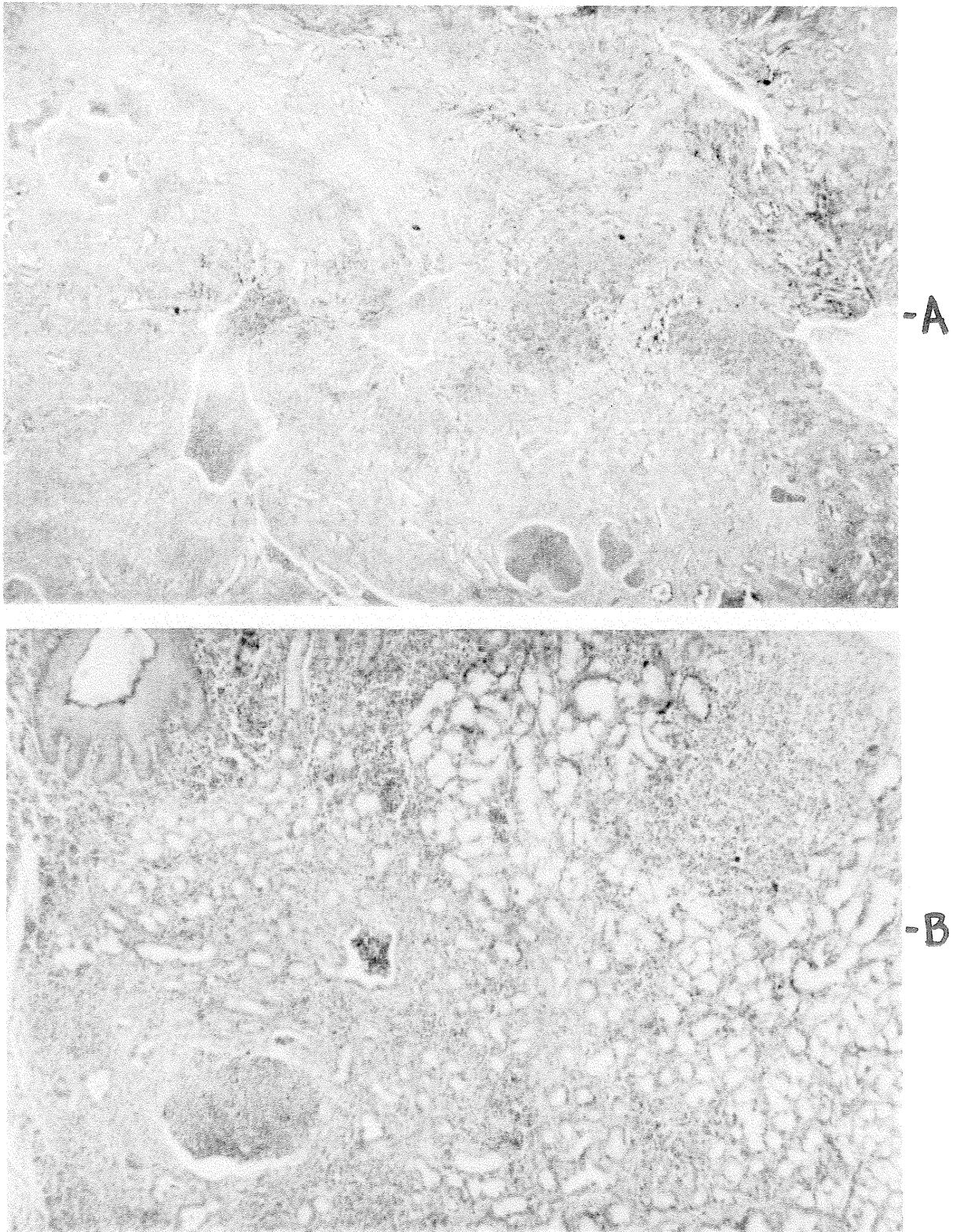


FIGURA 15: Esôfago com adenocarcinoma - Estágio 6 - microscopia - Rata 34 - Grupo 2 - **A (HE - 25 X):** neoplasia de padrão glandular e caráter infiltrativo, com focos de supuração; **B (HE - 100 X):** nota-se pequena área de epitélio escamoso abaixo da qual identifica-se lesão glandular, invasiva

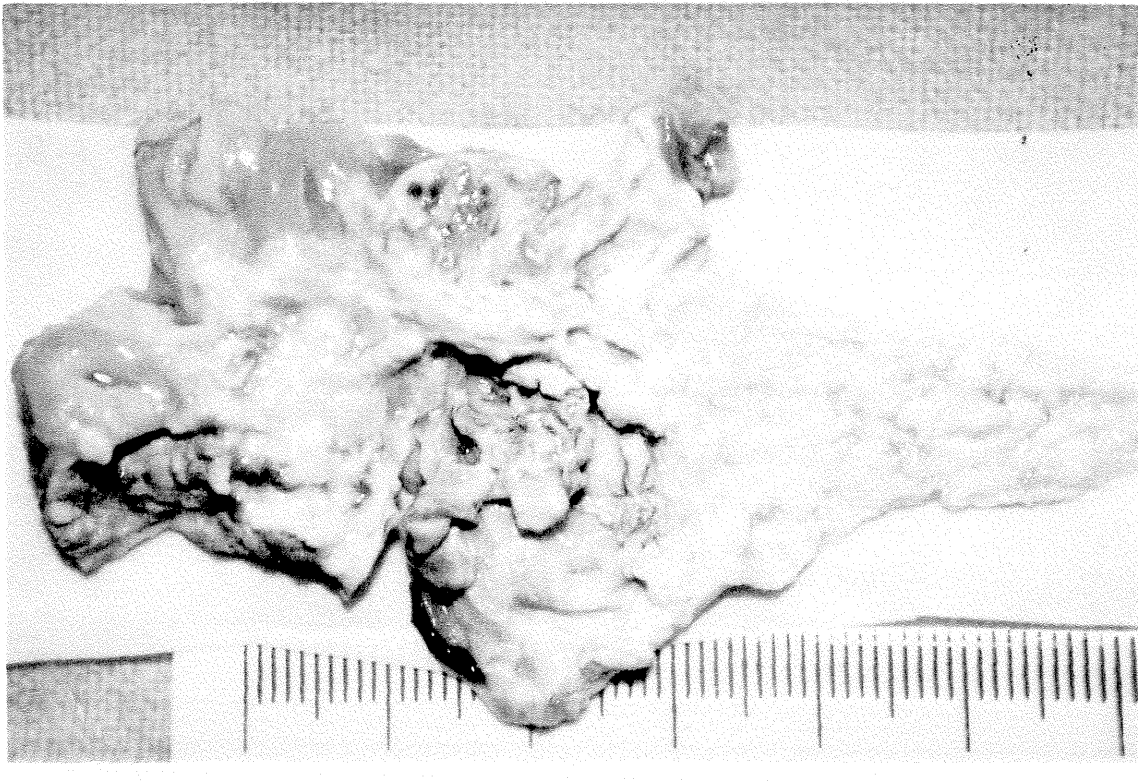


FIGURA 16: Esôfago com carcinoma epidermóide - Estágio 6 - macroscopia
- Rata 85 - Grupo 5

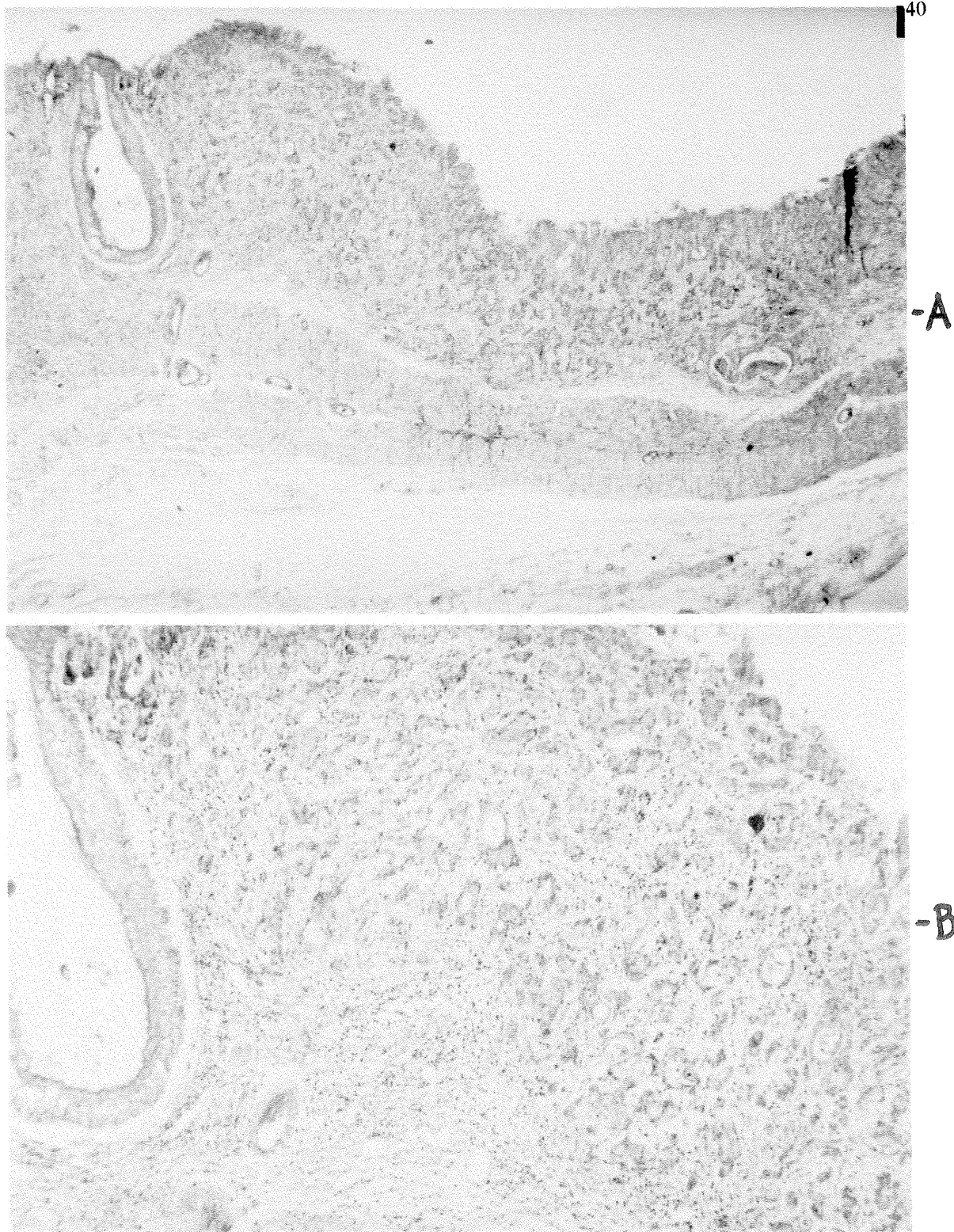


FIGURA 17 : Esôfago com carcinoma epidermóide - Estágio 6 - microscopia - Rata 85 - Grupo 5 - **A (HE - 25 X)**: pequena área, à esquerda, de epitélio escamoso; adjacente a ela, extenso segmento desprovido de epitélio preservado, onde identificam-se numerosas pequenas ilhotas de epitélio escamoso neoplásico que compromete mucosa e submucosa, estendendo-se até a camada muscular, porém sem invadi-la; **B (HE - 100 X)**: nota-se o segmento de epitélio preservado e as formações de epitélio neoplásico, percebendo-se a formação de queratina em cada uma delas; ressalta-se o infiltrado inflamatório adjacente à lesão, bem como a hemorragia

Foi realizada análise estatística, comparando-se os 6 grupos entre si, com os seguintes resultados:

TABELA 2 - Comparação entre os grupos 1 e 2 (diferença significativa)

Gr. Experimento n.º	n inicial	n final	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Estágio 5		Estágio 6	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1 RGE + H2O	20	18	14	77,8	4	22,2	--	---	--	---	--	---	--	---
2 RGDE + H2O	20	18	1	5,5	11	61,1	3	16,7	--	---	--	---	3	16,7

Valor crítico = 26,30

Alfa = 0,1

Diferença entre os grupos = 37,58 (significativa)

TABELA 3 - Comparação entre os grupos 1 e 3 (diferença não significativa)

Gr. Experimento n.º	n inicial	n final	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Estágio 5		Estágio 6	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1 RGE + H2O	20	18	14	77,8	4	22,2	--	---	--	---	--	---	--	---
3 H2O	10	10	10	100,0	--	---	--	---	--	---	--	---	--	---

Valor crítico = 31,12

Alfa = 0,1

Diferença entre os grupos = 9,00 (não significativa)

TABELA 4 - Comparação entre os grupos 1 e 4 (diferença não significativa)

Gr. Experimento n.º	n inicial	n final	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Estágio 5		Estágio 6	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1 RGE + H2O	20	18	14	77,8	4	22,2	--	---	--	---	--	---	--	---
4 RGE + DEN	20	17	9	52,9	8	47,1	--	---	--	---	--	---	--	---

Valor crítico = 26,69

Alfa = 0,1

Diferença entre os grupos = 10,06 (não significativa)

TABELA 5 - Comparação entre os grupos 1 e 5 (diferença significativa)

Gr. Experimento n.º	n inicial	n final	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Estágio 5		Estágio 6	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1 RGE + H2O	20	18	14	77,8	4	22,2	--	--	--	--	--	--	--	--
5 RGDE + DEN	20	17	--	--	4	23,5	--	--	--	--	--	--	13	76,5

Valor crítico = 26,69

Alfa = 0,1

Diferença entre os grupos = 53,97 (significativa)

TABELA 6 - Comparação entre os grupos 1 e 6 (diferença não significativa)

Gr. Experimento n.º	n inicial	n final	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Estágio 5		Estágio 6	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1 RGE + H2O	20	18	14	77,8	4	22,2	--	--	--	--	--	--	--	--
6 DEN	20	20	10	50,0	10	50,0	--	--	--	--	--	--	--	--

Valor crítico = 25,64

Alfa = 0,1

Diferença entre os grupos = 11,25 (não significativa)

TABELA 7 - Comparação entre os grupos 2 e 3 (diferença significativa)

Gr. Experimento n.º	n inicial	n final	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Estágio 5		Estágio 6	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
2 RGDE + H2O	20	18	1	5,5	11	61,1	3	16,7	--	--	--	--	3	16,7
3 H2O	10	10	10	100,0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Valor crítico = 31,12

Alfa = 0,1

Diferença entre os grupos = 46,58 (significativa)

TABELA 8 - Comparação entre os grupos 2 e 4 (diferença significativa)

Gr. Experimento n.º	n inicial	n final	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Estágio 5		Estágio 6	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
2 RGDE + H2O	20	18	1	5,5	11	61,1	3	16,7	--	---	--	---	3	16,7
4 RGE + DEN	20	17	9	52,9	8	47,1	--	---	--	---	--	---	--	---

Valor crítico = 26,69

Alfa = 0,1

Diferença entre os grupos = 27,52 (significativa)

TABELA 9 - Comparação entre os grupos 2 e 5 (diferença não significativa)

Gr. Experimento n.º	n inicial	n final	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Estágio 5		Estágio 6	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
2 RGDE + H2O	20	18	1	5,5	11	61,1	3	16,7	--	---	--	---	3	16,7
5 RGDE + DEN	20	17	--	---	4	23,5	--	---	--	---	--	---	13	76,5

Valor crítico = 26,69

Alfa = 0,1

Diferença entre os grupos = 16,39 (não significativa)

TABELA 10 - Comparação entre os grupos 2 e 6 (diferença significativa)

Gr. Experimento n.º	n inicial	n final	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Estágio 5		Estágio 6	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
2 RGDE + H2O	20	18	1	5,5	11	61,1	3	16,7	--	---	--	---	3	16,7
6 DEN	20	20	10	50,0	10	50,0	--	---	--	---	--	---	--	---

Valor crítico = 25,64

Alfa = 0,1

Diferença entre os grupos = 26,33 (significativa)

TABELA 11 - Comparação entre os grupos 3 e 4 (diferença não significativa)

Gr. Experimento n.º	n inicial	n final	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Estágio 5		Estágio 6	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
3 H2O	10	10	10	100,0	--	---	--	---	--	---	--	---	--	---
4 RGE + DEN	20	17	9	52,9	8	47,1	--	---	--	---	--	---	--	---

Valor crítico = 31,45

Alfa = 0,1

Diferença entre os grupos = 19,06 (não significativa)

TABELA 12 - Comparação entre os grupos 3 e 5 (diferença significativa)

Gr. Experimento n.º	n inicial	n final	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Estágio 5		Estágio 6	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
3 H2O	10	10	10	100,0	--	---	--	---	--	---	--	---	--	---
5 RGDE + DEN	20	17	--	---	4	23,5	--	---	--	---	--	---	13	76,5

Valor crítico = 31,45

Alfa = 0,1

Diferença entre os grupos = 62,97 (significativa)

TABELA 13 - Comparação entre os grupos 3 e 6 (diferença não significativa)

Gr. Experimento n.º	n inicial	n final	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Estágio 5		Estágio 6	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
3 H2O	10	10	10	100,0	--	---	--	---	--	---	--	---	--	---
6 DEN	20	20	10	50,0	10	50,0	--	---	--	---	--	---	--	---

Valor crítico = 30,58

Alfa = 0,1

Diferença entre os grupos = 20,25 (não significativa)

TABELA 14 - Comparação entre os grupos 4 e 5 (diferença significativa)

Gr. Experimento n.º	n inicial	n final	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Estágio 5		Estágio 6	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
4 RGE + DEN	20	17	9	52,9	8	47,1	--	--	--	--	--	--	--	--
5 RGDE + DEN	20	17	--	--	4	23,5	--	--	--	--	--	--	13	76,5

Valor crítico = 27,07

Alfa = 0,1

Diferença entre os grupos = 43,91 (significativa)

TABELA 15 - Comparação entre os grupos 4 e 6 (diferença não significativa)

Gr. Experimento n.º	n inicial	n final	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Estágio 5		Estágio 6	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
4 RGE + DEN	20	17	9	52,9	8	47,1	--	--	--	--	--	--	--	--
6 DEN	20	20	10	50,0	10	50,0	--	--	--	--	--	--	--	--

Valor crítico = 26,03

Alfa = 0,1

Diferença entre os grupos = 1,19 (não significativa)

TABELA 16 - Comparação entre os grupos 5 e 6 (diferença significativa)

Gr. Experimento n.º	n inicial	n final	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Estágio 5		Estágio 6	
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
5 RGDE + DEN	20	17	--	--	4	23,5	--	--	--	--	--	--	13	76,6
6 DEN	20	20	10	50,0	10	50,0	--	--	--	--	--	--	--	--

Valor crítico = 26,03

Alfa = 0,1

Diferença entre os grupos = 42,72 (significativa)

5 - DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi descrever as alterações da mucosa esofágica, bem como a prevalência de lesões malignas em ratas *Wistar* submetidas a refluxo gastro-esofágico e gastroduodeno-esofágico, através de um modelo experimental de carcinogênese química, usando a DEN como indutor.

Em pesquisas de alterações pré-neoplásicas ou neoplásicas em esôfagos humanos, a rotulação de algumas modificações patológicas como pré-cancerosas é devida à frequência com que elas acompanham o câncer nesse órgão. Esse critério, porém, não é confiável o suficiente para prover a natureza pré-cancerosa dessas lesões. Já em estudos experimentais, há a oportunidade de se realizar um estudo sistemático da morfologia do câncer de esôfago, bem como realizar-se o seguimento morfodinâmico do processo patológico, estágio por estágio (KRUEL, 1992).

Neste estudo foram utilizadas ratas *Wistar* em razão do seu baixo custo operacional e adaptabilidade às condições de trabalho, sendo que no estudo-piloto obtiveram-se bons resultados com esta espécie.

Outros estudos experimentais utilizaram o camundongo *mus musculus* da cepa CF1 (KRUEL, 1992), camundongos C57B1 (RUBIO, 1982), ratos Sprague-Dawley (PERA et al., 1989), ratos F344 (STINSON, 1979), ratos búfalo (REUBER, 1977), ratos albinos (NAPALKOV & POZHARISSKI, 1969), com incidências variáveis de carcinoma esofágico.

Outras espécies de animais, tais como o coelho (IIZUKA et al., 1977; LILLIEMOE et al., 1983), galináceos (YANG, 1980), cães da raça Beagle (SASAJIMA et al., 1977), foram utilizados em outros estudos. Porém, o custo operacional e do alojamento, bem como o longo tempo para carcinogênese esofágica limitam o seu uso.

Baseado em estudos prévios de KRUEL (1992) e ATTWOOD et al. (1992), montou-se este delineamento experimental, conjugando-se os dois experimentos. Este novo delineamento permitiu a comparação entre diferentes grupos submetidos a refluxo gastro-esofágico e gastroduodeno-esofágico, tratados ou não com DEN. O grupo não submetido a cirurgia e tratado somente com água (grupo 3) foi definido como controle geral, uma vez que 100% das ratas deste grupo foram classificadas no estágio 1.

O alimento utilizado (Purina ®), bem com a fonte de água (DMAE de Porto Alegre), foram o mesmo para todos os grupos, não influenciando no processo de carcinogênese.

A concentração do carcinógeno na água de beber é a preconizada em outros modelos experimentais (RUBIO, 1982, 1983, 1987; KRUEL, 1992), com a finalidade de diminuir a mortalidade causada pela ação hepatotóxica da DEN. A ingestão da droga dissolvida na água de beber, ao invés da intubação gástrica (BARCH et al., 1986), injeção intraperitonal (LEVISON et al., 1979, ATTWOOD et al., 1992), ou injeção subcutânea (STINSON et al., 1978), deveu-se a simplicidade do método, exigindo mínima manipulação das ratas e comprovada eficiência (RUBIO, 1982, 1983; MANDARD et al., 1984; KRUEL, 1992).

Em nosso estudo, a taxa média de mortalidade após cirurgia (cardioplastia X esofagoduodenostomia) não diferiu entre os grupos, ao contrário do estudo de ATTWOOD et al. (1992), que observaram uma maior mortalidade naqueles animais cujo esôfago foi exposto ao suco duodenal, devido a um aumento na intensidade de inflamação e destruição tecidual.

A análise anatomopatológica foi realizada por uma patologista que desconhecia o tipo de tratamento empregado no espécime em análise, o que tornou o estudo “cego” em relação a este item.

A avaliação histológica dos esôfagos sugeriu evidência da evolução do esôfago de Barrett (estágio 3) como precursor para adenocarcinoma (estágio 6) naquele grupo submetido a RGDE e tratado somente com água, corroborando os achados de PERA et al. (1993c); porém, não se observou esôfago de Barrett no grupo submetido a RGDE que desenvolveu carcinoma epidermóide (estágio 6), o que implica o conteúdo gastroduodenal como carcinógeno e a DEN como co-carcinógeno.

Comparando-se os grupos não submetidos a procedimento cirúrgico (3 x 6 - tabela 13) nota-se que a DEN isolada não demonstrou capacidade para produzir alterações na mucosa esofágica estatisticamente significativas em relação à água, mesmo tendo sido utilizada por um período de 140 dias (20 semanas). Observou-se que 50% das ratas submetidas ao tratamento isolado com DEN (grupo 6) desenvolveram papilomas (estágio 2) na mucosa esofágica e 50% não mostraram alterações histopatológicas (estágio 1). No

estudo de KRUEL (1992), com camundongos, encontrou-se carcinogênese “abrupta” em torno de 150 dias após administração oral de DEN.

Do mesmo modo, comparando-se os grupos 1 x 3 (tabela 3), 1 x 4 (tabela 4), 1 x 6 (tabela 6), 3 x 4 (tabela 11), e 4 x 6 (tabela 15), nota-se que os grupos submetidos a RGE isolado ou associado a DEN não se mostraram estatisticamente diferentes aos grupos tratados com água ou DEN isolada. Ou seja, neste estudo, o refluxo de conteúdo gástrico para o esôfago, independente da associação ou não com DEN, não demonstrou potencial pré-carcinogênico ou carcinogênico, pois não ultrapassou o estágio 2 em nenhum dos dois grupos submetidos a cardioplastia (grupos 1 e 4). No modelo de ATTWOOD et al. (1992), o RGE isolado também não apresentou alterações significativas; porém, quando associado a outro tipo de nitrosamina (DMNM) via intraperitoneal, 30% dos ratos desenvolveram papilomatose difusa e 20%, carcinoma epidermóide.

Confrontando-se os grupos 2 x 3 (tabela 7) observou-se que o RGDE isolado foi um potente carcinógeno em relação ao grupo controle tratado com água; em associação com DEN (grupos 3 x 5 - tabela 12) o RGDE demonstrou importante potencial carcinogênico quando comparado a ratas tratadas somente com água. Da mesma forma, comparando-se os grupos 2 x 6 (tabela 10) e 5 x 6 (tabela 16), viu-se que o RGDE (isolado ou associado a DEN) foi nitidamente mais danoso à mucosa esofágica que a DEN isolada. Ou seja, o RGDE por si só é que fez a diferença.

Comparando-se os grupos 1 x 2 (tabela 2) notou-se que o RGDE isolado foi significativamente mais prejudicial à mucosa esofágica que o RGE isolado. O RDGE isolado demonstrou potencial pré-carcinogênico e carcinogênico, lesando a mucosa esofágica, evoluindo para a metaplasia intestinal de Barrett (estágio 3 - 16,7%) e formação de adenocarcinoma de esôfago (estágio 6 - 16,7%), enquanto somente 5,5% permaneceram com epitélio normal; já o RGE isolado produziu papilomatose ou ulceração (estágio 2) em somente 22,2 % das ratas, e os restantes 77,8% mantiveram-se com mucosa normal (estágio 1). PERA et al. (1993a e 1993c) demonstraram uma relação entre o esôfago de Barrett e o desenvolvimento do adenocarcinoma de esôfago sobre a metaplasia colunar, devido à progressão da mucosa de metaplasia tipo intestinal para displasia, carcinoma “in situ”, e adenocarcinoma invasivo. Comparando-se os grupos 4 x 5 (tabela 14) as observações acima se reafirmam, já que o RGE associado a DEN não ultrapassou o estágio 2, enquanto o RGDE associado a DEN alcançou 76,5%

no estágio 6, sendo 70,6% carcinoma epidermóide e 5,9% adenocarcinoma de esôfago. KAUER et al. (1995) também encontraram lesões mais severas na mucosa esofágica em pacientes com RGDE quando comparados àqueles com RGE. Quando se compararam os grupos 2 x 4 (tabela 8) observou-se que o RGDE isolado foi, por si só, significativamente mais carcinogênico esofágico do que o RGE associado a DEN. Quando se compararam os grupos 1 x 5 (tabela 5) notou-se que o RGDE associado a DEN foi mais carcinogênico que o RGE isolado. Estes resultados demonstraram claramente que o fator desencadeante da carcinogênese esofágica foi o RGDE; a DEN funcionou somente como um fator potencializador do RGDE.

Finalmente, quando compararam-se os grupos 2 x 5 (tabela 9), notou-se que o RGDE isolado não apresentou diferença estatística quando comparado ao RGDE associado a DEN; no entanto, observou-se que o RGDE foi potencializado pela DEN, pois evoluiu em 76,5% ao estágio 6 no grupo 5, enquanto “somente” 16,7% atingiram este estágio no grupo 2. Isto evidenciou, novamente, que a DEN serviu somente como um potencializador do poder carcinogênico do RGDE.

Este estudo demonstrou uma clara diferença na carcinogênese entre os grupos de ratas submetidas a RGDE em relação aos demais grupos. Nas ratas com RGDE e tratadas somente com água, 16,7% desenvolveram adenocarcinoma de esôfago; já nas ratas com RGDE e tratadas com DEN, 76,5% desenvolveram carcinoma esofágico, sendo 70,6% carcinoma epidermóide e 5,9% adenocarcinoma. Estas observações não ocorreram em ratas sem procedimento cirúrgico, tratadas com água ou DEN, tampouco em ratas submetidas a RGE associado a água ou DEN. Estas observações implicam o suco gastroduodenal como um importante carcinógeno para o desenvolvimento de tumores epiteliais no esôfago (adenocarcinoma ou carcinoma epidermóide).

Os resultados deste estudo experimental complementam os achados por ATTWOOD et al. (1992), que encontraram adenocarcinoma em esôfago de ratos com RGDE e tratadas com nitrosaminas, bem com o estudo de SETO et al. (1991), que indicou que o refluxo de conteúdo duodenal contribuiria vigorosamente para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide de esôfago. Também corrobora trabalhos de LAMBERT (1962), KIVILAAKSO et al. (1980), e LILLIEMOE et al. (1983), que encontraram uma grande destruição da mucosa esofágica em ratos expostos ao suco duodenal em relação ao suco gástrico.

Nossa hipótese para tais achados é de que a presença de sais biliares, suco pancreático ou algum outro constituinte do suco duodenal refluído para o esôfago acelere a produção do carcinoma esofágico, alterando a diferenciação da mucosa para produzir ou adenocarcinoma (RGDE puro) ou carcinoma epidermóide (RGDE associado a DEN).

6 - CONCLUSÕES

1) O refluxo de conteúdo gastroduodeno-esofágico é significativamente mais deletério para a mucosa esofágica do que o refluxo gastro-esofágico.

2) Neste estudo, o refluxo gastro-esofágico não demonstrou potencial carcinogênico em relação ao esôfago.

3) O refluxo gastroduodeno-esofágico isolado atua como um carcinógeno esofágico, produzindo metaplasia intestinal (esôfago de Barrett) e adenocarcinoma do esôfago.

4) A oncogênese esofágica causada pelo refluxo gastroduodeno-esofágico é potencializado pela diethylnitrosamina, induzindo carcinomas epiteliais no esôfago, sendo o carcinoma epidermóide a grande maioria (70,6%) e adenocarcinoma em menor número (5,9%).

5) Neste estudo, a diethylnitrosamina isolada não gerou tumores no esôfago de ratas.

7 - PERSPECTIVAS

1) Estudar o conteúdo de suco gastroduodenal refluído para o esôfago, na tentativa de encontrar qual(is) composto(s) pode(m) estar induzindo a oncogênese esofágica.

2) Utilizar os espécimes deste modelo experimental e estudar a manifestação do *p53* e o *c-erbB-2*.

3) Estudar os efeitos do refluxo gastroduodeno-esofágico sob o ponto de vista experimental, clínico e epidemiológico.

ANEXO A: Purina ® - Animais de laboratório - Descrição do Manual

Alimentos Purina ® para Animais de Laboratório
Manual para Bioteristas e Pesquisadores

Alimento utilizado: Labina

Alimentação para fêmeas em crescimento: 12-15g/dia de ração

Consumo de água: “Ad libitum”

Início de uso da ração: pode ser utilizada a partir de 12 dias de vida

Labina: Fórmula constante, específica para camundongos, ratos e hamsters

ANEXO B: Descrição dos fios utilizados para os procedimentos cirúrgicos

Fio Prolene 7-0

M8702

2 shine - 1,0 cm - BV-1 Master

Cardiovascular

Polipropileno azul

Monofilamento

N.Abs.

60 cm

ETHICON ®

Fio Prolene 6-0

M8706

2 shine - 1,3 cm - C-1 Master

Cardiovascular

Polipropileno azul

Monofilamento

N.Abs.

75 cm

ETHICON ®

Fio Mononylon 5-0

15501

Ethipoint - 2,5 cm - CP-25

Cuticular

Nylon Preto/Negro

Monofilamento

N.Abs.

45 cm

ETHICON ®

ANEXO C: Descrição do carcinógeno (DEN)

N-nitrosodiethylamine (DEN)

Sigma Chemical Co.

N-0756

Lot 31H0401

10 ml

St. Louis

MO 63178

U.S.A.

314-771-5750

ANEXO D: Descrição macroscópica dos espécimes esofágicos

Análise Macroscópica dos Segmentos Esofágicos

Rato n.º G Cx. R Fotos (S)im (N)ão
 Comprimento do esôfago: cm

a) Lesões no Terço Proximal:

..... lesões, sendo: planas e lisas
 elevadas e lisas
 discretamente elevadas e rugosas
 vegetantes
 papilíferas
 ulceradas
 rugosidade em mucosa
 outro:

a maior delas medindo: X X mm

Observações:

b) Lesões no Terço Médio:

..... lesões, sendo: planas e lisas
 elevadas e lisas
 discretamente elevadas e rugosas
 vegetantes
 papilíferas
 ulceradas
 rugosidade em mucosa
 outro:

a maior delas medindo: X X mm

Observações:

c) Lesões no Terço Distal:

..... lesões, sendo: planas e lisas
 elevadas e lisas
 discretamente elevadas e rugosas
 vegetantes
 papilíferas
 ulceradas
 rugosidade em mucosa
 outro:

a maior delas medindo: X X mm

Observações:

Outras observações pertinentes em relação ao espécime examinado:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ACKERMAN, A.B., ed. - **Histologic Diagnosis of Inflammatory Skin Diseases. A Method by Pattern Analysis.** 2^a ed. New York, Lea & Febiger, 1978. 863p.
- ALTORKI, N.K.; SUNAGAWA, M.; LITTLE, A.G.; SKINNER, D.B. - High-grade dysplasia in columnar-lined esophagus. **Am. J. Surg.**, 161:97-100, 1991.
- ARMSTRONG, D.; BLUM, A.L.; SAVARY, M. - Reflux disease and Barrett's oesophagus. **Endoscopy**, 24:9-17, 1992.
- ASHWORTH, M.T.; NASH, J.R.G.; ELLIS, A.; DAY, D.W.- Abnormalities of differentiation and maturation in the oesophageal squamous epithelium of patients with tylosis: morphological features. **Histopathology**, 19:303-10, 1991.
- ATTWOOD, S.E.A.; DeMEESTER, T.R.; BREMNER, C.G.; BARLOW, A.P.; HINDER, R.A. - Alkaline gastroesophageal reflux: implications in the development of complications in Barrett's columnar-lined lower esophagus. **Surgery**, 106:764-70, 1989.
- ATTWOOD, S.E.A.; SMYRK, T.C.; DeMEESTER, T.R.; MIRVISH, S.S.; STEIN, H.J.; HINDER, R.A. - Duodeno-esophageal reflux and the development of esophageal adenocarcinoma in rats. **Surgery**, 111:503-10, 1992.
- ATTWOOD, S.E.A.; BALL, C.S.; BARLOW, A.P.; JENKINSON, L.; NORRIS, T.L.; WATSON, A. - Role of intragastric and intraoesophageal alkalinisation in the genesis of complications in Barrett's columnar lined lower oesophagus. **Gut**, 34:11-5, 1993.
- AUDRÉZET, M.P.; ROBASZKIEWICZ, M.; MERCIER, B.; NOUSBAUM, J.B.; BAIL, J.P.; HARDY, E.; VOLANT, A.; LOZAC'H, P.; CHARLES, J.F.; GOUÉRON, H.; FÉREC, C. - *TP53* gene mutation profile in esophageal squamous cell carcinomas. **Cancer Res.**, 53:5745-9, 1993.

- AYIOMAMITIS A. - Epidemiology of cancer of the esophagus in Canada: 1931-1984. **Gastroenterology**, 94:374-80, 1988.
- AZE, Y.; TOYODA, K.; FURUKAWA, F.; MITSUMORI, K.; TAKAHASHI, M. - Enhancing effect of ethanol on esophageal tumor development in rats by initiation of diethylnitrosamine. **Carcinogenesis**, 14:37-40, 1993.
- BARCH, D.; WALLOCH, J.; HEDVEGI, D.; IANNACCONE, P. - Histopathology of methylbenzyl nitrosamine - induced esophageal carcinoma in the rat: comparison with cytomorphology. **J. N. C. I.**, 77: 1145-53, 1986.
- BARCH, D.H. - Esophageal cancer and microelements. **J. Am. Coll. Nutr.**, 8 : 99-107, 1989.
- BARRETT N.R. - Chronic peptic ulcer of the oesophagus and oesophagitis. **Br. J. Surg.**, 38:175-82, 1950.
- BARROS, S.G.S. - Detecção de lesões precursoras em indivíduos sob risco para o carcinoma epidermóide do esôfago. Experiência com a histopatologia e a citopatologia da mucosa esofágica através de biópsias endoscópicas e do esfregaço pelo balão citológico chinês. Porto Alegre, 1992. [Tese - Doutorado - Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul] 214p.
- BLOT, W.J.; DEVESA, S.S.; FRAUMENI Jr., J.F. - Continuing climb in rates of esophageal adenocarcinoma: an update. **J.A.M.A.**, 270:1320, 1993. (letter)
- BREMNER, C.G.; LYNCH, V.P.; ELLIS Jr., F.H. - Barrett's esophagus: congenital or acquired? An experimental study of esophageal mucosal regeneration in the dog. **Surgery**, 68:209-16, 1970.
- BREMNER, R.M.; CROOKES, P.F.; DeMEESTER, T.T.; PETERS, J.H.; STEIN, H.J. - Concentration of refluxed acid and esophageal mucosal injury. **Am. J. Surg.**, 164:522-7, 1992.

- BULAY, O. & MIRVISH, S.S. - Carcinogenesis in rat esophagus by intraperitoneal injection of different doses of methyl-n-amyl nitrosamine. **Cancer Res.**, 39:3644-6, 1979.
- CALETTI, G.C.; FERRARI, A.; FIORINO, S.; BOCUS, P.; BARBARA, L. - Staging of esophageal carcinoma by endoscopy. **Endoscopy**, 25:2-9, 1993.
- CAMERON, A.J.; ZINSMEISTER, A.R.; BALLARD, D.J.; CARNEY, J.A. - Prevalence of columnar-lined (Barrett's) esophagus. Comparison of population - based clinical and autopsy findings. **Gastroenterology**, 99:918-22, 1990.
- CAMERON, A.J. - Epidemiology of Barrett's esophagus. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, 18:D3-D4, 1994.
- CAMPOMENOSI, P.; BOGLIOLO, M.; URBINI, S.; ABBONDANDOLO, A.; FRONZA, G.; GOSPE (Gruppo Operativo Studio Precancerosi Esofagee). - Barrett's metaplasia and p53 gene alterations. In: PERACHIA, A.; ROSATI, R.; BONAVINA, L.; FUMAGALLI, U.; BONA, S.; CHELLA, B.; eds. - **Recent Advances in Diseases of the Esophagus**. Bologna, Monduzzi Editore, 1996. p.825-9.
- CHANDRASOMA, P. - **Patologia Básica**. 1ª ed. Rio de Janeiro, Editora Prentice Hall do Brasil Ltda, 1993 ; p.162-77.
- CHEN, L.H.; BOISSONNEAULT, G.A.; GLAUERT, H.P. - Vitamin C, vitamin E and cancer (review). **Anticancer Res.**, 8:739-48, 1988.
- CHOW, W.H.; FINKLE, W.D.; McLAUGHLIN, J.K.; FRANKL, H.; ZIEL, H.K.; FRAUMENI Jr., J.F. - The relation of gastroesophageal reflux disease and its treatment to adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. **J.A.M.A.**, 274:474-7, 1995.
- CLAPP, N.K. & CRAIG, A.W. - Carcinogenic effects of diethylnitrosamine in RF mice. **J. Nat. Cancer Inst.**, 39:903-16, 1967.

- CLARK, G.W.B.; SMYRK, T.C.; BURDILES, P.; HOEFT, S.F.; PETERS, J.H.; KIYABU, M.; HINDER, R.A.; BREMNER, C.G.; DeMEESTER, T.R. - Is Barrett's metaplasia the source of adenocarcinomas of the cardia? **Arch. Surg.**, 129:609-14, 1994.
- CONIO, M. - Endoscopic features of Barrett's esophagus. **Endoscopy**, 25:642-4, 1993.
- CORREA, P. - Precursors of gastric and esophageal cancer. **Cancer**, 50:2554-65, 1982.
- DAMJANOV, I. & LINDER, J. - **Anderson's Pathology**. 10^a ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1996. 2905p.
- DANIEL, W.W. - **Applied Nonparametric Statistics**. 1^a ed. Boston, Georgia State University, Houghton Mifflin Company, 1978. 503p.
- DAWSEY, S.M.; LEWIN, K.J.; PATH, F.R.C.; WANG, G.Q.; LIU, F.S.; NIEBERG, R.K.; YU, Y.; LI, J.Y.; BLOT, W.J.; LI.B.; TAYLOR, P.R. - Squamous esophageal histology and subsequent risk of squamous cell carcinoma of the esophagus. **Cancer**, 74:1686-92, 1994.
- DeMEESTER, T.R.; ATTWOOD, S.E.A.; SMYRK, T.C.; THERKILDSEN, D.H.; HINDER, R.A. - Surgical therapy in Barrett's esophagus. **Ann. Surg.**, 212:528-42, 1990.
- FLÉJOU, J.F.; MUZEAU, F.; LAGORCE, C.; FÉKÉTÉ, F.; POTET, F. - Carcinogenesis of Barrett's oesophagus: frequent implication of the *p53* tumour suppressor gene, no implication of the k-ras oncogene. In: PERACHIA, A.; ROSATI, R.; BONAVINA, L.; FUMAGALLI, U.; BONA, S.; CHELLA, B.; eds. - **Recent Advances in Diseases of the Esophagus**. Bologna, Monduzzi Editore, 1996. p.813-6.
- GALMICHE, A. & FLÉJOU, J.-F. - Le contrôle du cycle cellulaire. Implications en oncologie digestive. **Hepato-Gastro**, 4:295-9, 1996.
- GHADIRIAN, P.; THOUÉZ, J.P.; SIMARD, A. - La géographie du cancer de l'oesophage. **Soc. Sci. Med.**, 27:971-85, 1988.

- GILLEN, P.; KEELING, P.; BYRNE, P.J.; HEALY, M.; O'MOORE, R.R.; HENNESSY, T.P.J. - Implication of duodenogastric reflux in the pathogenesis of Barrett's oesophagus. **Br. J. Surg.**, 75:540-3, 1988.
- GOTLEY, D.C.; MORGAN, A.P.; COOPER, M.J. - Bile acid concentrations in the refluxate of patients with reflux oesophagitis. **Br. J. Surg.**, 75:587-90, 1988.
- GOTLEY, D.C.; APPLETON, G.V.N.; COOPER, M.J. - Bile acids and trypsin are unimportant in alkaline esophageal reflux. **J. Clin. Gastroenterol.**, 14:2-7, 1992.
- HAMEETEMAN, W.; TYTGAT, G.N.J.; HOUTHOFF, H.J.; TWEEL, J.G. - Barrett's esophagus: development of dysplasia and adenocarcinoma. **Gastroenterology**, 96:1249-56, 1989.
- HARMON, J.W.; JOHNSON, L.F.; MAYDONOVITCH, C.L. - Effects of acid and bile salts on the rabbit esophageal mucosa. **Dig. Dis. Sci.**, 26:65-72, 1981.
- HOEFT, S.F.; STEIN, H.J.; SIEWERT, J.R.; DeMEESTER, T.R. - Gastroduodenal function abnormalities in Barrett's esophagus. In: PERACHIA, A.; ROSATI, R.; BONAVINA, L.; FUMAGALLI, U.; BONA, S.; CHELLA, B.; eds. - **Recent Advances in Diseases of the Esophagus**. Bologna, Monduzzi Editore, 1996. p.797-804.
- HOLLSTEIN, M.C.; PERI, L.; MANDARD, A.M.; WELSH, J.A.; MONTESANO, R.; METCALF, R.A.; BAK, M.; HARRIS, C.C. - Genetic analysis of human esophageal tumors from two high incidence geographic areas: frequent *p53* base substitutions and absence of *ras* mutations. **Cancer Res.**, 51:4102-6, 1991.
- HOLLSTEIN, M.; SHORMER, B.; GREENBLATT, M.; SOUSSI, T.; HOVIG, E.; MONTESANO, R.; HARRIS, C.C. - Somatic point mutations in the *p53* gene of human tumors and cell lines: update compilation. **Nucleic Acids Res.**, 24:141-6, 1996.
- IARC - International Agency for Research Cancer. Human papillomaviruses. **IARC - Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon, World Health Organization, 1995. 409p.

- IFTIKHAR, S.Y.; LEDINGHAM, S.; STEELE, R.J.C.; EVANS, D.F.; LENDRUM, K.; ATKINSON, M.; HARDCASTLE, J.D. - Bile reflux in columnar-lined Barrett's oesophagus. **Ann. Royal Coll. Surg. Engl.**, 75:411-6, 1993.
- IIZUKA, T.; ICHIMURA, S.; KAWACHI, T.; HIROTA, T.; ITABASHI, M. - Carcinoma of the esophagus of rabbits induced with N-methylbenzylamine and sodium nitrite. **Gann**, 68 : 829-35, 1977.
- JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.; LAZARUS, C.; BEYERS, A.; VAN HELDEN, P. - Association of oesophageal cytological abnormalities with vitamin and lipotrope deficiencies in populations at risk for oesophageal cancer. **Anticancer Res.**, 8:711-6, 1988.
- JOHANSSON, F.; JOELSSON, B.; FLORÉN, C.H.; NILSSON, Ä. - Bile salts in the esophagus of patients with esophagitis. **Scand. J. Gastroenterol.**, 23:712-6, 1988.
- KAUER, W.K.H.; PETERS, J.H.; DeMEESTER, T.R.; IRELAND, A.P.; BREMNER, C.G.; HAGEN, J.A. - Mixed reflux of gastric and duodenal juices is more harmful to the esophagus than gastric juice alone. The need for surgical therapy re-emphasized. **Ann. Surg.**, 222:525-33, 1995.
- KIVILAAKSO, E.; FROMM, D.; SILEN, W. - Effect of bile salts and related compounds on isolated esophageal mucosa. **Surgery**, 87:280-5, 1980.
- KRUEL, C.D.P. - Classificação citopatológica das lesões precursoras do carcinoma escamoso do esôfago: modelo experimental em camundongos. São Paulo, 1992. [Tese - Doutorado - Disciplina de Gastroenterologia Cirúrgica da Escola Paulista de Medicina] 103p.
- KRUEL, C.; GURSKI, R.; GOLBERT, L.; DA LUZ, L.; FERREIRA, M.; LEMOS, N. - Effect of thermal injury and the oral administration of diethylnitrosamine in the development of esophageal tumors in mice. In: PERACHIA, A.; ROSATI, R.; BONAVINA, L.; FUMAGALLI, U.; BONA, S.; CHELLA, B.; eds. - **Recent Advances in Diseases of the Esophagus**. Bologna, Monduzzi Editore, 1996a. p.37-40.

- KRUEL, C.D.P.; PROLLA, J.C.; DIEHL, A.S.; PUTTEN, A.C. - A new cytopathological classification of esophageal carcinoma precursor lesions. Experimental model in mice. In: PERACHIA, A.; ROSATI, R.; BONAVINA, L.; FUMAGALLI, U.; BONA, S.; CHELLA, B.; eds. - **Recent Advances in Diseases of the Esophagus**. Bologna, Monduzzi Editore, 1996b. p.127-31.
- LAM, N.S. - Geographical patterns of cancer mortality in China. **Soc. Sci. Med.**, 23:241-7, 1986.
- LAMBERT, R. - Relative importance of biliary and pancreatic secretions in the genesis of esophagitis in rats. **Am. J. Dig. Dis.**, 7:1026-33, 1962.
- LA VECCHIA, C. & NEGRI, E. - The role of alcohol in oesophageal cancer in non-smokers, and of tobacco in non-drinkers. **Int. J. Cancer**, 43:784-5, 1989.
- LEE, R.G. - Dysplasia in Barrett's esophagus. A clinicopathologic study of six patients. **Am. J. Surg. Pathol.**, 9:845-52, 1985.
- LEVER, W. - **Histopathology of the skin**. 8^a ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers Company, 1997. p.762-8.
- LEVISON, D.; HOPWOOD, R.; MORGAN, G.; COGHOLL, G.; MILNE, G.; WORMSLEY, K. - Oesophageal neoplasia in male *Wistar* rats due to parenteral di (2-hydroxypropyl) - nitrosamine (DHPN): a combined histopathological, histochemical and electron microscopic study. **J. Pathol.**, 129 : 31-6, 1979.
- LI, V.; HOST, R.; CARAVEL, J.P.; FOURNET, J.; HOSTEIN, J. - Endobrachyoesophage, reflux gastro-oesophagien acide et reflux duodénogastrique en période inter-digestive et post-prandiale. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, 16:978-83, 1992.
- LIJINSKY, W. - Nitrosamines. In: _____ - **Chemistry and Biology of N-nitroso compounds**. Cambridge, Cambridge Monographs on Cancer Research, 1992. p.14-53.

- LILLEMOE, K.D.; JOHNSON, L.F.; HARMON, J.W. - Alkaline esophagitis: a comparison of the ability of components of gastroduodenal contents to injure the rabbit esophagus. **Gastroenterology**, 85:621-8, 1983.
- MALAFAIA, O. - Tumores do esôfago. In: COELHO, J.C.U.; ed. **Aparelho Digestivo: Clínica e Cirurgia**. Rio de Janeiro, Editora Médica e Científica Ltda, 1990. p.174-88.
- MANDARD, A.M.; MARNAY, J.; HERLIN, P.; ELIE, H.; TUYNS, A.J.; LE TALAER, J.Y. - Cancer de l'oesophage indult chez le rat *Wistar* par l'éthyl-N-Butyl-Nitrosamine. **Bull. Cancer**, 71 : 419-24, 1984.
- McKNIGHT, A.; MANNELL, A.; SHPERLING, I. - The role of carbohydrate antigen 19-9 as a tumor marker of oesophageal cancer. **Br. J. Surg.**, 60:239-51, 1989.
- MELLOW, M.H.; LAYNE, E.A.; LIPMAN, T.O.; KAUSHIK, M.; HOSTETLER, C.; SMITH, J.C. - Plasma zinc and vitamin A in human squamous carcinoma of the esophagus. **Cancer**, 51:1615-20, 1983.
- MIROS, M.; KERLIN, P.; WALKER, N. - Only patients with dysplasia progress to adenocarcinoma in Barrett's oesophagus. **Gut**, 32:1441-6, 1991.
- MIWA, K.; HATTORI, T.; MIYAZAKI, I. - Duodenogastric reflux and foregut carcinogenesis. **Cancer**, 75:1426-32, 1995.
- MOBARHAN, S. - Micronutrient supplementation trials and the reduction of cancer and cerebrovascular incidence and mortality. **Nutr. Rev.**, 52:102-5, 1994.
- MONTESANO, R.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. - Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. **Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)**, 69:225-35, 1996.
- MUNCK-WIKLAND, E.; KUYLENSTIERNA, R.; WAHREN, B.; LINDHOLM, J.; HAGLUND, S. - Tumor markers carcinoembryonic antigen, CA 50, and CA 19-9 and squamous cell carcinoma of the esophagus. Pretreatment screening. **Cancer**, 62:2281-6, 1988.

- MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÈ, X. - Epidemiology of oesophageal cancer. **Europ. J. Gastroenterol. Hepatol.**, 6:649-55, 1994.
- NAPALKOV, N.P. & POZHARISSKI, K.M. - Morphogenesis of experimental tumors of the esophagus. **J. Natl. Cancer Inst.**, 42 : 922-40, 1969.
- NOTANI, P.N. - Role of alcohol in cancers of the upper alimentary tract - use of models in risk assessment. **J. Epidemiol. Community Health**, 42:187-92, 1988.
- ODELEYE, O.E.; ESKELSON, C.D.; MUFTI, S.I.; WATSON, R.R. - Vitamin E protection against nitrosamine-induced esophageal tumor incidence in mice immunocompromised by retroviral infection. **Carcinogenesis**, 13:1811-6, 1992.
- OGASAWARA, S.; MAESAWA, C.; TAMURA, G.; ISHIDA, K.; SATO, N.; IKEDA, K.; SATODATE, R.; SAITO, K. - Loss of heterozygosity on chromosome 3p is associated with the progression of esophageal squamous cell carcinoma. In: PERACHIA, A.; ROSATI, R.; BONAVINA, L.; FUMAGALLI, U.; BONA, S.; CHELLA, B.; eds. - **Recent Advances in Diseases of the Esophagus**. Bologna, Monduzzi Editore, 1996. p.51-5.
- PELLEGRINI, C.A.; DeMEESTER, T.R.; WERNLY, J.A.; JOHNSON, L.F.; SKINNER, D.B. - Alkaline gastroesophageal reflux. **Am. J. Surg.**, 135:177-84, 1978.
- PERA, M.; CARDESA, A.; BOMBI, J.A.; ERNST, H.; PERA, C.; MOHR, U. - Influence of esophagojejunostomy on the induction of adenocarcinoma of the distal esophagus in Sprague-Dawley rats by subcutaneous injection of 2,6-dimethylnitrosomorpholine. **Cancer Res.**, 49:6803-8, 1989.
- PERA, M.; TRASTEK, V.F.; CARPENTER, H.A.; ALLEN, M.S.; DESCHAMPS, C.; PAIROLERO, P.C. - Barrett's esophagus with high-grade dysplasia: an indication for esophagectomy? **Ann. Thorac. Surg.**, 54:199-204, 1992.

- PERA, M.; CAMERON, A.J.; TRASTEK, V.F.; CARPENTER, H.A.; ZINSMEISTER, A.R. - Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. **Gastroenterology**, 104:510-3, 1993a.
- PERA, M.; TRASTEK, V.F.; CARPENTER, H.A.; FERNANDEZ, P.L.; CARDESA, A.; MOHR, U.; PAIROLERO, P.C. - Influence of pancreatic and biliary reflux on the development of esophageal carcinoma. **Ann. Thorac. Surg.**, 55:1386-93, 1993b.
- PERA, M.; TRASTEK, V.F.; PAIROLERO, P.C.; CARDESA, A.; ALLEN, M.S.; DESCHAMPS, C. - Barrett's disease: pathophysiology of metaplasia and adenocarcinoma. **Ann. Thorac. Surg.**, 56:1191-7, 1993c.
- PETERS, F.T.M.; KLEIBEUKER, J.H. - Barrett's oesophagus and carcinoma. **Scand. J. Gastroenterol.**, 28:59-64, 1993.
- POLKOWSKI, W.; VAN LANSCHOT, J.J.B.; TEN KATE, F.J.W.; BAAK, J.P.A.; TYTGAT, G.N.J.; OBERTOP, H.; OFFERHAUS, G.J.A. - The value of *p53* and *ki67* as markers for tumours progression in the Barrett's dysplasia-carcinoma sequence. In: PERACHIA, A.; ROSATI, R.; BONAVINA, L.; FUMAGALLI, U.; BONA, S.; CHELLA, B.; eds. **Recent Advances in Diseases of the Esophagus**. Bologna, Monduzzi Editore, 1996. p.805-11.
- PROLLA, J.C. - Mortalidade por neoplasia associada a tabagismo no Rio Grande do Sul, 1970 - 1989. Porto Alegre, 1992. [Tese - Doutorado - Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul], 99p.
- PROLLA, J.C.; DIETZ, J.; DA COSTA, L.A. - Diferenças geográficas na mortalidade por câncer de esôfago no Rio Grande do Sul. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, 39:217-20, 1993.
- REUBER, M.D. - Histopathology of preneoplastic lesions of the esophagus in BUF rats ingesting diethylnitrosamine. **J. Natl. Cancer Inst.**, 58 : 313-21, 1977.

- RICE, T.W.; FALK, G.W.; ACHKAR, E.; PETRAS, R.E. - Surgical management of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. **Am. J. Gastroenterol.**, 88:1832-6, 1993.
- RISK, J.M.; FIELD, E.A.; FIELD, J.K.; WHITTAKER, J.; FRYER, A.; ELLIS, A.; SHAW, J.M.; FRIEDMANN, P.S.; BISHOP, D.T.; BODMER, J.; LEIGH, I.M. - Tylosis oesophageal cancer mapped. **Nature (Genet.)**, 8:319-21, 1994.
- ROBBINS, S. & COTRAN, R. - **Pathologic basis of disease**. 5^a ed. Philadelphia, Saunders Company, 1994. p.51-92.
- ROSE, E.F.; McGLASHAN, N.D. - The spatial distribution of oesophageal carcinoma in the Transkei, South Africa. **Br. J. Cancer**, 31:197-206, 1975.
- ROSE, E.F.; FELLINGHAM, S.A. - Cancer patterns in Transkei. **S. Afr. J. Sci.**, 72:555-61, 1981.
- ROSEN, N. - The molecular basis for cellular transformation: implications for esophageal carcinogenesis. **Semin. Oncol.**, 21:416-24, 1994.
- ROTH, J.A. - The cell and molecular biology of esophageal carcinoma. **Chest Surg. Clin. North Amer.**, 4:205-16, 1994.
- RUBIO, C.A. - Experimental models. In: PFEIFFER, C.J.; ed. **Cancer of the esophagus**. U.S.A., CRC Press, 1982. v. III. p.21-42.
- RUBIO, C.A. - Epithelial lesions antedating oesophageal carcinoma. I: Histologic study in mice. **Path. Res. Pract.**, 176:269-75, 1983.
- RUBIO, C.A.; LIU, F.; CHEJFEC, G.; SVEANDER, M. - The induction of esophageal tumors in mice: dose and time dependency. **In Vivo**, 1 : 35-8, 1987.
- RUBIO, C.A. - Post-carcinogen interval in carcinogenesis. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, 24:499-500, 1988.

- RUBIO, C.A.; LIU, F.S.; ZHAO, H.Z. - Histological classification of intraepithelial neoplasias and microinvasive squamous carcinoma of the esophagus. **Am. J. Surg. Pathol.**, 13:685-90, 1989.
- SALO, J.A.; LEHTO, V.P.; KIVILAAKSO, E. - Morphological alterations in experimental esophagitis. Light microscopic and scanning and transmission electron microscopic study. **Dig. Dis. Sci.**, 28:440-8, 1983.
- SASAJIMA, K.; KAWACHI, T.; SANO, T. - Esophageal and gastric cancers which metastases induced in dogs by N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. **J. Natl. Cancer Inst.**, 58 : 1789-94, 1977.
- SCHIRMER C.C. - Eficácia da tomografia axial computadorizada na avaliação do comprometimento da traquéia e brônquios principais em pacientes com carcinoma epidermóide do esôfago: estudo clínico. Porto Alegre, 1995. [Tese - Mestrado - Curso de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul], 101p.
- SCHMID, B.; DeTARNOWSKY, G.; LAYDEN, T. - Alkaline gastroesophageal reflux-role in esophageal injury. **Gastroenterology**, 80:1275, 1981.
- SETO, Y.; KOBORI, O.; SHIMIZU, T.; MORIOKA, Y. - The role of alkaline reflux in esophageal carcinogenesis induced by N-amyl-N-methylnitrosamine in rats. **Int. J. Cancer**, 49:758-63, 1991.
- SINGH, S.; BRADLEY, L.A.; RICHTER, J.E. - Determinants of esophageal "alkaline" pH environment in controls and patients with gastro-oesophageal reflux disease. **Gut**, 34:309-16, 1993.
- SPECHLER, S.J. & GOYAL, R.K. - Barrett's esophagus. **N. Engl. J. Med.**, 315:362-71, 1986.
- SPECHLER, S.J. - The frequency of esophageal cancer in patients with Barrett's esophagus. **Acta Endoscop.**, 22:541-4, 1992.
- SPECHLER, S.J. - Barrett's esophagus. **Semin. Oncol.**, 21:431-7, 1994a.

- SPECHLER, S.J.; ZEROOGIAN, J.M.; ANTONIOLI, D.A.; WANG, H.H.; GOYAL, R.K. - Prevalence of metaplasia at the gastro-oesophageal junction. **Lancet**, 344:1533-6, 1994b.
- SPECHLER, S.J. - Barrett's esophagus. **Semin. Gastrointest. Dis.**, 7:51-60, 1996.
- STEIN, H.J.; BARLOW, A.P.; DeMEESTER, T.R.; HINDER, R.A. - Complications of gastroesophageal reflux disease. Role of the lower esophageal sphincter, esophageal acid and acid/alkaline exposure, and duodenogastric reflux. **Ann. Surg.**, 216:35-43, 1992.
- STEMMERMANN, G.; HEFFELFINGER, S.C.; NOFFSINGER, A.; HUI, Y.Z.; MILLER, M.A.; FENOGLIO-PREISER, C.M. - The molecular biology of esophageal and gastric cancer and their precursors: oncogenes, tumor suppressor genes, and growth factors. **Hum. Pathol.**, 25:968-81, 1994.
- STERNBERG, S.S.; ANTONIOLI, D.A.; CARTER, D.; MILLS, S.E.; OBERMAN, H.A. - **Diagnostic Surgical Pathology**. 2^a ed. New York, Raven Press, 1994. 2328p.
- STINSON, S.F.; SQUIRE, R.A.; SPORN, M.B. - Pathology of esophageal neoplasms and associated proliferative lesions induced in rats by N-methyl-n-benzilnitrosamine. **J. Natl. Cancer Inst.**, 61 : 1471-5, 1978.
- STINSON, S.F. - Esophageal carcinoma. Animal model: esophageal in the rat induced with methylalkyl-nitrosamines. **Amer. J. Pathol.**, 96 : 871-4, 1979.
- THOMAS, R.M. & SOBIN, L.H. - Gastrointestinal cancer. **Cancer (suppl)**, 75:154-70, 1995.
- VAEZI, M.F. & RICHTER, J.E. - Synergism of acid and duodenogastroesophageal reflux in complicated Barrett's esophagus. **Surgery**, 117:699-704, 1995a.
- VAEZI, M.F.; SINGH, S.; RICHTER, J.E. - Role of acid and duodenogastric reflux in esophageal mucosal injury: a review of animal and human studies. **Gastroenterology**, 108:1897-907, 1995b.

- VICTORA, C.G.; MUÑOZ, N.; DAY, N.E.; BARCELOS, L.B.; PECCIN, D.A.; BRAGA, N.M. - Hot beverages and oesophageal cancer in Southern Brazil: a case-control study. **Int. J. Cancer**, 39:710-6, 1987.
- WAHRENDORF, J.; CHANG-CLAUDE, J.; LIANG, Q.S.; REI, Y.G.; MUÑOZ, N.; CRESPI, M.; RAEDSCH, R.; THURNHAM, D.; CORREA, P. - Precursor lesions of oesophageal cancer in young people in a high-risk population in China. **Lancet**, 8674:1239-41, 1989.
- WARWICK, G.P. & HARINGTON, J.S. - Some aspects of the epidemiology and etiology of esophageal cancer with particular emphasis on the Transkei, South Africa. **Adv. Cancer Res. (IARC)**, 17:81-229, 1973.
- YANG, C.S. - Research on esophageal cancer in China: a review. **Cancer Res.**, 40 : 2633-44, 1980.
- YANG, P.C. & DAVIS, S. - Incidence of cancer of the esophagus in the US by histologic type. **Cancer**, 61:612-7, 1988.
- YIORIS, N.; IVANKOVIC, S.; LEHNERT, T. - Effect of thermal injury and oral administration of N-methyl-N⁷-nitro-N-nitrosoguanidine on the development of esophageal tumors in *Wistar* rats. **Oncology**, 41:36-8, 1984.
- YU, M.C.; GARABRANT, D.H.; PETERS, J.M.; MACK, T.M. - Tobacco, alcohol, diet, occupation, and carcinoma of the esophagus. **Cancer Res.**, 48:3843-8, 1988.
- ZARIDZE, D.G.; KUVSHINOV, Yu.P.; KHOJAYEVA, M.Kh.; PARSHIKOVA, S.M.; PODDUBNY, B.K.; ROTTENBERG, V.I.; TRAPEZNIKOV, N.N. - Results of examination of a population living in a region with high incidence of esophageal cancer: premalignant lesions of esophageal mucosa. **Vopr-Onkol**, 32:36-40, 1986.

ZENG, L.Q. & ZENG, Y.F. - Epidemiology of cancer of esophagus in the people's Republic of China. In: PERACHIA, A.; ROSATI, R.; BONAVINA, L.; FUMAGALLI, U.; BONA, S.; CHELLA, B.; eds. - **Recent Advances in Diseases of the Esophagus**. Bologna, Monduzzi Editore, 1996. p.3-10.

ABSTRACT

Human and animal studies indicate that esophageal exposure to duodenal and gastric contents may be important in the development of Barrett's esophagus and its complications, including adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Diethylnitrosamine (DEN) is a carcinogen that develops squamous cell carcinoma in the esophagus of mouse. The aim of this study was to evaluate the effect of the reflux gastroduodenal and gastric contents in induction of esophageal carcinogenesis. Reflux of gastroesophageal (GER) and gastroduodeno-esophageal (GDER) contents were produced by cardioplasty and esophagoduodenostomy, with suture of the cardia and gastric preservation, respectively. The carcinogen was DEN in drinking water, 3 days a week in 20 weeks. 100 female *Wistar* rats were divided in 6 groups. Group 1 (18 rats): cardioplasty without DEN; Group 2 (18 rats): esophagoduodenostomy without DEN; Group 3 (10 rats): only water; Group 4 (17 rats): cardioplasty with DEN; Group 5 (17 rats): esophagoduodenostomy with DEN and Group 6 (20 rats): only DEN. GER alone induced papillomatosis or ulcer in 22.2% of rats, and when associated with DEN in 47.1%. GDER alone induced severe esophagitis, papillomatosis or ulcer in 61.1% of rats, Barrett's esophagus in 16.7%, and esophagus adenocarcinoma in 16.7%; when associated with DEN, induced severe esophagitis, papillomatosis or ulcer in 23.5%, while 76.5% evolved to esophagus carcinoma, which squamous cell carcinoma was in 70.6% and adenocarcinoma in 5.9%. Rats that drank only water did not present histologic alterations of esophagus mucosa. Rats that drank DEN induced papillomatosis in 50.0% and did not present histologic alterations in 50.0%. Did not occur mild or severe dysplasia in another group. We concluded that: 1) GDER is statistically significant more harmful to the esophagus mucosa than GER; 2) in this study, GER did not demonstrate carcinogenic potential in the esophagus; 3) GDER alone is an esophagus carcinogen, inducing Barrett's esophagus and esophagus adenocarcinoma; 4) the potential carcinogenesis of GDER is potentialized by DEN, inducing squamous cell carcinoma of esophagus; 5) in this study, DEN alone did not induce tumors in rat's esophagus.

KEY WORDS: Gastroduodeno-esophageal reflux
Gastroesophageal reflux
Experimental esophageal carcinogenesis
Diethylnitrosamina
Squamous cell carcinoma of esophagus
Esophagus adenocarcinoma