

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Cirurgia**

**O envolvimento do marcador inflamatório Heme Oxigenase-1 na  
carcinogênese experimental de esôfago**

**Aluno : Cleber Rosito Pinto Kruehl**

**Orientador : Prof.Dr. Cleber Dario Pinto Kruehl**

**Co-orientadora : Profa. Dra. Marta Sampaio de Freitas**

**Dissertação de Mestrado**

**2004**

**K67o KrueI, Cleber Rosito Pinto**

O envolvimento do marcador inflamatório Heme Oxigenase-1 na carcinogênese experimental de esôfago / Cleber Rosito Pinto KrueI; orient. Cleber Dario Pinto KrueI; co-orient. Marta Sampaio de Freitas. Porto Alegre, UFRGS, 2004.

93 p.: il. tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas : Cirurgia.

1. BIOLOGIA MOLECULAR. 2 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR. 3. NEOPLASIAS ESOFÁGICAS. 4. CARCINOMA DE ESÔFAGO. 5. MARCADORES INFLAMATÓRIOS. 6. HEME OXIGENASE-1. 7. INFLAMAÇÃO. 8. MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DO REFLUXO.  
I. KrueI, Cleber Dario Pinto. II. Freitas, Marta Sampaio de. III. Título.

C.D.D. 616.9943

C.D.U. 616.329-006:577.2(043.3)

**“Se enxerguei além dos outros é porque estava nos teus ombros gigantes”**

**Isaac Newton**

**“Quem estuda e não pratica o que aprendeu é como um homem que lava e não semeia”**

**Provérbio árabe**

**“Não tenha medo de crescer lentamente, tenha medo apenas de ficar parado”**

**Provérbio Chinês**

**Aos meus pais Cleber e Inês , exemplos de pessoas sempre em busca de novos desafios e que são responsáveis pela pessoa que sou hoje.**

**A minha querida Carolina, pela sua paciência, compreensão, carinho e estímulo, que me foram fundamentais para seguir trabalhando.**

**A minhas irmãs, Juliana e Letícia, e a toda minha família pelos os exemplos de perseverança e a de busca de aperfeiçoamento profissional.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto(Universidade Estadual do Rio de Janeiro-UERJ), pela amizade e pelo exemplo de ser um pesquisador comprometido em melhorar as condições de vida do ser humano.

À Profa. Dra. Marta Sampaio de Freitas(UERJ), pela inestimável contribuição na execução orientação durante o trabalho.

Às colegas da UERJ, Marta,Natália,Sílvia e Fabiana que me receberam com carinho e atenção durante a minha estadia no Rio de Janeiro.

Ao Prof.Dr. Sérgio Gabriel da Silva Barros por acreditar na minha capacidade como pesquisador e pelo constante estímulo científico.

À Profa.Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss, pela atenção que teve comigo no sentido de me ajudar o finalizar essa etapa.

Ao amigo e colega, Dr Aljamir Duarte Chedid , um exemplo de cirurgião com que tive a prazer de trabalhar nesses últimos anos.

Ao amigo e colega, Levi Lourenço Melo, que me cedeu o material de sua dissertação de mestrado sem o qual esse trabalho não seria possível.

Ao Prof. Carlos Herédia Antunes, pela forma abrangente e humana com que sempre me fez enxergar a medicina.

Aos amigos cirurgiões Carlos Cauduro Schirmer , Richard Ricachenevsky Gurski,André Rosa, Leandro Totti Cavazzola pelo exemplo como pesquisadores e cirurgiões nesses anos de convívio.

À família Colman-Alboim , pelo apoio e pelo carinho destinados a mim.

Ao Doutorando Márcio Chedid pelo auxílio na confecção de materiais apresentados em congressos.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia: Estela Maris Emer Araipe pela presteza e competência demonstrada.

<b>SUMÁRIO</b>	<b>Página</b>
<b>Ficha catalográfica</b>	<b>2</b>
<b>Agradecimentos</b>	<b>5-6</b>
<b>Sumário</b>	<b>7-8</b>
<b>Resumo</b>	<b>9-10</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>12-23</b>
<b>1.1. Considerações Gerais</b>	
<b>1.2. O processo inflamatório e a carcinogênese</b>	
<b>1.3. Heme oxigenase-1 (HO-1), estresse oxidativo e     câncer</b>	
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>25-31</b>
<b>3.1. Animais e ambiente de experimentação</b>	
<b>3.2. Delineamento</b>	
<b>3.3. Modelo experimental</b>	
3.3.1. Modelos animais de indução de carcinoma e refluxo	
3.3.2. Cirurgia	
3.3.2.1. <i>Técnica cirúrgica da cardioplastia (Grupos 1 e 4) - Modelo de refluxo gastroesofágico</i>	

3.3.2.2. *Técnica cirúrgica da esofagoduodenostomia*  
(Grupos 2 e 5) – *Modelo de refluxo gastroduodeno-esofágico*

**3.4. Histopatologia**

**3.5. Imunofluorescência**

**3.6 Análise Estatística**

<b>4. RESULTADOS</b>	<b>32-39</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>40-44</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>45</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>46-50</b>
<b>8. ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS</b>	<b>51-71</b>
<b>9. ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS</b>	<b>72-94</b>



## **Resumo**

Sabe-se que o refluxo crônico pode induzir lesão mucosa, estimular a proliferação de células e promover tumorigênese no esôfago distal. Ainda não é sabido por que apenas uma parcela dos pacientes com refluxo esofágico progrediram para uma metaplasia intestinal (Esôfago de Barrett) e adenocarcinoma. O estresse oxidativo parece exercer um papel importante nessa progressão. Assim sendo, examinamos o padrão de expressão da enzima Heme Oxigenase-1 (HO-1), enzima indutora do estresse oxidativo, em peças de esôfago obtidos de um estudo experimental com ratos que avaliou o papel do refluxo gástrico e duodeno-esofágico na carcinogênese esofágica.

**Métodos:** Uma amostra de três (3) peças de esôfago de cada grupo de ratos submetidos a tratamentos diferentes tiveram a expressão da enzima Heme Oxigenase-1 avaliada através de imunohistoquímica. Os ratos foram divididos nos seguintes grupos: (1) cardioplastia para induzir refluxo predominantemente gástrico, (2) anastomose esofagoduodenal para induzir refluxo duodenal, (3) sem tratamento, (4) cardioplastia+dietilnitrosamina (DEN), (5) anastomose esofagoduodenal +DEN, (6) DEN.

**Resultados:** Não houve desenvolvimento de câncer ou metaplasia intestinal nos animais que não foram expostos ao refluxo de conteúdo duodenal. A expressão de HO-1 foi observada apenas em ratos submetidos à anastomose esofagoduodenal (Grupos 2 e 5) e a análise da média de intensidade de

fluorescência demonstrou uma diferença significativa de expressão de HO-1 (4,8 e 4,6 vezes respectivamente) comparando-se ao controle (Grupo 3) ( $p < 0,05$ ). O alvo principal para expressão da HO-1 foram as células inflamatórias dentro do tumor ou em áreas subepiteliais. Os ratos expostos ao refluxo gástrico não desenvolveram tumores ou expressaram a HO-1.

Conclusões: A esofagite de refluxo induzida por refluxo esofágico com conteúdo duodenal provocou estresse oxidativo considerável e pode desempenhar um papel importante na carcinogênese esofágica. O refluxo gástrico não foi suficiente para induzir estresse oxidativo neste modelo experimental.

Unitermos: esôfago, heme oxigenase-1, câncer, inflamação, modelos experimentais de refluxo.

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> – Reação Enzimática de heme-oxigenase (HO)	20
<b>Figura 2</b> – Modelo de cardioplastia	27
<b>Figura 3</b> - Modelo de esofagoduodenostomia	28
<b>Figura 4</b> - Epitélio esofágico sem alterações histopatológicas com marcação inespecífica da fluorescência na queratina	33
<b>Figura 5</b> - Intensidade média de fluorescência nos diferentes grupos estudados .	33
<b>Figura 6</b> - Microfotografia do HE e da imunofluorescência do epitélio esofágico com hiperplasia em animal exposto e refluxo gástrico+DEN.	35
<b>Figura 7</b> – Epitélio escamoso do esôfago com esofagite e erosão adjacente. Imagens em HE e imunofluorescência, contendo marcação nas células inflamatórias.	36
<b>Figura 8</b> – Microfotografia do HE e da imunofluorescência de adenocarcinoma com marcação histoquímica principalmente no conglomerado de células inflamatórias.	37
<b>Figura 9</b> - Intensa marcação de fluorescência em epitélio contendo Inflamação de um animal que desenvolveu carcinoma epidermóide	38
<b>Figura 10</b> - Área de erosão epitelial com marcação para HO-1 em animal exposto ao refluxo duodenal	39

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Considerações Gerais**

O carcinoma de esôfago representa aproximadamente 1% de todas as neoplasias malignas e 4% das neoplasias do trato gastrintestinal sendo dividido em dois tipos histopatológicos: o epidermóide, mais freqüente no terço médio do esôfago, e o adenocarcinoma, mais comum no terço distal (Greenlee et al, 2001).

Esta neoplasia caracteriza-se por apresentar grande variabilidade em sua incidência, inclusive dentro de uma mesma microrregião, o que demonstra que fatores ambientais devem contribuir de forma decisiva em sua gênese. O adenocarcinoma tem ganhado cada vez mais importância em alguns países ocidentais. Nos EUA, a incidência de adenocarcinoma da junção esofagogástrica triplicou entre os anos de 1976 e 1990 e atualmente corresponde a mais de 50 % dos casos ( Kirby et al,1994). No Brasil, o carcinoma de esôfago está em quarto lugar entre as causas de morte por tumores, e o tipo histológico epidermóide ainda é o mais freqüente. No Rio Grande do Sul, essa é uma das neoplasias malignas mais freqüentes, com uma taxa de mortalidade de 13,1 mortes/100.000 habitantes/ano, superada apenas pelo câncer de pulmão entre as causas de morte por câncer, superando inclusive o câncer de próstata (Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, 2002). Os altos índices, do nosso estado, se devem principalmente a predominância do tipo histológico epidermóide (Rosa ARP et al, 1999).

Os pacientes com carcinoma de esôfago são referendados em quase sua totalidade com disfagia e perda de peso. Estes sintomas normalmente caracterizam o processo avançado da doença (Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, 2002, Lightdale CJ, 1999). Quando chegam a apresentar tais sintomas, apenas 50% dos pacientes são submetidos a procedimentos com intenção curativa, levando-se em conta serviços de referência com especial interesse nesta neoplasia (Rosa ARP et al, 1999).

A doença do refluxo gastroesofágico é um fator determinante para o desenvolvimento do adenocarcinoma de esôfago. Quando os sintomas de pirose e regurgitação estão presentes uma vez na semana, o risco de desenvolver esse tipo de câncer se eleva em 8 vezes (DeMeester SR et al, 2001). Tanto evidências clínicas como experimentais indicam que a presença de bile no conteúdo refluído, além de causar maior dano ao epitélio esofágico quando comparado ao refluxo não biliar, constitui um importante fator de risco para o desenvolvimento de esôfago de Barrett (substituição do epitélio esofágico por um epitélio colunar metaplásico) (Werner KH et al, 1995, Pera M et al, 1993, Melo LL et al, 1999). Uma vez confirmado através de biópsia o diagnóstico de esôfago de Barrett, o risco de desenvolver adenocarcinoma de esôfago aumenta em 30-40 vezes (Reid B, 1991). No entanto, o processo pelo qual o refluxo biliar favorece a progressão do epitélio normal até o desenvolvimento do adenocarcinoma ainda não foi suficientemente esclarecido.

A relação entre a doença do refluxo gastroesofágico e o carcinoma epidermóide de esôfago ainda não está estabelecida. Estudos utilizando modelos

experimentais com ratos têm demonstrado que o refluxo crônico de conteúdo duodenal no esôfago é capaz de atuar como co-carcinógeno para o desenvolvimento de carcinoma do tipo epidermóide, em modelos nos quais um carcinógeno é administrado simultaneamente à indução cirúrgica de refluxo duodenal (Melo LL et al 1999, Pera M et al, 1989). Além disso, também foi demonstrado que ratos expostos exclusivamente ao refluxo duodenal de forma crônica acabam desenvolvendo três tipos de carcinoma de esôfago: epidermóide ou escamoso, adenoescamoso e adenocarcinoma (Goldstein SR et al, 1997, Pera M et al, 2000). Embora os estudos experimentais tenham apontado o refluxo biliar como um fator facilitador no processo de carcinogênese do tipo epidermóide, as evidências epidemiológicas clínicas demonstram que a doença do refluxo gastroesofágico não é um fator de risco para desenvolvimento do carcinoma epidermóide (Enzinger PC et al, 2003).

A biologia celular e molecular tem ganhado cada vez mais destaque nos estudos relacionados com o desenvolvimento do carcinoma de esôfago. O desenvolvimento do adenocarcinoma de esôfago, como a maioria das neoplasias malignas, resulta da interação entre o componente hereditário e influências externas, que em indivíduos predispostos podem ocasionar alterações genéticas que influenciam o controle da diferenciação e crescimento celular. Um dos fatores externos mais estudados na gênese do adenocarcinoma de esôfago é a presença de bile no conteúdo refluído. A bile, além de causar mais dano ao epitélio, está associada com uma expressão elevada de enzimas pró-inflamatórias da mucosa esofágica: ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzida (iNOS), heme

oxigenase-1 (HO-1) (Chen X et al, 2000, Shirvani VN et al, 2000, Zhang F et al, 2001, Fang J et al, 2004). Foi demonstrado que a prevalência de expressão da COX-2 aumenta à medida que evolui a seqüência epitélio normal-metaplasia-displasia-câncer (Morris CD et al, 2001), sugerindo que o processo inicial da carcinogênese possa estar intimamente relacionado com o processo de inflamação crônica e conseqüente atividade aumentada das enzimas moduladoras da resposta inflamatória (Jang TJ et al, 2004, Zimmermann KC et al 1999, Jenkins GJS et al, 2002, Wilson K T, 2002).

## **1.2. O processo inflamatório e a carcinogênese**

Desde a Idade Antiga se suspeitava que as substâncias envolvidas na inflamação também estavam presentes nos tumores. Galeno, baseado em conceitos de Hipócrates, escreveu o livro “De tumoribus” (Vigliani R, 1995). Nesta obra podemos encontrar as primeiras teorias sistemáticas sobre a gênese do câncer e a sua relação com a inflamação. Segundo Galeno a origem do câncer poderia ser explicada da seguinte forma: “A bile negra sem ser fervida causa cânceres e , se acontece de ser mais ácida, surgem os tumores com machucado (úlceras). Por essa razão que os cânceres são mais escuros e menos quentes que as inflamações. Os vasos são mais cheios e mais extensos que nos processos inflamatórios, porque o humor que causa o câncer não extravasa dos vasos para o tecido circundante devido a sua espessura”.

De acordo com as palavras acima, Galeno já imaginava que a mesma substância (humor) que promovia a angiogênese nos processos inflamatórios também era responsável pela formação de neovasos tumorais, e a explicação encontrada para justificar tal fenômeno era a de que a espessura do tumor não permitia o extravasamento desse humor.

Atualmente sabe-se que aproximadamente 18% de todos os cânceres no mundo são atribuídos a infecções virais (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1994., IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1995, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1997). Uma outra grande parcela está intimamente relacionada a processos inflamatórios crônicos secundários a agentes físicos e químicos (calor, radiação ultravioleta, ácido, corpo estranho) que comprovadamente aumentam o risco de câncer (Ohshima H et al,2003). Entre as neoplasias malignas que apresentam relação importante com processos inflamatórios pré-existentes podemos destacar os carcinomas de esôfago, estômago, cólon, pulmão, vias biliares, pele e fígado (El-Omar EM et al, 2003, Ballaz S et al, 2003, Normark S et al, 2003, Nakamoto Y et al, 2003, Andoh H et al, 2004). Conseqüentemente é atribuída aos processos inflamatórios e infecciosos uma significativa parcela de responsabilidade pelo número de casos de câncer no mundo. Ainda não se conhecem em detalhes os mecanismos moleculares envolvidos no processo inflamatório e na infecção crônica que aumentam o risco para o desenvolvimento do câncer.



Um dos mecanismos que fazem com que a inflamação crônica aumente o risco de câncer é elevação da concentração de prostaglandinas no local. As prostaglandinas, em especial a prostaglandina E2, têm capacidade de induzir alterações malignas nas células epiteliais através da imunossupressão, inibição da apoptose e promoção da angiogênese (DeWitt DL, 1991, Tsujii M et al, 1998).

Outro mecanismo, que também induz a carcinogênese à partir de processos inflamatórios crônicos, é a produção excessiva de radicais livres de oxigênio e de nitrogênio. As células responsáveis pela resposta inflamatória, no momento em que são estimuladas, ativam enzimas como a NADPH oxidase, iNOS, mieloperoxidase e a peroxidase eosinofílica. Essas enzimas produzem compostos de grande potencial oxidativo, dentre os quais destacam-se o óxido nítrico (NO), o dióxido de nitrogênio e o peróxido de hidrogênio, que têm como função combater agentes agressores (vírus, bactéria, fungo ou corpo estranho). No entanto, esses compostos, quando em excesso, acabam lesando o DNA através da reação com outros compostos gerando radicais livres extremamente mutagênicos e reativos, os peroxinitritos (Ohshima H et al,2003 ).Os peroxinitritos são substâncias com grande potencial carcinogênico que, quando expostos aos tecidos por longo tempo, acabam facilitando o desenvolvimento das células cancerosas no local (Ohshima H et al,2003).

### 1.3. Heme oxigenase-1 (HO-1), estresse oxidativo e câncer

Um dos mecanismos pelo qual o refluxo causa dano no epitélio esofágico é através da geração de espécies reativas de oxigênio (Wetscher GJ et al, 1997). A agressão decorrente dos radicais livres é conhecida como estresse oxidativo. O estresse oxidativo é resultado do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) como o ânion superóxido( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas. Essas moléculas são compostos oxidantes que constantemente são produzidas *in vivo* em condições fisiológicas, e têm como funções a sinalização do crescimento celular e a manutenção do estado reduzido das células (Cejas P et al, 2004). No momento em que um determinado tecido sofre um estímulo inflamatório, há recrutamento de células inflamatórias que induzem enzimas geradoras de Espécies Reativas de Oxigênio(ERO) (Ohshima H et al, 2003). Quando a inflamação é crônica e contínua pode ocorrer acúmulo desses compostos oxidativos que lesam o DNA através da peroxidação de lipídios(Cejas P et al, 2004).

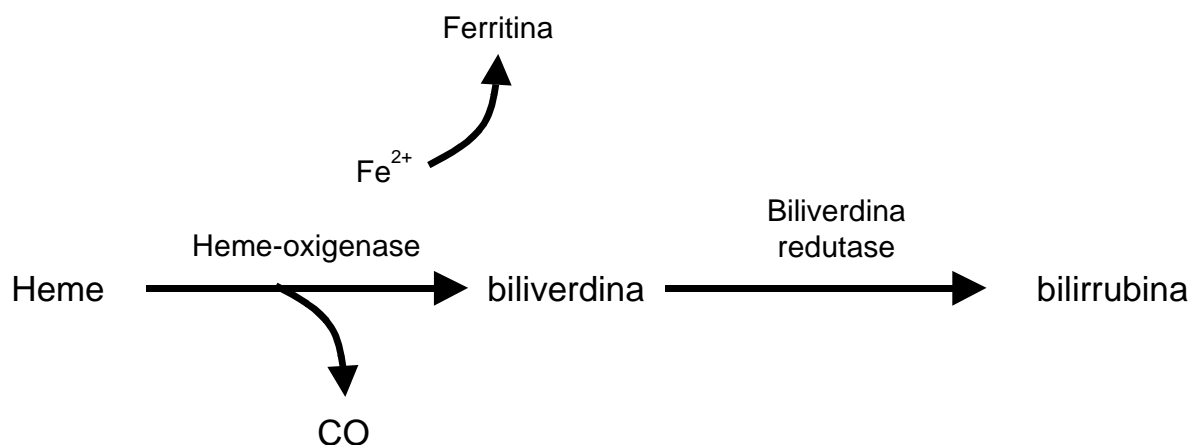
Uma das maneiras de se identificar se o tecido está submetido a um intenso estresse oxidativo é através da verificação da expressão e atividade enzimática da HO-1. A HO-1 é uma enzima com propriedades antioxidantes e em situação

fisiológica ela não é expressa, porém em situações de agressão (estresse oxidativo) ela pode ser induzida tendo como sua principal função manter a homeostase celular. Nessas situações a expressão tecidual para HO-1 se constitui num marcador indireto para estresse oxidativo (Morse D et al, 2002, Wagener FATG et al, 2003).

As células do epitélio esofágico, quando expostas a um intenso estresse oxidativo, diminuem a capacidade de cicatrização, aumentam a angiogênese e a probabilidade do epitélio evoluir para metaplasia ou adenocarcinoma (Chen X et al, 2000, Lee JS et al, 2001, Sihvo EIT et al, 2003). Superóxido dismutases, catalases e peroxidases são algumas das enzimas antioxidantes que protegem as células dos efeitos tóxicos do oxigênio. Recentemente, a HO-1 vem sendo apontada como uma das principais enzimas responsável pela homeostase celular através de sua importante ação antioxidante (Morse D et al, 2002).

Até o momento, três isoformas de HO foram identificadas: heme oxigenase-1 (HO-1), heme oxigenase-2 (HO-2) e heme oxigenase-3 (HO-3). Elas são produtos de diferentes genes e a expressão de cada isoforma varia de acordo com o órgão, o tipo celular e a regulação. A HO-1 é a isoforma que é capaz de ser induzida por diversas formas de estímulos (metais pesados, hipóxia, hiperóxia, radiação UV, citocinas entre outros). A expressão gênica da HO-1 está fortemente relacionada com a exposição celular a substâncias que geram estresse oxidativo. A HO-2 é a isoforma constitutiva da enzima e é intensamente expressa nos testículos e cérebro em condições normais. A HO-3 apresenta estrutura similar a HO-2, porém sua ação é menos intensa no metabolismo do heme (Wagener

FATG et al, 2003). O acúmulo intracelular da molécula heme nos tecidos lesados é uma resposta fisiológica do organismo, que tem como objetivo recrutar células para iniciar o processo inflamatório. No entanto, o excesso da molécula heme pode causar grande estresse oxidativo e, nessas circunstâncias, a enzima HO atua degradando o molécula heme em três compostos com atividade antioxidante: a bilirrubina, o monóxido de carbono (CO) . (Wagener FATG et al, 2003) (Figura 1).



**Figura 1 – Reação Enzimática de heme-oxigenase (HO)**

A HO-1 é uma enzima de 32 kDa e sua atividade intracelular está localizada nos microsomas. Em condições fisiológicas, a maioria das células apresenta níveis muito baixos ou indetectáveis da proteína HO-1. O baço é o único órgão no qual a enzima HO-1 é a isoforma predominante em situações fisiológicas (Wagener FATG et al, 2003). Quando as células sofrem estímulos que aumentam a concentração da molécula heme intracelular, existe uma resposta adaptativa na

qual há indução da HO-1. A indução da HO-1 confere proteção contra o estresse oxidativo diminuindo a concentração do heme (pró-oxidante) e aumentando a concentração de substâncias anti-oxidantes (bilirrubina e CO). Assim, através da degradação da molécula heme, as células mantêm a homeostase e aumentam a capacidade de resistir a agressão nas situações de isquemia-reperfusão, estresse oxidativo, apoptose, inflamação e rejeição por transplante (Morse D et al, 2002, Wagener FATG et al, 2003).

Tem sido demonstrado que as células deficientes de HO-1 apresentam pouca capacidade de defesa contra o dano oxidativo. Fibroblastos com deficiência de HO-1 expostos a substâncias oxidantes apresentaram uma sobrevida menor quando comparado a fibroblastos expressando HO-1 (Poss KD et al 1997 ). Em modelos experimentais de transplante de tireóide e fígado, os enxertos com capacidade de elevar a expressão da HO-1 apresentaram uma sobrevida maior do que àqueles que não expressam a enzima (Niimi M et al, 2000, Yang ZF et al, 2004). Na área clínica também foi evidenciado que a deficiência da HO-1 está envolvida na diminuição das defesas do organismo contra a inflamação. O primeiro caso descrito de um paciente com deficiência congênita de HO-1 foi de um menino que morreu aos seis anos de idade com sérios problemas e complicações secundárias a processos inflamatórios crônicos (Wagener FATG et al, 2003).

No entanto, existem situações nas quais o excesso de atividade da HO-1 pode aumentar o efeito oxidativo em vez de diminuí-lo. Tanto o  $Fe^{2+}$  quanto a bilirrubina podem exercer efeitos tóxicos se acumularem em excesso no

citoplasma. Quando a produção de  $Fe^{2+}$  ultrapassa o limite de redução exercido pela ferritina intracelular, esse acúmulo pode resultar em grande atividade oxidante (Bauer M et al, 2002). A bilirrubina, por sua vez, apresenta uma estreita janela de concentração, na qual ela atua como antioxidante. Caso essa janela seja ultrapassada, as propriedades tóxicas da bilirrubina predominam, constituindo-se um exemplo clássico o dano neuronal que ocorre em neonatos com hiperbilirrubinemia (Bauer M et al, 2002).

A relação entre a elevação da HO-1 e as neoplasias malignas está começando a ser estabelecida. As células cancerosas ao expressarem a HO-1 diminuem a capacidade do organismo em destruí-las acompanhado de um aumento da atividade anti-apoptótica e angiogênica (Wagener FATG et al, 2003). Várias células tumorais com alta capacidade proliferativa expressam de forma elevada a HO-1, incluindo adenocarcinoma renal, hepatoma, carcinoma de células escamosas e glioblastoma (Goodman AI et al, 1997, Nishe A et al, 1999, Matsumoto A et al, 1998). No adenocarcinoma de pâncreas, a expressão elevada da HO-1 foi responsável pelo aumento da angiogênese e um maior potencial metastático (Sunamura M et al, 2003). Os tumores epiteliais, como o carcinoma escamoso de cavidade oral, também apresentam expressão elevada da HO-1, principalmente nas células mais diferenciadas (Tsuji MH et al, 1999).

Em relação ao desenvolvimento do adenocarcinoma de esôfago, existem evidências de que o nível de estresse oxidativo cresce a medida que a doença do refluxo evolui na seqüência esofagite-metaplasia-adenocarcinoma (Sihvo EIT et al, 2003). Um estudo utilizando um modelo experimental de indução de

adenocarcinoma de esôfago em ratos demonstrou que a expressão da HO-1 foi maior entre os animais submetidos ao refluxo duodenogástrico, e esses animais apresentaram mais tumores quando comparados aos grupos controles (Chen X et al, 2000). Esses dados sugerem que patogênese do adenocarcinoma de esôfago está fortemente relacionada com o dano oxidativo à que o epitélio é exposto. Nesse estudo, o dano oxidativo ocorreu numa fase inicial do experimento (11 semanas) no epitélio esofágico dos ratos, sugerindo que alterações inflamatórias induzidas pelo refluxo podem desencadear mudanças no funcionamento celular, as quais provavelmente precedem e acompanham o desenvolvimento do adenocarcinoma de esôfago (Chen X et al, 2000).

## **2. OBJETIVO GERAL**

- Determinar a expressão da enzima HO-1 em diferentes modelos experimentais de refluxo que induziram carcinoma de esôfago em ratos e sua relação com os diferentes achados histopatológicos nesses modelos.

### **2.2.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a expressão da HO-1 no tecido esofágico em um modelo experimental de indução de refluxo predominantemente gastroesofágico.
- Avaliar a expressão da HO-1 no tecido esofágico em um modelo experimental de refluxo com conteúdo duodenal.



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais e ambiente de experimentação**

A amostragem foi constituída por 100 peças de necropsia incluídas em parafina contendo esôfago e junção esôfago-gástrica de *Rattus norvegicus* (fêmeas), cepa *Wistar*, divididos em 6 grupos distintos provenientes do trabalho original (Melo LL et al,1999).

Os animais que foram submetidos a necropsia , haviam recebido aleitamento materno até os 21 dias de vida e, após esse período, receberam água e ração para roedores (PURINA ) *ad libitum* .

#### **3.2. Delineamento**

- Delineamento: Estudo experimental
- Fatores em estudo: Expressão da enzimas HO-1, por imunohistoquímica, no epitélio esofágico de cinco modelos experimentais de indução de refluxo gastroesofágico e duodeno-esofágico em ratos e um grupo controle.

### **3.3. Modelo experimental**

#### **3.3.1. Modelos animais de indução de carcinoma e refluxo**

As 100 peças de necropsia são originárias de animais que foram divididos em seis diferentes grupos:

\* Grupo 1 (n= 20 animais): submetidos a cardioplastia (refluxo predominantemente gástrico), receberam somente água durante o experimento.

\* Grupo 2 (n= 20 animais): submetidos a esofagoduodenostomia (refluxo duodenal), receberam somente água durante o experimento.

\* Grupo 3 (n= 10 animais): sem intervenção cirúrgica, receberam somente água durante o experimento

\* Grupo 4 (n= 20 animais): submetidos a cardioplastia e receberam dietilnitrosamina (DEN) na água de beber na concentração final de 0,04 ml/L durante 3 dias por semana.

\* Grupo 5 (n= 20 animais): submetidos a esofagoduodenostomia, receberam DEN na água de beber na concentração final de 0,04 ml/L durante 3 dias por semana.

\* Grupo 6 (n= 20 animais): sem intervenção cirúrgica, receberam DEN na água de beber concentração final de 0,04 ml/L durante 3 dias por semana.

O experimento iniciava quando os animais atingiam 8 semanas de vida (data das operações) e estendia-se até a trigésima semana (data de sacrifício) totalizando 22 semanas o período experimental.

### 3.3.2. Cirurgia

Todos os animais que foram submetidos a procedimentos cirúrgicos foram anestesiados com Tiopental (25 mg/Kg) e laparotomizados com uma incisão mediana.

#### 3.3.2.1. Técnica cirúrgica da cardioplastia (Grupos 1 e 4) - Modelo de refluxo gastroesofágico

Foi realizada a secção longitudinal (6mm) de todas as camadas da porção terminal do esôfago no nível da junção esôfago-gástrica. A abertura foi suturada no sentido transversal com fio de Prolene 7.0 com o objetivo de manter o cárdia aberto(Figura 2).

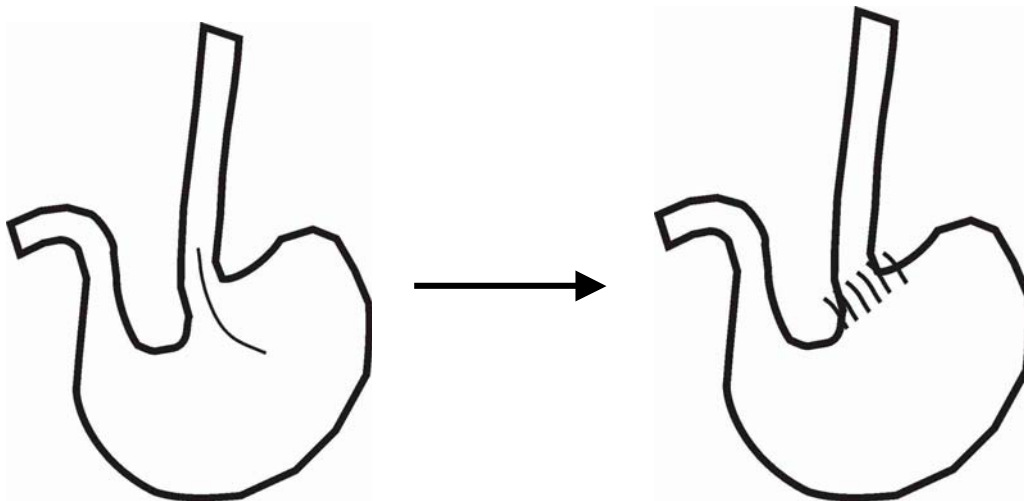
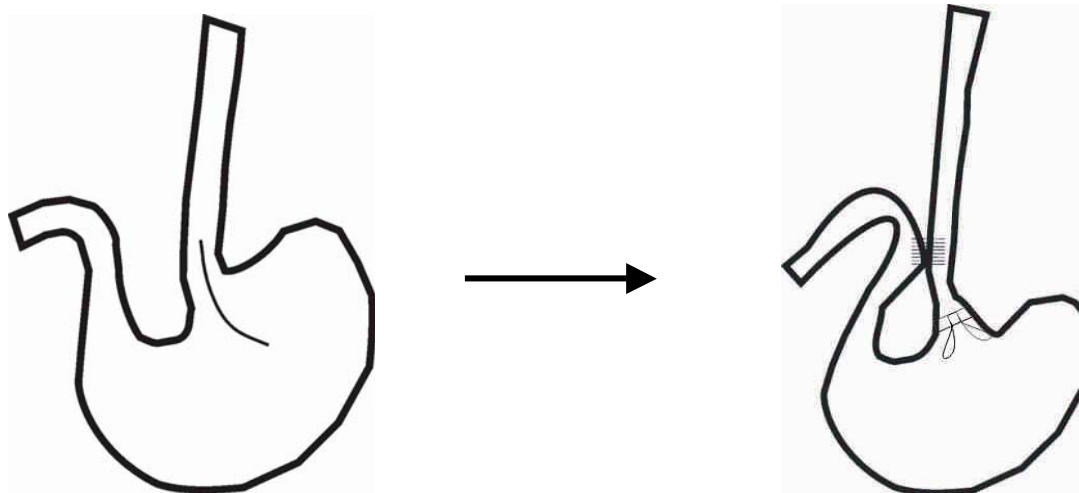


Figura 2 – Modelo de cardioplastia

### 3.3.2.2. Técnica cirúrgica da esofagoduodenostomia (Grupos 2 e 5) – Modelo de refluxo gastroduodeno-esofágico

O duodeno foi mobilizado e uma duodenotomia (1 cm) foi realizada no sentido transversal; a seguir, fechava-se a junção esofagogástrica com sutura manual utilizando fio de Prolene 6-0. Outra abertura de 1 cm foi feita à nível da junção esofagogástrica. Esses dois orifícios foram anastomosados de forma latero-lateral com fio de Prolene 7.0 (Figura 3)



**Figura 3 - Modelo de esofagoduodenostomia**

### **3.4. Histopatologia**

As alterações histopatológicas das peças cirúrgicas nos diferentes grupos foram reavaliadas após coloração pela hematoxilina-eosina de acordo com estudo original (11). Cada animal recebeu um diagnóstico de acordo com a gravidade das alterações. Caso estivessem presentes dois tipos de alterações na peça a mais grave seria utilizada. Não houve discordância entre os achados histopatológicos do estudo original e os observados nessa ocasião.

1. Esôfago normal.
2. Esofagite crônica, hiperplasia epitelial, papilomatose, ulceração.
3. Epitélio colunar do tipo intestinal (metaplasia intestinal).
4. Carcinoma (adenocarcinoma ou epidermóide).

### **3.5. Imunohistoquímica**

Foram selecionados 3 blocos de parafina que continham as alterações histopatológicas mais graves presentes em cada grupo para realização da imunohistoquímica, com exceção do grupo 2 que foi incluída uma lâmina com esôfago de Barrett.

Os blocos de parafina foram cortados com micrótomo para a obtenção de fatias com aproximadamente 4 micrômetros de espessura. Essas fatias de tecido foram montadas em lâminas de vidro silanizadas (Dako), desparafinizadas com uma solução de xileno e re-hidratadas imediatamente. Os cortes de tecido foram

lavados em tampão salina fosfato (PBS), pH 7,4 contendo Triton X-100 0,01% por 5 minutos, lavados com PBS e incubados com 2% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) para o bloqueio dos sítios inespecíficos. As fatias de tecido foram incubadas com anticorpo policlonal anti-HO-1(1:50; Santa Cruz Biotechnology) durante toda noite a 4° C por um período mínimo de 12 horas. Posteriormente o tecido foi lavado por 3 vezes com PBS e incubado por uma hora com anticorpo anti-IgG conjugado com biotina (1:50; Santa Cruz Biotechnology) seguido de uma incubação com estreptavidina conjugada com FITC(1:50; Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) por uma hora à temperatura ambiente. Lamínulas foram montadas sobre os cortes de tecido usando uma solução de propil gallato 20 mM e 20% de glicerol em PBS. A análise microscópica das imagens foi feita utilizando-se um microscópio de epifluorescência (Olympus BX40, Tokyo, Japan) equipado com filtros apropriados e objetivas de 20x, 40x e 100x de ampliação. A captura de imagem foi feita com uma câmera digital acoplada ao microscópio de fluorescência (CCD; Photometrics, Tucson, AR, USA). As imagens adquiridas foram analisadas através do software Adobe Photoshop.

A avaliação da marcação imunohistoquímica era feita por dois pesquisadores que desconheciam a diagnóstico histopatológico dos animais. A amostra era considerada positiva para expressão do HO-1 quando se identificava marcação celular do tecido esofágico. Com o objetivo de precisar as células marcadas para HO-1, foi feita uma sobreposição das imagens da fluorescência com as imagens em HE, que continham o segmento de esôfago que mais se aproximava daquele marcado pela fluoresceína. A avaliação da marcação

imunohistoquímica era feita por dois pesquisadores que desconheciam a diagnóstico histopatológico dos animais. A amostra era considerada positiva para expressão do HO-1 quando se identificava marcação celular do tecido esofágico. Com o objetivo de precisar as células marcadas para HO-1, foi feita uma sobreposição das imagens da fluorescência com as imagens em HE, que continham o segmento de esôfago que mais se aproximava daquele marcado pela fluoresceína. A intensidade da marcação também foi avaliada através de uma escala numérica para facilitar avaliação entre grupos. Uma região de cada lâmina que apresentava marcação histoquímica mais intensa era eleita de forma subjetiva para avaliação quantitativa em relação a intensidade da fluorescência. Nessa região a fluorescência era dosada e expressa numa escala numérica de intensidade de fluorescência média (IFM) através do software Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics).

### **3.6- Análise estatística**

A avaliação estatística foi feita usando-se o teste exato de Fisher. Os valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

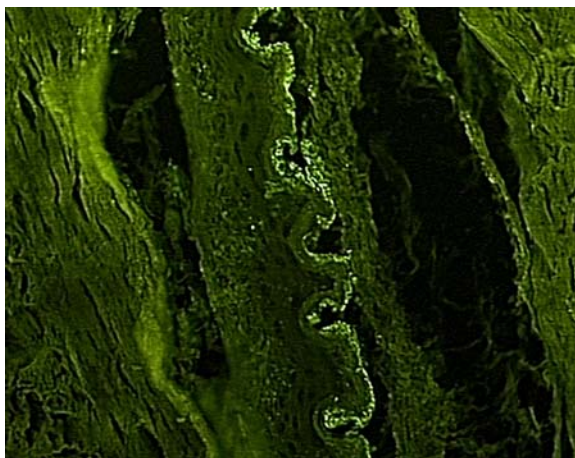
#### 4. RESULTADOS

A análise da expressão da HO-1 foi realizada numa amostragem contendo três animais de cada grupo apresentando as alterações histopatológicas mais graves em cada grupo. Além disso, foi analisada uma amostra de um animal com epitélio colunar do tipo intestinal pertencente ao grupo 2. Todas as peças de esôfago contendo neoplasias malignas no grupo 2 (refluxo duodenogástrico), expressaram HO-1, e o tipo histológico encontrado nesse grupo foi o adenocarcinoma. O grupo exposto ao refluxo duodenogástrico associado a DEN (grupo 5), também expressou HO-1 em todas as amostras estudadas (n=3), porém o tipo histológico de neoplasia desenvolvido por esse grupo de animais foi o epidermóide (tabela I).

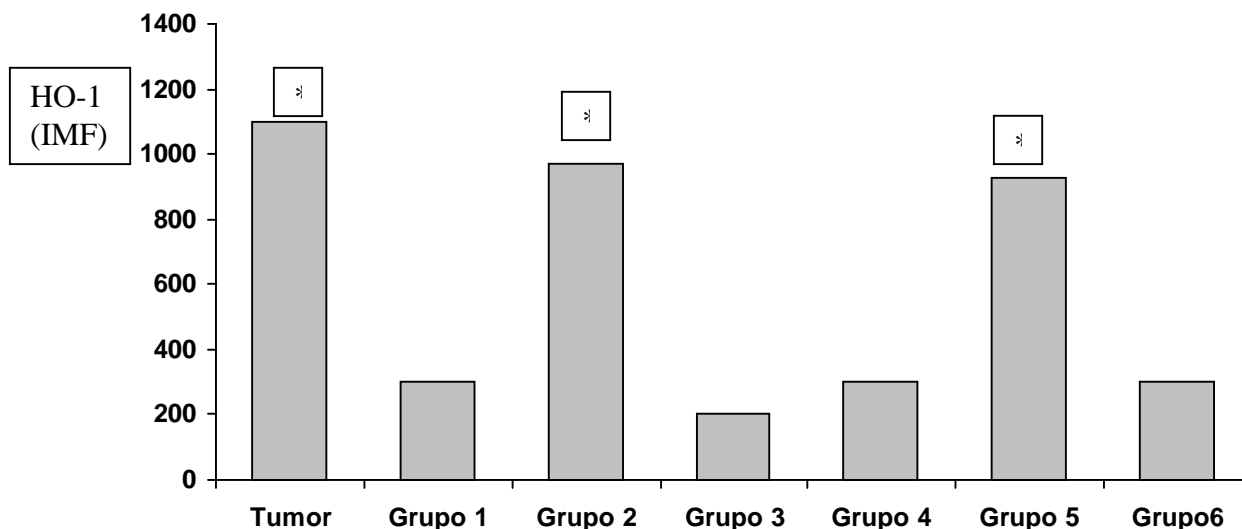
Como houve importantes diferenças de expressão histoquímica da HO-1 entre os grupos se optou pela não progressão da avaliação dos demais blocos de parafina. Houve, em todos os grupos estudados, marcação de fluorescência para HO-1 na queratina que cobre o epitélio esofágico do rato (Figura 4). Essa marcação foi considerada inespecífica devido ao fato da enzima HO-1 ser exclusivamente citosólica. Os animais que receberam apenas água, além de apresentarem epitélio normal na avaliação histológica, não apresentaram expressão para HO-1. Os grupos 1, 4 e 6 também não expressaram a HO-1 nas peças estudadas. Mesmo as amostras dos animais expostos a DEN e ao refluxo



gástrico, que continham algum grau de hiperplasia ou esofagite na avaliação histopatológica, não houve marcação para HO-1 de forma significativa (Figura 6).



**Figura 4- Epitélio esofágico sem alterações histopatológicas onde se pode verificar marcação inespecífica da fluorescência na queratina que cobre a camada superficial do epitélio(100X).**



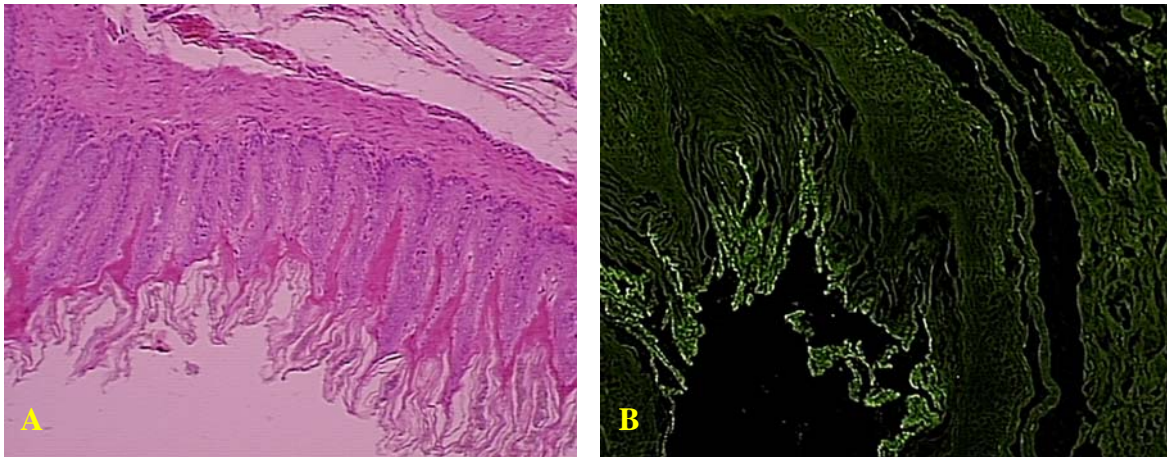
**Figura 5 - Intensidade média de fluorescência (IMF) nos diferentes grupos estudados (Image-Pro Plus 4.0) .O valor expresso na coluna tumor se refere a fluorescência presente no estroma tumoral dos adenocarcinomas presentes nos animais do grupo 2, e representa um controle positivo para marcação imunohistoquímica. As demais colunas refletem a intensidade de fluorescência em áreas de tecido esofágico sem carcinoma.**

**As colunas com asterisco apresentaram valores médios de fluorescência estatisticamente significativos quando comparados com o Grupo 3(Controle).(\* p<0,05 )**

A expressão da HO-1 ocorreu somente no tecido esofágico dos animais que foram expostos ao refluxo de conteúdo duodenal (grupos 2 e 5) (Tabela I). Quando os valores médios de intensidade de fluorescência foram comparados aos valores encontrados no grupo controle (grupo 3) , verificamos que os únicos grupos que apresentam diferenças estatisticamente significantes são àqueles em que os animais foram expostos a refluxo de conteúdo duodenal(Grupos 2 e 5) ( $p < 0,05$ ). (Figura 5).

**Tabela I – Correlação entre os achados histopatológicos e a expressão a do HO-1**

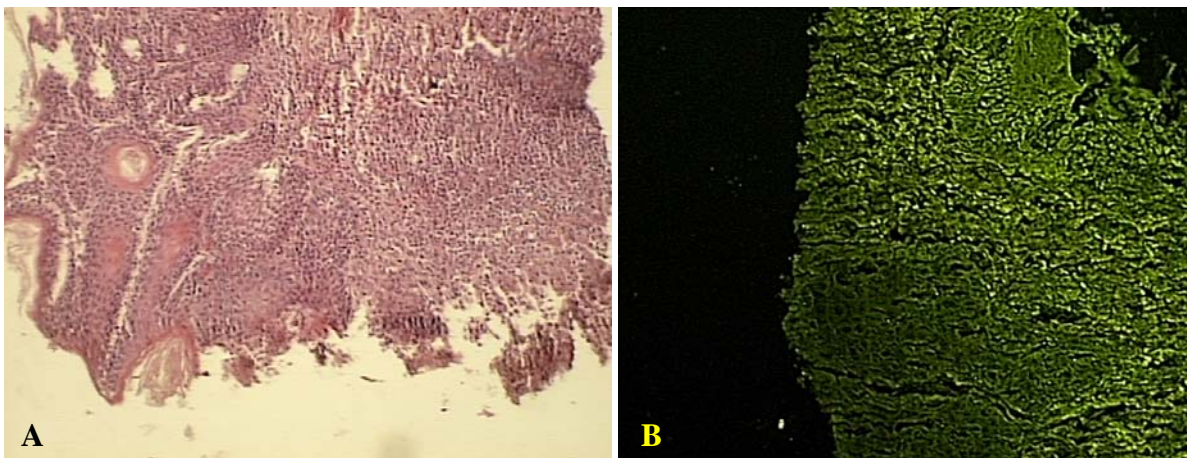
<b>Grupos</b>	<b>Análise Histopatológica</b>	<b>Expressão da HO-1</b>
Grupo 1: Refluxo gastroesofágico (n=3)	1- Estádio I 2- Estádio II 3- Estádio II	Todos negativos
Grupo 2: Refluxo duodeno-esofágico (n=3)( Estádio VI- todos adenocarcinoma)	1- Estádio III 2- Estádio IV 3- Estádio IV	Todos positivos
Grupo 3: Controle (n=2)	1- Estádio I 2- Estádio I	Todos negativos
Grupo 4: Refluxo gastroesofágico+ DEN (n=3)	1- Estádio II 2- Estádio II 3- Estádio II	Todos negativos
Grupo 5: Refluxo duodeno-esofágico+ DEN (n=3)(Estádio VI- Ca epidermóide)	1- Estádio IV 2- Estádio IV 3- Estádio IV	Todos positivos
Grupo 6: DEN (n=3)	1- Estádio II 2- Estádio II 3- Estádio II	Todos negativos



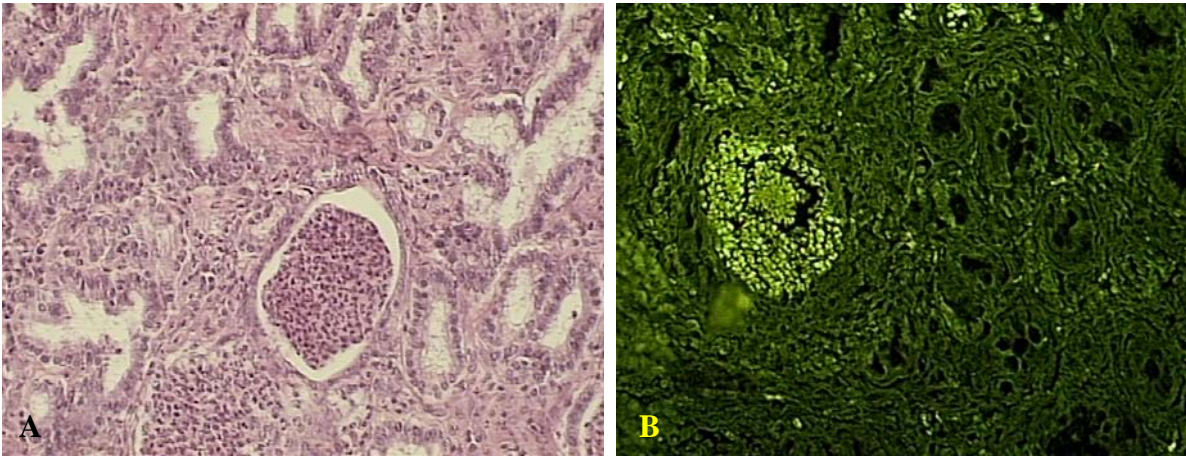
**Figura 6 - Microfotografia em HE(A) do epitélio esofágico com hiperplasia em animal exposto e refluxo gástrico+DEN. A imagem correspondente na fluorescência demonstra marcação na queratina e células sem marcação importante(100x).**

Além da diferença na expressão de HO-1 entre os grupos também houve predomínio de expressão em algumas áreas dos esôfagos a qual não foi uniforme. Houve maior expressão da HO-1 nas áreas de esôfago que continham processo inflamatório mais intenso. As regiões expostas a pouco ou nenhum estímulo inflamatório, como o esôfago proximal, não apresentaram marcação para HO-1, o que foi considerado como um controle negativo interno. A expressão da HO-1 foi mais marcante nas células inflamatórias presentes em regiões de erosão e esofagite. As células de epitélio escamoso não foram o alvo da expressão da HO-1, mesmo naqueles animais que desenvolveram neoplasia maligna e apresentavam esofagite adjacente (Fig. 7). A expressão da HO-1 no estroma tumoral teve uma correlação positiva com a quantidade de processo inflamatório presente no tumor. As células glandulares tumorais pouco expressaram a HO-1 e a fluorescência foi mais intensa nas células inflamatórias (macrófagos, eosinófilos

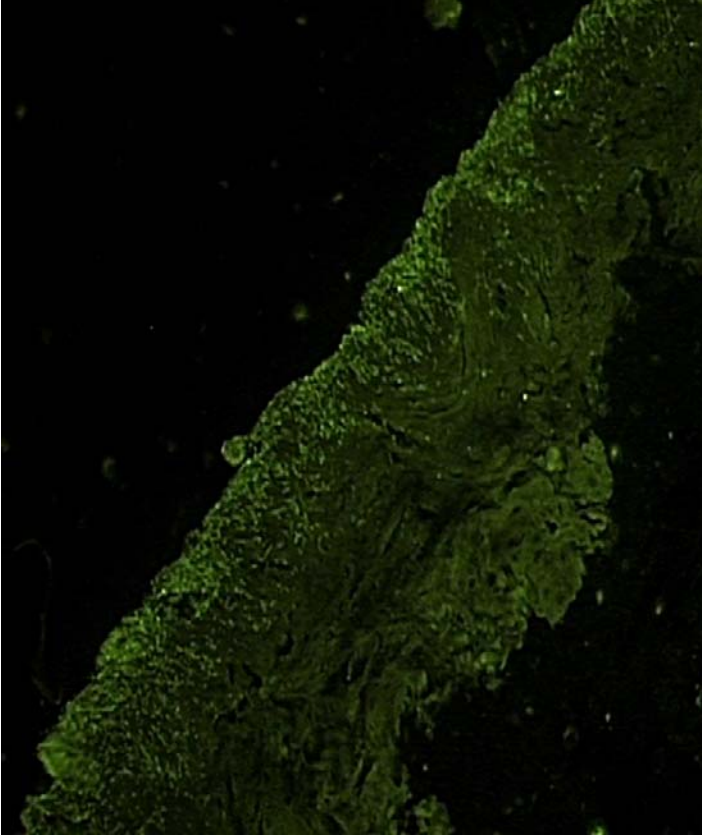
e neutrófilos) que por vezes formavam aglomerados (Fig. 8). O animal estudado que desenvolveu epitélio colunar metaplásico no esôfago distal também apresentou áreas com erosão e intenso processo inflamatório, e as células inflamatórias presentes nessas regiões foram as células que foram imunomarcadas. Todos as peças dos ratos que desenvolveram carcinoma epidermóide tinham imunomarcação para a HO-1 em alguma porção de esôfago estudada. Assim como nos animais que desenvolveram adenocarcinoma, a marcação se concentrava nas regiões onde existia processo inflamatório mais intenso. As células neoplásicas em si não foram intensamente imunomarcadas.



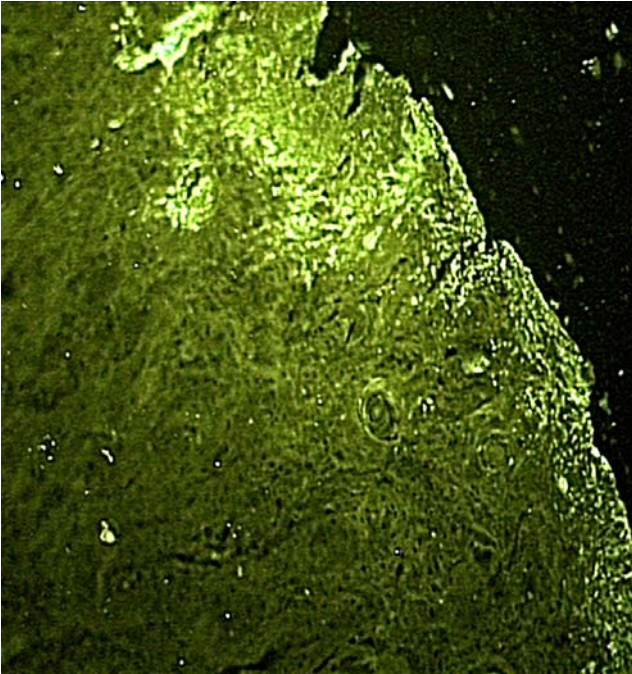
**Figura 7 – Epitélio escamoso do esôfago com esofagite e erosão adjacente também contendo grande infiltrado inflamatório em animal que desenvolveu adenocarcinoma(A). A imagem correspondente da fluorescência demonstra células do epitélio escamoso sem marcação e marcação mais intensa nas áreas de infiltrado inflamatório(subepitelial e erosão)(B). (100X)**



**Figura 8 – Adenocarcinoma ao exame histopatológico com arranjos glandulares e conglomerados de células inflamatórias no interior(A).Nota-se uma intensa marcação histoquímica principalmente no conglomerado de células inflamatórias(B)(200X).**



**Figura 9- Extensa marcação para HO-1 na região epitelial de animal que desenvolveu de carcinoma do tipo epidermóide(Grupo 5) numa região próxima a demonstrada pela microfotografia(100 X).**



**Figura 10- Marcação intensa em área de erosão epitelial de um animal que desenvolveu adenocarcinoma.(100X)**

## 5 DISCUSSÃO

A doença do refluxo gastro-esofágico é uma condição clínica comum em países ocidentais e sintomas do tipo pirose e regurgitação são relatados pelo menos uma vez por semana em 20% da população (Locke G R, 1997). Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento do adenocarcinoma de esôfago a doença do refluxo gastroesofágico ou mesmo o achado clínico de pirose se destacam (Lagergren J, 1999). Curiosamente 40 % dos pacientes com adenocarcinomas de esôfago nunca apresentaram sintomas de refluxo sugerindo que a doença do refluxo gastroesofágico e o esôfago de Barrett possam existir sem a manifestação de sintomas (DeMeester SR et al, 2001). Estudos experimentais e clínicos (Werner KH et al, 1995, Melo LL et al, 1999, Pera M et al, 1989, Goldstein SR et al, 1997, Pera M et al, 2000) indicam que a presença de bile ou conteúdo duodenal no líquido refluído para o esôfago exerce um importante papel na progressão da seqüência do epitélio normal-esofagite-metaplasia-câncer. Em contrapartida, existem evidências de que o refluxo gástrico isoladamente não tem capacidade de induzir metaplasia ou adenocarcinoma em animais (Melo LL et al 1999, Wild CP et al, 2003), e isso poderia ser uma explicação para o fato de que apenas uma parcela dos pacientes com doença do refluxo evoluiu para o adenocarcinoma de esôfago (Lagergren J, 1999). Embora, não se conheçam todos os mecanismos pelos quais o refluxo crônico com conteúdo duodenal predispõe para o surgimento de neoplasia maligna. Existem algumas evidências de que a inflamação crônica secundária ao refluxo com conteúdo duodenal gera estresse oxidativo, e o dano



oxidativo parece acompanhar a transformação maligna do epitélio desempenhando um papel importante na evolução da doença (Lee JS, 2001, Sihvo EIT et al , 2003).

No presente estudo, a expressão da HO-1 ocorreu apenas nos animais expostos ao refluxo duodenal. Os animais expostos ao refluxo duodenal apresentaram intensidade de fluorescência superior aos demais grupos e ao controle , e esses resultados foram estatisticamente significantes. Esse achado corrobora com a evidência da literatura de que o conteúdo duodenal isoladamente induz adenocarcinoma e estresse oxidativo em esôfago de ratos (Melo LL et al,1999, Goldstein SR et al, 1997) e o dano oxidativo parece exercer um papel importante na formação da lesão esofágica maligna (Chen X et al, 2000).

A expressão da HO-1 também foi bastante distinta não somente entre os animais dos diferentes grupos estudados, como também existiu uma marcação não uniforme naqueles ratos expostos ao refluxo duodenal que apresentaram marcação positiva. O esôfago proximal, por exemplo, não foi alvo da indução da HO-1 em nenhum animal, inclusive servindo como controle negativo interno para aqueles que expressaram a HO-1 nas porções mais distais do esôfago. Esse achado também reforça a idéia de que o refluxo com conteúdo duodenal é fundamental para desencadear estresse oxidativo no tecido esofágico.

Outro achado desse estudo, que está em acordo com outras evidências da literatura, foi a constatação de que o alvo da indução de enzimas inflamatórias como a HO-1 não foram as células epiteliais. As células inflamatórias presentes nas camadas subepiteliais ou em áreas de erosão foram as que mais

expressaram a HO-1. Mesmo nas porções de tecido esofágico que apresentavam células malignas, a expressão da HO-1 foi mais intensa nas áreas com infiltrado de células inflamatórias. Se considerarmos trabalhos que avaliaram a expressão de algumas enzimas presentes durante o processo inflamatório como a HO-1, COX-2 e a iNOS, verificamos que também nesses estudos o alvo da expressão dessas enzimas foi a região subepitelial onde havia células inflamatórias com destaque para macrófagos (Chen X et al, 2000, Jang TJ et al, 2004, Goldstein SR et al, 1998).

A expressão da HO-1 já foi identificada em diversas neoplasias malignas como adenocarcinoma renal, hepatoma, carcinoma de células escamosas, glioblastoma e melanoma (Goodman AI et al, 1997, Nishe A et al, 1999, Matsumoto A et al, 1998, Sunamura M et al, 2003, Tsuji MH et al, 1999, Tosiru-Itakura H et al, 2000). As células cancerosas ao expressarem a HO-1 aumentam a sua atividade angiogênica e anti-apoptótica (Fang J et al, 2004) e conseqüentemente tornam-se resistentes a ação das células de defesa do organismo. O tecido não neoplásico, quando exposto a situações de estresse, expressa a HO-1 com a finalidade de manter a homeostase celular através da degradação da molécula heme em três substâncias antioxidantes (bilirrubina,  $Fe^{2+}$ , CO). No entanto, se há uma estimulação exagerada da HO-1 pode haver acúmulo de  $Fe^{2+}$  e bilirrubinas no tecido. Tanto a bilirrubina como o  $Fe^{2+}$ , quando presentes em quantidades excessivas podem acabar atuando de forma paradoxal passando a exercer um papel oxidante e tóxico (Bauer M et al, 2002). Alguns estudos em ratos demonstraram que a suplementação de ferro via intraperitoneal aumenta a incidência do adenocarcinoma de esôfago em animais

submetidos a esofagoduodenostomia (Chen X et al, 2000, Goldstein SR et al, 1998). Nos animais do nosso estudo não houve suplementação de ferro. Os animais estudados dos grupos expostos ao refluxo duodenal foram aqueles que desenvolveram carcinoma e metaplasia intestinal. Nesses animais foram identificamos áreas de tecido esofágico livre de tumor com intensa atividade da HO-1, sugerindo que a HO-1, ao ser estimulada de forma intensa e continua como ocorreu nesse modelo animal de refluxo duodenal, pode atuar como uma enzima pró-oxidante e mutagênica através do acúmulo de seus substratos, como por exemplo, o Fe<sup>2+</sup>.

As nitrosaminas são potentes indutores de neoplasia maligna no esôfago. Os achados observados nesse estudo demonstraram que os ratos expostos exclusivamente à DEN por 22 semanas não chegaram a desenvolver câncer. No entanto, estudos recentes (Sallet JÁ et al, 2002, Dillenburg C et al, 2000) demonstraram em ratos que a desenvolvimento de tumores de esôfago a partir da exposição a DEN é dose dependente, e a dose ingerida pelos animais no nosso estudo se aproximou da dose necessária para que começassem a aparecer carcinomas de esôfago. Considerando que com uma semana a mais de experimento já teríamos alcançado a dose de DEN necessária para isoladamente induzir tumores de esôfago (Dillenburg CF et al, 2000), podemos concluir que provavelmente os animais expostos a DEN no nosso estudo se encontravam num estágio próximo de desenvolver lesões epiteliais de alto grau ou carcinoma epidermóide.. Como não foi identificada expressão da HO-1 naqueles ratos expostos a DEN ou DEN em conjunto com refluxo gástrico, nossos achados

sugerem que a carcinogênese esofágica experimental induzida por nitrosaminas não seja mediada por estresse oxidativo.

Em contrapartida, foi identificada expressão de HO-1 em animais do grupo expostos a DEN em conjunto com o refluxo de conteúdo duodenal. Os animais desse grupo apresentaram carcinoma epidermóide como achado histopatológico principal e o fato de terem expressado a HO-1 deve-se a exposição ao refluxo duodenal. Embora , as evidências epidemiológicas não apontem a doença do refluxo gastroesofágico como um fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma do tipo epidermóide (Wild CP et al, 2003), nossos achados indicam que o refluxo duodenal pode contribuir para o desenvolvimento de carcinoma epidermóide nos ratos expostos a DEN provavelmente através da exposição do epitélio ao estresse oxidativo, visto que apenas nesse grupo de animais surgiram carcinomas epidermóides.

## 6 CONCLUSÕES

1. O modelo experimental de refluxo predominantemente gástrico isoladamente ou em associação com a DEN não expressou HO-1 ou induziu lesões malignas no tecido esofágico dos ratos.
2. O refluxo duodenal isoladamente induziu adenocarcinoma de esôfago e expressou a HO-1 no tecido esofágico dos animais estudados , e o alvo principal para indução da HO-1 foram as células inflamatórias.
3. O refluxo duodenal através da indução de estresse oxidativo no epitélio esofágico facilitou o desenvolvimento de carcinoma epidermóide em animais expostos a DEN e submetidos a esofagoduodenostomia.
4. A expressão da HO-1 em áreas de epitélio adjacentes a regiões com adenocarcinoma, sugerem que a presença de estresse oxidativo é fator importante na progressão da seqüência esofagite-metaplasia-adenocarcinoma.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Greenlee RT, Hill-Hamon MB, Murray T, Thun M. Cancer Statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001 ; 51:15-36.
2. Kirby TJ, Rice TW. The epidemiology of esophageal carcinoma. *Chest Surg Clin North Am* 1994; 4; 217-25.
3. Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul . Mortalidade pelos principais tipos de câncer no estado do Rio Grande do Sul, período 1980-2002, Rio Grande do Sul , 2002. Disponível em url: [www.bemcertinho.com.br/documentos/mortalidade\\_câncer15.xls](http://www.bemcertinho.com.br/documentos/mortalidade_câncer15.xls)
4. Rosa ARP, Schirmer CC, Gurski RR, Breantano L, Krueel CD. Survival and prognostic factors in patients with epidermoid oesophageal carcinoma. *Int Surg* 1999;94:193-8.
5. Lightdale CJ. Practice guidelines for esophageal cancer. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 20-9.
6. DeMeester SR, Peters JH, DeMeester TR. Barrett's esophagus . *Curr Probl Surg* 2001; 38:558-640.
7. Werner KH, Kauer MD, Peters JH, DeMeester T R. Mixed Reflux of Gastric and Duodenal Juices is more harmful to the esophagus than gastric juice alone. *Ann Surg* 1995 , 222(4): 525-533.
8. Pera M, Trastek V F, Carpenter H A et al. Influence of Pancreatic and Biliary Reflux on the Development of Esophageal Carcinoma. *Ann Thorac Surg* 1993; 55;1386-93.
9. Melo LL, Krueel CDP, Kliemann LM, Cavazzola LT, Boeno RL, Grossi RS. Influence of surgically induced gastric and gastroduodenal content reflux on esophageal carcinogenesis – experimental model in rats. *Dis Esophagus*. 1999;12(2):106-15.
10. Reid B. Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 1991; 20:817-834.
11. Chen X, Ding Y W, Yang G et al. Oxidative damage in an esophageal adenocarcinoma model with rats. *Carcinogenesis* 2000, 21(2):257-263.
12. Pera M, Cardesa A, Bombi JA et al. 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* 1989;49:6803-8.

13. Goldstein SR, Yang G-Y, Curtis SK *et al.* Development of esophageal metaplasia and adenocarcinoma in a rat surgical model without the use of a carcinogen. *Carcinogenesis* 1997;18:2265-70.
14. Pera M, Brito MJ, Pera M *et al.* Duodenal-content reflux esophagitis induces the development of glandular metaplasia and adenosquamous carcinoma in rats. *Carcinogenesis* 2000; 21:1587-91.
15. Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal Cancer. *N Engl J Med.* 2003 Dec 4;349(23):2241-52.
16. Shirvani VN, Ouatu-Lascar R, Kaur BS *et al.* Cyclooxygenase –2 expression in Barrett’s Esophagus and Adenocarcinoma : Ex Vivo induction by Bile Salts and Acid Exposure. *Gastroenterology* 2000, 118: 487-496.
17. Zhang F, Subbaramaiah K, Altorki N, Soslow RA, Dannenberg AJ. *Gastroenterology*, 2001; 121:1391-1399.
18. Morris CD, Armstrong G.R., Path MRC *et al.* Cyclooxygenase –2 Expression in the Barrett’s Metaplasia –Dysplasia – Adenocarcinoma Sequence. *Am J Gast* 2001, 96(4) : 990-996.
19. Jang TJ, Min SK, Bae JD, Jung KH, Lee JI, Kim JR, WS Ahn. Expression of cyclooxygenase 2 , microsomal prostaglandin E synthase 1, and EP receptors is increased in rat oesophageal squamous cell dysplasia and Barret’s metaplasia induced by duodenal contents reflux. *Gut* 2004;53:27-33.
20. Zimmermann KC; Sarbia M; Weber AA *et al.* Cyclooxygenase expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1999 Jan 1; 59(1) : 198-204.
21. Jenkins GJS, Doak SH, Parry JM, D’Souza FR, Griffiths AP, Baxter JN. Genetic pathways involved in the progression of Barrett’s metaplasia to adenocarcinoma.. *BJS* 2002; 89: 824-7.
22. Wilson K T. Angiogenic markers, neovascularization and malignant deformation of Barrett’s esophagus. *Dis Esophagus* 2002;:15;16-21.
23. Vigliani R. Oncologia di Galeno –Galen’s oncology. *Pathologica* 1995;87:577-590.
24. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans : Hepatitis Viruses , vol 59 , International Agency for Reserach on Cancer, Lyon , France ,1994.
25. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans : Shistosomes , Liver Flukes and Helicobacter Pylori, vol 61 , International Agency for Reserach on Cancer, Lyon , France ,1994.

26. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans : Human Papillomavirus, vol 64 , International Agency for Reserach on Cancer, Lyon , France,1995.
27. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans : Human Immunodeficiency Viruses and Human T-cell Lymphotropic Viruses , vol 67 , International Agency for Reserach on Cancer, Lyon , France ,1995.
28. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans : Epstein –Barr Viruses and Kaposi’s Sarcoma Herpesviruses/ Human Herpesvirus 8 , vol 70 , International Agency for Reserach on Cancer, Lyon , France ,1997.
29. Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. Archives of Biochemistry and Biophysics ,2003;417: 3-11.
30. El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD et al. Incresed risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. Gastroenterology , 2003 May;124(5):1193-201.
31. Ballaz S, Mulshine JL. The potential contributions of chronic inflammation to lung carcinogenesis. Clin Lung Cancer ,2003 Jul; 5(1):46-62.
32. Normark S, Nilsson C, Normark BH et al. Persistent infection with Helicobacter pylori and the development of gastric cancer. Adv Cancer Res , 2003 ; 90:63-89.
33. Nakamoto Y, Kaneko S. Mechannisms of viral hepatitis induced liver injury. Curr Mol Med 2003 Sep; 3(6): 537-44.
34. Andoh H, Yasui O, Kurokawa T et al. Cholangiocarcinoma coincident with schistosomiasis japonica. J Gastroenterol 2004 Jan ;39(1):64-8.
35. DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxidase synthase: regulatation of enzyme expression. Bioch Biophys Acta 1991; 1083:121-34.
36. Tsujii M, Kawano S, Tsujii S et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced cancer colon cells. Cell 1998;93:705-16.
37. Wetscher GJ, Hinder RA, Gadenstatter M. Reflux esophagitis in humans is a free radical event. Dis Esoph 1997 ;10:29-32.
38. Lee JS, Oh TY, Ahn BO et al. Involvement of oxidative stress in experimental induced reflux esophagitis and Barrett’s esophaus: clue for the chemoprevention of esophageal carcinoma by antioxidants. Mutation Research 2001, 480-481; 189-200.



39. Sihvo EIT, Ruohtula T, Auvinen M et al. Simultaneous progression of oxidative stress and angiogenesis in malignant transformation of Barrett esophagus. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2003, 126 (6), 1952-1957.
40. Morse D, Choi AMK. Heme-oxygenase-1 –The “Emerging Molecule” has arrived. *Am J Resp. Cell Mol. Biol.*, 2002 ;Vol 27 , 8-16.
41. Wagener FATG, Volk H-D, Willis D et al. Different Faces of the Heme-Heme Oxygenase System in Inflammation. *Pharmacol Rev.* 2003; 55: 551-571.
42. Poss KD, Tonegawa S. Reduced stress defense in heme-oxygenase-1 deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; Vol 94 : 10925-10930.
43. Niimi M, Takashima M, Takami H et al. Overexpression of heme oxygenase-1 protects allogeneic thyroid grafts from rejection in naive mice. *Surgery* 2000; Vol 128(6): 910-917.
44. Yang ZF, Tsui TY, Ho DW, Tang TC, Fan ST. Heme Oxygenase-1 potentiates the survival of small for size liver graft . *Liver Transpl* 2004;10(6): 784-93.
45. Bauer M, Bauer I. Heme Oxygenase-1 : Redox regulation and role in the Hepatic Response to Oxidative Stress. *Antioxidant & Redox Signaling* 2002;4(5):749-58.
46. Goodman AI, Choudhury M, Jiang S et al. Overexpression of the heme oxygenase in renal cell carcinoma. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;214:54-61.
47. Nishe A, Ono M, Shono T et al. Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res* 1999;5:1107-13.
48. Matsumoto A, Hanayama R, Nakaruma M et al. A high expression of heme oxygenase-1 in the liver of LEC rats at the stage of hepatoma: The possible implication of induction in uninvolved tissue. *Free Radical Res* 1998;28:383-91.
49. Sunamura M, Duda DG, Ghattas MH et al. Heme-oxygenase-1 accelerates tumor angiogenesis of human pancreatic cancer. *Angiogenesis* 2003; vol 6 : 15-
50. Tsuji MH, Yanagawa T, Iwasa S, et al. Heme oxygenase-1 expression in oral squamous cell carcinoma as involved in lymph node metastasis. *Cancer Lett* 1999; 138:53-59..
51. Goldstein SR, Yang G-Y, Chen X et al. Studies of iron deposits, inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in a rat model for esophageal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 1998;vol 19(8):1445-1449.
52. Fang J, Akaike T, Maeda H . Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis* 2004 ; 9:27-35.

53. Locke, G R, Talley N J, Fett S L, Zinsmeister AR & Melton LJ. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a population based study in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 1997 ;112,1448-1456.
54. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Syntomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Eng J Med* 1999;340:825-831.
55. Wild CP, Hardie LJ. Reflux ,Barrett´s Esophagus and Adenocarcinoma :Burning Questions. *Nature* 2003; 3:676-84.
56. Miwa K, Sahara H, Segawa M et al. Reflux of duodenal contents induces esophageal carcinoma in rats. *Int J Cancer*. 1996; 67:269-274.
57. Cejas P, Casado E, Belda-Iniesta C, et al. Impliations of oxidative stress cell membrane lipid peroxidation in human cancer(Spain). *Cancer Causes and Control* 15:707-719,2004.
58. Tosiru-Itakura H, Furue M, Kuwano M & Ono M. Co-expression of Thymidine Phosphorylase and Heme Oxygenase-1 in Human Malignant Vertical Growth Melanomas. *Jpn J Cancer Res*.2000; 91, 906-910.
59. Sallet J A, Zilberstein B, Andreollo N A, Eshkenazy R, Pajecki D. Experimental esophageal carcinogenesis: technical standardization and results. *Dis Esophagus* 2002;15,278-281.
60. Dillenburg CF. Influência da Morfina na Carcinogênese Esofágica Induzida pela Dietilnitrosamina em Ratos. Dissertação de Mestrado. Pós Graduação em Medicina –Cirurgia(Universidade Federal do Rio Grande do Sul)- 2000.

## **HO-1 Expression during Esophagitis-Carcinoma Progression in Different Reflux Experimental Models**

### **Abstract**

It is known that chronic reflux can induce mucosal injury, stimulate cell proliferation and promote tumorigenesis in distal esophagus. It is as yet unknown why only a section of patients with gastroesophageal reflux progressed into intestinal metaplasia (Barrett's esophagus) and adenocarcinoma. A driving force may be oxidative stress. Therefore, we examined the expression pattern of Heme Oxygenase-1 (oxidative stress inducible enzyme) in esophageal specimens obtained from an experimental study with rats that evaluated the role of gastric and duodeno-esophageal reflux in esophageal carcinogenesis.

**Methods:** A sample of three (3) esophageal specimens from each group of rats submitted to different treatments had the HO-1 expression evaluated through immunohistochemistry. The rats were divided into the following groups: (1) cardioplasty to induce acid reflux, (2) esophagoduodenal anastomosis to induce duodenal reflux, (3) no treatment, (4) cardioplasty+diethylnitrosamine (DEN), (5) esophagoduodenal anastomosis +DEN, (6) DEN.

**Results:** There was no cancer or metaplasia development in esophagus not exposed to duodenal contents. The expression of HO-1 was observed only in rats submitted to esophagoduodenal anastomosis (Groups 2 and 5), and the analysis of mean of fluorescence intensity demonstrated a significant increase of HO-1 expression (4.8 and 4.6 fold, respectively) as compared to control (Group 3)

( $p < 0.05$ ). The main target for HO-1 induction was the inflammatory cells inside the tumor or in subepithelial areas. Rats exposed to gastric reflux did not develop tumors or HO-1 expression.

Conclusions: Reflux esophagitis induced by reflux of duodenal contents provoked considerable oxidative stress and may play an important role in esophageal carcinogenesis. Gastric reflux was not sufficient to induce oxidative stress in this experimental model.

Key Words: esophagus, heme oxygenase-1, inflammation, cancer, experimental models, reflux.

## **Introduction**

Esophageal cancer is the eighth most common cancer worldwide. It has received considerable attention in recent years because of the rapid increase of the adenocarcinoma histological sub-type in Western countries (1, 2). The prognosis remains poor with a 5-year survival rate of 10% (3). Therefore, it is important to understand the pathogenesis and develop strategies for prevention of this deadly disease.

It is accepted that the development of esophageal adenocarcinoma follows a metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. Chronic reflux is a risk factor for esophageal metaplasia (Barrett's esophagus) and adenocarcinoma (4,5). However, only 10 % of individuals with reflux develop Barrett's esophagus (BE) and the estimated lifetime risk for a middle-aged individual with BE to develop adenocarcinoma is 10-15% (6,7). Factors other than acid reflux alone might also

contribute to the progression from normal epithelia to BE and cancer. In patients with gastro-esophageal reflux disease, the concentration of bile acids in the esophageal reflux correlates with the degree of esophageal mucosal injury (8). Moreover, mixed reflux of gastric and duodenal juices is more common in patients with BE than in normal subjects (8,9). The precise mechanisms by which duodenal reflux cause esophageal injury and cancer is uncertain. A driving force may be oxidative stress (10,11).

Chronic inflammation induced by biological, chemical and physical factors has been associated with increased risk of human cancer at various sites, including the esophagus (12-15). One of the mechanisms proposed to contribute to esophageal cancer is through the activation of inflammatory cells that induce and activate several oxidant-generating enzymes. These enzymes produce high concentrations of free radicals and oxidant species. Prolonged exposure to this environment could lead to host cells injury, including DNA damage that could initiate tumor formation (16).

Human cells, when exposed to chronic inflammation and oxidative stress, up-regulate anti-oxidant enzymes such as heme oxygenase-1 (HO-1), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2). These induced enzymes may directly mediate inflammatory reaction or contribute to the resolution of inflammation (17,18). HO-1 plays a key role in cellular homeostasis catalyzing the first and rate-limiting step of heme degradation into equimolar amounts of carbon monoxide (CO), iron and biliverdin, which are subsequently reduced to bilirubin (19,20). Thus, induction of HO-1 is considered to be an adaptive cellular mechanism in response to oxidative stress. Cell growth and proliferation of various

types of cells have been reported to be associated with HO-1 expression, and antiapoptotic as well pro-angiogenic effects are two possible mechanisms implicated in this process (21-22). Therefore, a relation between malignant behavior and HO-1 expression may exist and an elevated HO-1 activity has been found in renal adenocarcinoma, lymphosarcoma, hepatoma, melanoma and squamous carcinoma cells (23-26). It has been reported that HO-1 is expressed in esophageal cancer induced by duodenogastric reflux plus iron supplementation in rats (27). However, the effect of acid reflux on induction of HO-1 expression in distal esophagus is not well understood.

In the present work, we investigated HO-1 expression in esophagus in different reflux experimental models as previously established (28). We also supported the hypothesis that the acid reflux accompanied by duodenal juice is necessary to induce oxidative damage.

## **Materials and methods**

### **Experimental model of esophageal carcinogenesis in rats**

Esophageal specimens embedded in paraffin were obtained from an experimental study with rats (29), that evaluated the role of gastric and duodeno-esophageal reflux as promoters and inducers of esophageal carcinogenesis.

A hundred and ten female Wistar rats (8 weeks old, 250-300g) were used in the initial study. Rats were divided into 5 five groups of 20 animals in each group and one control group with 10 animals. Groups 1 and 4 were submitted to a

cardioplasty to induce gastroesophageal reflux. The terminal part of the esophagus was isolated and a 6mm longitudinal incision in all layers of anterior esophagogastric junction was performed and transversally closed with 7-0 Prolene stitches similar to Heinecke-Mikulicz pyloroplasty (Fig. 1A). An esophagoduodenostomy was performed in groups 2 and 5 to induce duodeno-esophageal reflux into the esophagus. After the release of duodenum and the ligation of gastroesophageal junction, a 1cm long lateral esophagoduodenal anastomosis was performed with 6-0 Prolene stitches (Fig. 1B). Operated animals in group 4 and 5 and also a group with no surgical intervention (Group 6) received a carcinogen, diethylnitrosamine (DEN), obtained from Sigma{St.Louis,MO,USA;N-nitrosodioethylamine(Sigma Chemical 0756), 100 ml flask, density = 0.95g/ml, molecular weight 102.1, chemical formula = C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O}. It was diluted in drinking water, administered to the animals in a dose of 5mg/Kg/day, considering a daily mean water consumption per animal of 40ml. Group 3 (10 rats) were not exposed to any treatment. After 22 weeks, all experimental rats were killed with ether.

### **Pathological analysis**

Esophageal tissues fixed with formalin, routinely processed for inclusion in paraffin and 5 µm sections of each block were prepared for histological evaluation using haematoxylin-eosin (HE) staining. A pathologist classified the histopathological stages of each experimental group according to the classification previously described by Mello et al (28), as follows:

Stage I: normal esophagus, light chronic esophagitis, low or moderate epithelial hyperplasia.

Stage II: marked epithelial hyperplasia, moderate or marked chronic esophagitis, papillomatosis, ulceration.

Stage III: Barrett's esophagus (intestinal metaplasia);

Stage IV: mild dysplasia

Stage V: moderate or marked dysplasia

Stage VI: adenocarcinoma or squamous cell carcinoma

### **Immunohistochemistry assay for HO-1 expression**

A initial sample was selected according to the most severe histopathological changes founded in each group. This sample consisted of three selected sections from three different rats of each group plus one section containing specialized columnar epithelium (Barrett's esophagus) from group 2. HO-1 expression was evaluated by immunohistochemistry. Paraffin sections (4  $\mu\text{m}$ ) were cut, deparaffinized with xylene and rehydrated. Tissue sections mounted on glass were permeabilized in PBS containing 0,1% Triton X-100 for 5 min, washed with PBS and incubated with 2% bovine serum albumin (BSA; Sigma Chem. Co, St. Luis, MO) followed by incubation with polyclonal anti-HO-1 antibody (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) overnight at 4° C. Subsequently, tissue slices were washed three times with PBS and incubated with biotin-conjugates anti-rabbit (1:50; Santa Cruz) followed by incubation with streptavidin-conjugated FITC (1:50; Caltag Laboratories, Burlingame, CA) for 1 hour at room temperature. Slides were



mounted using a solution of 20 mM propyl gallate and 80% glycerol in PBS. Microscopic analysis of images was done using epifluorescence microscope (Olympus BX40, Tokyo, Japan) equipped with appropriate filters. Image capturing was performed with a cooled-charged-coupled device camera (Photometrics, Tucson, AR). Fluorescence intensity from original images was analyzed by Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics) and gray images were taken using Adobe Photoshop software. A pathologist also evaluated HO-1 expression in tissue sections of experimental groups as negative or positive.

### **Statistical analysis**

Statistical evaluation was performed using Fischer's exact test and chi square test. Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

## **Results**

### **Histopathological analysis**

As ten rats died before the experimental was over, a total of 100 rats were available as esophageal specimens. Histopathological analysis revealed that only the rats exposed to duodeno-esophageal reflux developed carcinoma of the esophagus. Three rats developed specialized columnar epithelium in the group submitted to esophagoduodenal anastomosis without DEN in drinking water (Group 2), and all malignant tissue lesions in this group were classified as adenocarcinomas. The incidence of esophageal cancer in rats treated with esophagoduodenal anastomosis plus DEN was 76% (13 rats), out of which one rat had adenocarcinoma and 12 rats had squamous cell cancer. Esophageal epithelium in the control group was considered normal (Stage I). In relation to the other groups, the most severe histological changes founded were marked epithelial hyperplasia and esophagitis (Stage II; Table I) Although esophagitis was detected in the groups exposed to gastric reflux, the degree of inflammation was mild compared with groups exposed to duodenal reflux.

### **Correlation between HO-1 expression and histopathological features**

We performed the evaluation of HO-1 expression in tissue sections from three rats of each group with the most severe esophageal lesions, and we also included one sample from group 2 with specialized columnar epithelium (Barrett's esophagus). Groups that were not exposed to duodenal contents did not show HO-1 immunoreactivity in the esophagus. Even considering the Stage II grade lesions,

no HO-1 cell expression was observed in groups 1, 3, 4 and 6 (Fig. 2 and Fig. 5). In all studied sections from rats submitted to esophagoduodenal anastomosis (Groups 2 and 5), the results from analysis of mean of fluorescence intensity demonstrated a significant increase of HO-1 expression (4.8 and 4.6 fold, respectively) (Fig. 5) as compared to control (Group 3). These data are similar to mean of fluorescence intensity analyzed in tumor slices (5.5 fold) (Fig. 5). To identify the cells presenting HO-1 immunoreactivity, we examined simultaneously the same esophageal area in HE and immunofluorescence labelled slices. Comparing the samples, we found that positive HO-1 expression was not uniformly distributed through tissue slice. HO-1 expression was observed in inflammatory cells (macrophages, eosinophils and lymphocytes) directly beneath the epithelium or in erosion areas. Squamous cell epithelium did not express HO-1 as observed in adjacent areas with intense inflammatory cells (Fig. 3). All HO-1 immunoreactivity was distributed in the distal one-third or two-thirds of the esophagus and no immunoreactivity was observed in the upper one-third of the esophagus even in the animals in which adenocarcinoma arose.

In adenocarcinoma tissue slice, HO-1 was expressed in glandular cells and also in tumoral stroma, but the main immunoreactivity was detected in macrophages and other inflammatory cells (eosinophils and lymphocytes) (Fig. 4). Severe inflammation and high HO-1 expression in inflammatory infiltrate (Fig 3) was shown even in areas without tumor cells in esophageal tissue from animals exposed to duodenal reflux. However, squamous cell epithelium did not express HO-1 in esophageal tissue presenting adenocarcinoma. The same profile was

observed in tissue presenting squamous cells carcinoma, where HO-1 expression was intense in inflammatory cells but not in tumor cells.

In addition, when samples from animals exposed to gastric reflux were included in a group (n=6) and samples from those exposed to duodenal juice as another one (n=6), HO-1 expression was significantly different between these two types of reflux models ( $p < 0,05$ ; Table I).

## **Discussion**

Despite progress in comprehension of relationship between esophageal adenocarcinoma and gastroesophageal reflux, few studies explored the underlying causes. Studies have shown that duodenogastric reflux per se causes intestinal metaplasia (Barrett's esophagus) and adenocarcinoma in rats, even without exposure to carcinogens (28, 29). In contrast, gastric contents do not induce this metaplasia-carcinoma sequence (30). Moreover, esophageal exposure to a mixed sort of reflux containing gastric and duodenal juice has been implicated in the development of Barrett's esophagus in patients (8,9), and this may explain why some patients do not progress to metaplasia and cancer. Although, the precise mechanisms by which reflux with duodenal contents causes esophageal injury and predisposes to neoplasia are not completely understood, there is considerable evidence that chronic inflammation and oxidative damage could play a role in this tissue injury (11, 15).

Reactive oxygen species (ROS), superoxide anion ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and nitric oxide (NO) are oxidants molecules constantly

generated *in vivo* that are known to be implicated in signaling pathways regulating cell growth and cell status redox control. However, in chronic inflammatory process they could be produced in excess, and exert detrimental effects such as lipid peroxidation and DNA damage. The progression of this oxidative stress damage has been implicated in human cancer (31). In distal esophagus, Sihvo et al. observed that the reflux disease-metaplasia-carcinoma sequence revealed progressively increased oxidative stress, indicating a link between oxidative damage and malignant transformation of esophageal epithelium (15).

During physiological conditions tissues do not express HO-1 and it is considered an adaptive response to protect cells from oxidative damage. Many data suggest that the important cytoprotective effect occur also in tumor cells though anti-apoptotic and angiogenic properties (21,26). In our study, rats exposed to duodenal reflux developed cancer and expressed HO-1 in tissue in a similar pattern found by Chen et al. (27), and the less intense glandular cell immunoreactivity seen in our study could be attributed to the fact that we did not offer iron supplement to the rats. As we found inflammatory areas with high HO-1 expression distant from malignant lesions, we agree with other authors that the progression of esophagitis-metaplasia-adenocarcinoma sequence is associated with oxidative stress (15). However, the histological changes seen in animals exposed to gastric reflux were less severe than those animals exposed to additional duodenal reflux, it was clear that gastric reflux was not sufficient to induce a significant oxidative stress in this experimental model. Thus, the difference in the HO-1 expression in these two models of reflux could explain why gastric reflux did not induce esophageal adenocarcinoma.

Although gastro-esophageal reflux disease has not been associated with squamous cell carcinoma of the esophagus (32), studies with rats have shown that duodenal contents reflux into the esophagus induces squamous cell dysplasia and adenocarcinoma as well as when a co-carcinogen and a carcinogen are given simultaneously (29, 33, 34). In addition, it has been described that chronic thermal injury of the esophagus caused by hot beverage abuse may be involved in esophageal cancer in an experimental study and a population area (35, 36). According to this, our results suggest that the chronic inflammatory process mediated by duodenal reflux could lead to the development of squamous cell carcinoma.

In conclusion, duodenal reflux can act as co-carcinogen in esophageal squamous cell pathogenesis in rats, which can be mediated by oxidative stress, as observed by HO-1 expression during histological malignant transformation. We also propose additional studies focussing on oxidative stress, considering that HO-1 could be a useful biomarker as a risk factor for malignant progression.

## References

1. Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraunemi JF. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *J Am Med Assoc* 1991, 265: 1287-1289
2. Buttar NS, Falk GW. Pathogenesis of gastroesophageal reflux and Barrett's esophagus. *Mayo Clin Proc* 2001, 76: 226-34.
3. Campos GMR DeMeester SR, Peters JH, Öberg S, Crookes PF, Hagen JA, Bremner CG, Sillin III LF, Mason RJ, Tom R, DeMeester TR. Predictive factors of Barrett esophagus: multivariate analysis of 502 patients with gastroesophageal reflux disease. *Arch Surg* 2001, 136: 1267-1273.
4. Cejas P, Casado E, Belda-Iniesta C, De Castro J, Espinosa E, Redondo A, Sereno M, Garcia-Cabezas MA, Vara JA, Dominguez-Caceres A, Perona R, Gonzalez-Baron M. Implications of oxidative stress cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain). *Cancer Causes Control* 2004, 15: 707- 719.
5. Chen X, Ding Y W, Yang G et al. Oxidative damage in an esophageal adenocarcinoma model with rats. *Carcinogenesis* 2000, 21(2): 257-263.
6. Collins RH, Feldman M, Fordtran JS. Colon cancer, dysplasia and surveillance in patients with ulcerative colitis: a critical review. *N Engl J Med* 1987, 136: 1654-1658.
7. DeMeester SR, Peters JH, DeMeester TR. Barrett's esophagus. *Curr Probl Surg* 2001, 38: 558-640.
8. Doi K, Akaike T, Fujii S, Tanaka S, Ikebe N, Beppu T, Shibahara S, Ogawa M, Maeda H. Induction of haem oxygenase-1 by oxide nitric and ischemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. *Br J Cancer* 1999, 80: 1945-1954.
9. Fang J, Akaike T, Maeda H. Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis* 2004, 9: 27-35.
10. Farhadi A, Fields J, Banan A, Keshavarzian A. Reative oxygen species: are they involved in the pathogenesis of GERD, Barrett's esophagus, and latter's progression toward esophageal cancer? *Am J Gastroenterol.* 2002, 97: 22-26.

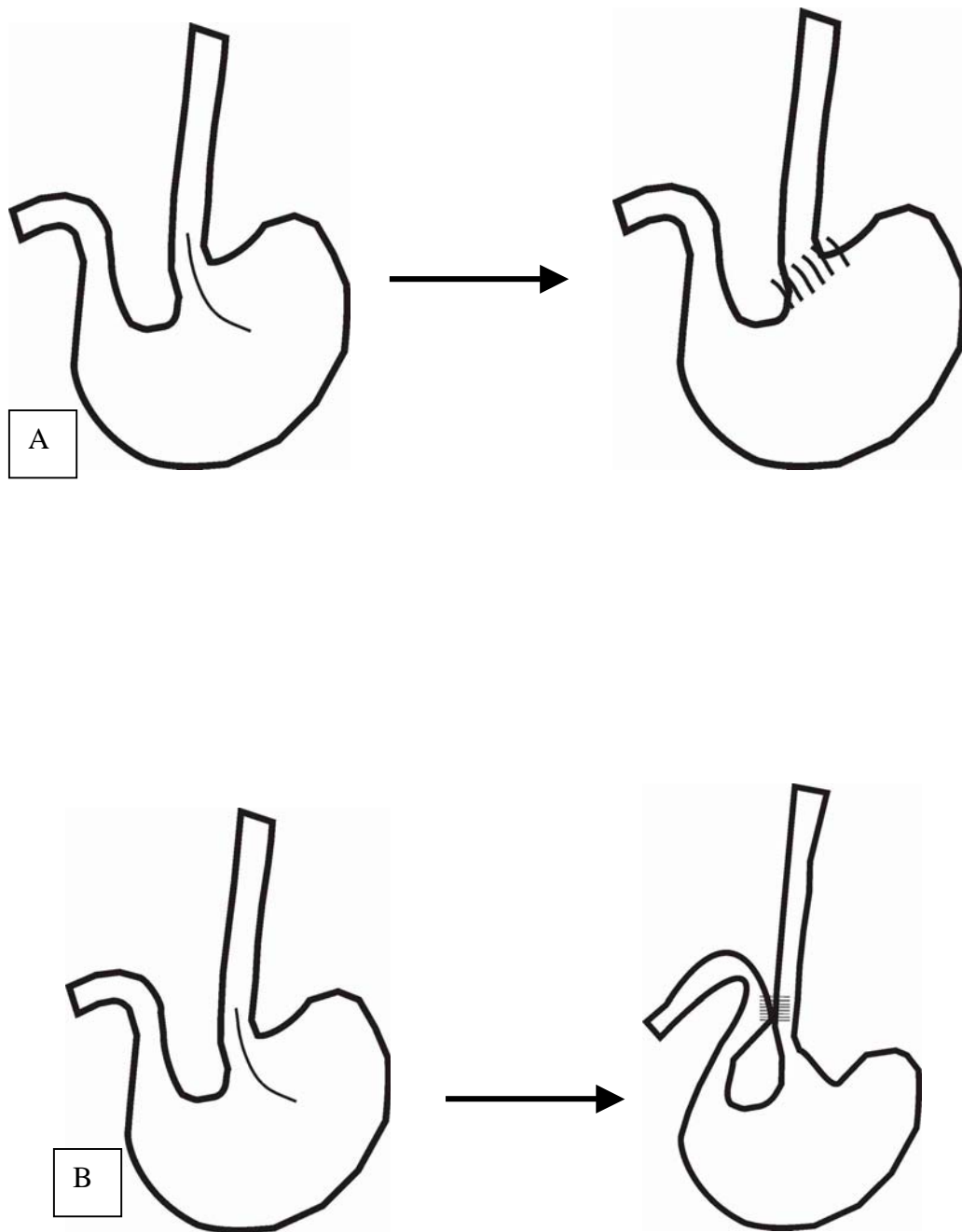
11. Farrow DC, Vaughan TL. Determinants of survival following the diagnosis of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Causes Control*, 1996, 7: 332-327.
12. Goldstein SR, Yang GY, Curtis SK, Reuhl KR, Liu BC, Mirvish SS, Newmark HL, Yang CS. Development of esophageal metaplasia and adenocarcinoma in rat surgical model without the use of a carcinogen. *Carcinogenesis*. 1997, 18: 2265-2270.
13. Goodman AI, Choudhury M, da Silva JL, Schwartzman ML, Abraham NG. Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997, 214: 54-61.
14. Greenlee RT, Hill-Hamon MB, Murray T, Thun M. Cancer Statistics, 2001. *Cancer J Clin* 2001, 51: 15-36.
15. Holzinger F, Z'graggen K, Büchler MW. Mechanisms of biliary carcinogenesis: a pathogenic multi-stage cascade towards cholangiocarcinoma. *Ann Oncol* 1999; 10 (suppl 4): S122-S126.
16. Kauer WK, Peters JH, DeMeester TR, Ireland AP, Bremner CG, Hagen JA. Mixed reflux of gastric and duodenal juices is more harmful to the esophagus than gastric juice alone. *Ann Surg* 1995, 222: 525-533.
17. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Eng J Med* 1999, 340: 825-831.
18. Lee JS, Oh TY, Ahn BO, Cho H, Kim WB, Kim YB, Surh YJ, Kim HJ, Hahm KB. Involvement of oxidative stress in experimentally induced reflux esophagitis and Barrett's esophagus: clue for the chemoprevention of esophageal carcinoma by antioxidants. *Mutat Res* 2001, 480-481: 189-200.
19. Melo LL, Kruel CD, Kliemann LM, Cavazzola LT, Boeno Rda L, Silber PC, Grossi RS. Influence of surgically induced gastric and gastroduodenal content reflux on esophageal carcinogenesis--experimental model in Wistar female rats. *Dis Esophagus*. 1999, 12(2): 106-115.
20. Miwa K, Sahara H, Segawa M, Kinami S, Sato T, Miyazaki I, Hattori T. Reflux of duodenal contents induces esophageal carcinoma in rats. *Int J Cancer*. 1996, 67: 269-274.
21. Morse D, Choi AMK. Heme-oxygenase-1-The "Emerging Molecule" has arrived. *Am J Resp. Cell Mol. Biol.* 2002, 27: 8-16.



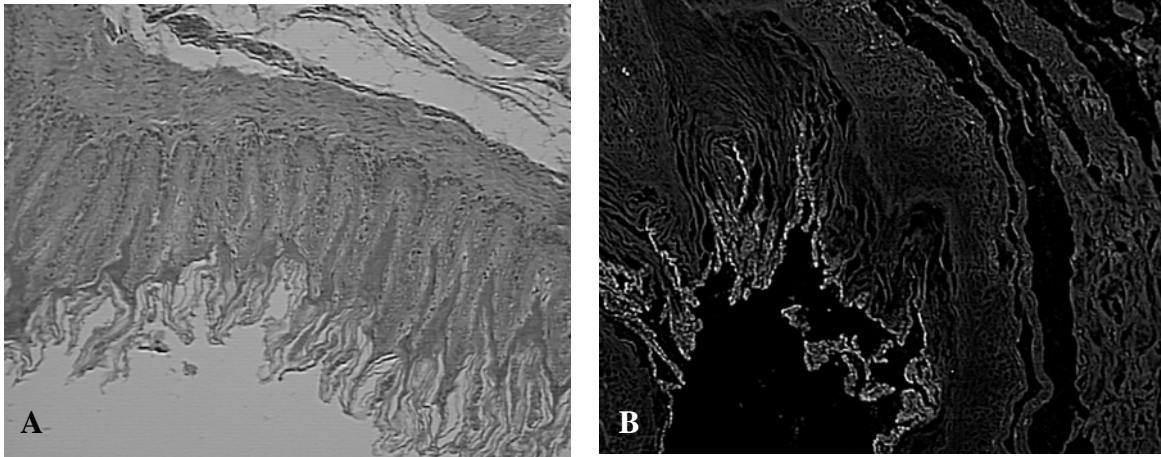
22. Nehra D, Howell P, Williams CP, Pye JK, Beynon J. Toxic bile acids in gastro-oesophageal reflux disease: influence of gastric acidity. *Gut* 1999, 44: 598-602.
23. Ohsima H, Tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2003, 417: 3-11.
24. Pera M, Cardesa A, Bombi JA, 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* 1989, 49: 6803-6808.
25. Shimoda R, Nagashima M, Sakamoto M, Yamaguchi N, Hirohashi S, Yokota J, Kasai H. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Res* 1994, 54: 3171-3172.
26. Sihvo EI, Ruohtula T, Auvinen M. Simultaneous progression of oxidative stress and angiogenesis in malignant transformation of Barrett esophagus. *J Thorac Cardiovas Surg*, 2003, 126(6): 1952-1957.
27. Sunamura M, Duda DG, Ghattas MH, Lozonschi L, Motoi F, Yamauchi J, Matsuno S, Shibahara S, Abraham NG. Heme-oxygenase-1 accelerates tumor angiogenesis of human pancreatic cancer. *Angiogenesis* 2003, 6: 15-24.
28. Tenhunen R, Marver HS, Schimidt R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968, 61: 748-755.
29. Torisu-Itakura H, Furue M, Kuwano M, Ono M. Co-expression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanomas. *Jpn J Cancer Res* 2000, 91: 906-910.
30. Tsuji MH, Yanagawa T, Iwasa S, Tabuchi K, Onizawa K, Bannai S, Toyooka H, Yoshida H. Heme oxygenase-1 expression in oral squamous cell carcinoma as involved in lymph node metastasis. *Cancer Lett* 1999, 138: 53-59.
31. Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 2046-2050.
32. Wild CP, Hardie LJ. Reflux, Barrett's Esophagus and Adenocarcinoma: Burning Questions. *Nature* 2003, 3: 676-684.

33. Willis D, Moore AR, Willoughby DA. Heme oxygenase isoform expression in cellular and antibody-mediated models of acute inflammation in the rat. *J Pathol* 2000, 190: 627-634.
34. Jang TJ, Min SK, Bae JD, Jung KH, Lee JI, Kim JR, Ahn WS. Expression of cyclooxygenase 2, microsomal prostaglandin E synthase 1, and EP receptors is increased in rat oesophageal squamous cell dysplasia and Barrett's metaplasia induced by duodenal contents reflux. *Gut* 2004, 53: 27-33.
35. Victora CG, Munoz N, Day NE, Barcelos LB, Peccin DA, Braga NM. Hot beverages and oesophageal cancer in southern Brazil: A case-control study. *Int J Cancer* 1987, 39: 710-716.
36. Castellsagué X, Muñoz N, De Stefani E, Victora CG, Castelletto R, Rolón PA. Influence of hot mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. *Int J Cancer* 2000, 88: 658-664.

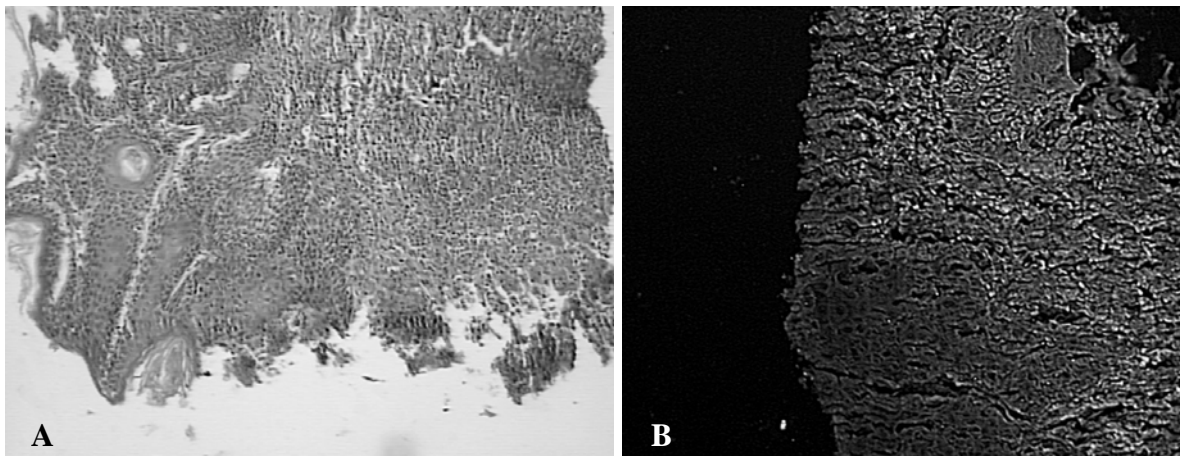
Figure 1



**Figure 1.** Model of gastroesophageal reflux (cardioplasty) (A) and model of duodeno-esophageal reflux (esophagoduodenostomy) (B).



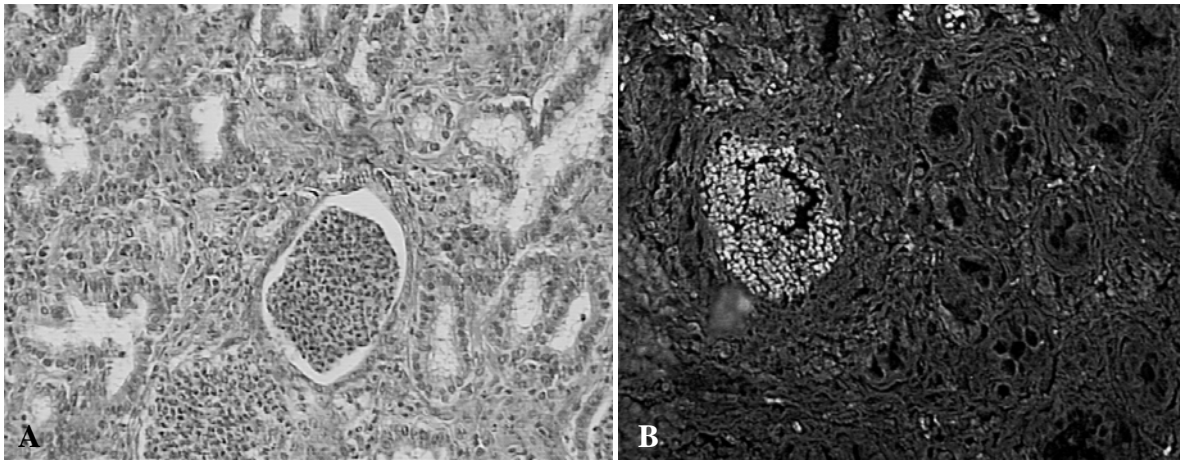
**Figure 2.** Histological analysis and HO-1 expression in esophageal tissue slice presenting papillary hyperplasia from rats exposed to gastroesophageal reflux plus DEN. Tissue slices were stained for histology (A) and immunohistochemistry for HO-1 (B). Unspecific immunolabeling was observed in keratin layer. No significant staining was detected in epithelial or subepithelial areas. Magnification: 100x.



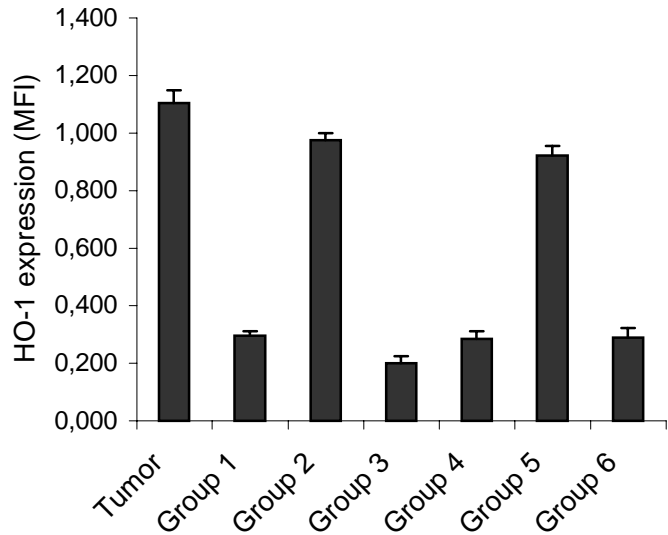
**Figure 3.** Histological analysis and HO-1 expression in esophageal tissue slice presenting adenocarcinoma from rats exposed to duodeno-esophageal reflux. Micrograph

(A) shows adenocarcinoma with intense inflammatory infiltrate. Almost the same area HO-1 was highly expressed in inflammatory infiltrate cells inside glandular arrangement (B).

Magnification: 200x.



**Figure 4.** Histological analysis and HO-1 expression in esophageal tissue slice presenting squamous esophageal epithelia from rats exposed to duodeno-esophageal reflux. Squamous esophageal epithelia and adjacent erosion with severe esophagitis (A). The HO-1 expression was intense in erosion inflammatory cells and also in subepithelial area inflammatory infiltrate below squamous cell epithelia (B). Arrows indicate HO-1 labeling in erosion and subepithelial area. Magnification: 200x.



**Figure 5.** Mean of fluorescence intensity of HO-1 expression in esophageal tissue slices from different experimental models of reflux. Tissue slices were immunolabelled for HO-1, visualized by fluorescence microscopy and fluorescence intensity was analyzed by Image-Pro Plus 4.0 software. Tumor fluorescence (column 1) represents only adenocarcinoma stromal tissue developed in rats of group 2. The measure of fluorescence intensity is presented as mean + SD from three samples of each group. \*  $p < 0.05$  compare to control values.

**Table I.** Correlation between histopathological features and HO-1 expression in distal esophagus in different reflux experimental models

<b>Groups</b>	<b>Histopathological analysis</b>	<b>HO-1 expression</b>
Group 1: Gastroesophageal reflux (n=3)	1-Stage I	
	2-Stage II	All
	3-Stage II	negative
Group 2: Duodeno-esophageal reflux (n=3)	1-Stage III	
	2- Stage VI	All
	3- Stage VI	positive
Group 3: Control (n=2)	1-Stage I	
	2- Stage I	All
		negative
Group 4: Gastroesophageal reflux plus DEN (n=3)	1-Stage II	
	2-Stage II	All
	3-Stage II	negative
Group 5: Duodeno-esophageal reflux plus DEN (n=3)	1-Stage VI	
	2-Stage VI	All
	3-Stage VI	positive
Group 6: DEN (n=3)	1-Stage II	
	2-Stage II	All
	3-Stage II	negative

## **Expressão de HO-1 durante a Progressão Esofagite- Carcinoma em Diferentes Modelos Experimentais de Refluxo**

### **Abstract**

Sabe-se que o refluxo crônico pode induzir lesão mucosa, estimular a proliferação de células e promover tumorigênese no esôfago distal. Ainda não é sabido por que apenas uma parcela dos pacientes com refluxo esofágico progrediram para uma metaplasia intestinal (Esôfago de Barrett) e adenocarcinoma. O estresse oxidativo parece exercer um papel importante nessa progressão . Assim sendo, examinamos o padrão de expressão da enzima Heme Oxigenase-1 (HO-1), enzima indutora do estresse oxidativo, em peças de esôfago obtidos de um estudo experimental com ratos que avaliou o papel do refluxo gástrico e duodeno-esofágico na carcinogênese esofágica.

Métodos: Uma amostra de três (3) peças de esôfago de cada grupo de ratos submetidos a tratamentos diferentes tiveram a expressão da enzima Heme Oxigenase-1 avaliada através de imunohistoquímica. Os ratos foram divididos nos seguintes grupos: (1) cardioplastia para induzir refluxo predominantemente gástrico, (2) anastomose esofagoduodenal para induzir refluxo duodenal, (3) sem tratamento, (4) cardioplastia+dietilnitrosamina (DEN), (5) anastomose esofagoduodenal +DEN, (6) DEN .

Resultados: Não houve desenvolvimento de câncer ou metaplasia intestinal nos animais que não foram expostos ao refluxo de conteúdo duodenal. A expressão de HO-1 foi observada apenas em ratos submetidos à anastomose



esofagoduodenal (Grupos 2 e 5) e a análise da média de intensidade de fluorescência demonstrou uma diferença significativa de expressão de HO-1 (4,8 e 4,6 vezes respectivamente) comparando-se ao controle (Grupo 3) ( $p < 0,05$ ). O alvo principal para expressão da HO-1 foram as células inflamatórias dentro do tumor ou em áreas subepiteliais. Os ratos expostos ao refluxo gástrico não desenvolveram tumores ou expressaram a HO-1.

Conclusões: A esofagite de refluxo induzida por refluxo esofágico com conteúdo duodenal provocou estresse oxidativo considerável e pode desempenhar um papel importante na carcinogênese esofágica. O refluxo gástrico não foi suficiente para induzir estresse oxidativo neste modelo experimental.

## **Introdução**

O câncer esofágico é a oitava causa mais comum de câncer no mundo e tem recebido atenção considerável nos últimos anos devido ao rápido aumento do sub-tipo histológico adenocarcinoma nos países ocidentais (1, 2). O prognóstico permanece sombrio com uma sobrevida de 5 anos de 10%(3). Assim sendo, é importante compreender a sua patogênese e desenvolver estratégias para a prevenção dessa doença fatal.

É aceito que o desenvolvimento do adenocarcinoma esofágico segue uma seqüência que passa pela metaplasia,displasia até o carcinoma e o refluxo gastroesofágico crônico é um fator de risco para o desenvolvimento de Esôfago de Barrett(BE) e adenocarcinoma (4, 5). Contudo apenas 10% dos indivíduos com refluxo desenvolvem esôfago de Barrett (BE) e o risco estimado no decorrer da

vida de um indivíduo de meia idade com BE de desenvolver adenocarcinoma é de 10-15% (6, 7). Outros fatores, além do conteúdo ácido do refluxo, poderiam também contribuir para a progressão do epitélio normal até BE e câncer. Em pacientes com doença de refluxo gastroesofágico, a concentração de ácidos biliares no conteúdo refluído está correlacionada com o grau de lesão da mucosa esofágica (8). Ademais o refluxo misto com conteúdo gástrico e duodenal é mais comum em pacientes com BE do que em sujeitos normais (8, 9). Os mecanismos exatos através dos quais o refluxo duodenal causa lesão esofágica e câncer são incertos. Uma força indutora pode ser o estresse oxidativo (10, 11).

A inflamação crônica induzida por fatores biológicos, químicos e físicos foi associada com o risco aumentado de câncer humano em vários lugares, incluindo o esôfago (12-15). Um dos mecanismos propostos que contribuí para o desenvolvimento de câncer esofágico é através da ativação de células inflamatórias que induzem e ativam várias enzimas pró-oxidativas. Essas enzimas produzem altas concentrações de radicais livres e espécies oxidantes. A exposição prolongada a este ambiente poderia levar à lesão das células hospedeiras, incluindo dano ao DNA, o que poderia facilitar a formação de tumores (16).

As células humanas, quando expostas à inflamação crônica e estresse oxidativo induzem a expressão de enzimas antioxidantes, tais como a heme oxigenase-1 (HO-1), óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2). Estas enzimas têm capacidade de mediar diretamente a resposta inflamatória ou contribuir para a resolução da inflamação (17, 18). A HO-1 desempenha um papel importante na homeostase celular, catalizando primeiro e

então limitando a taxa de degradação da molécula Heme em quantias equimolares de monóxido de carbono (CO), ferro e biliverdina, a qual é subseqüentemente reduzida a bilirrubina (19, 20). Dessa forma, a indução de HO-1 é considerada como um mecanismo celular adaptativo em resposta ao estresse oxidativo. O crescimento e proliferação de vários tipos de células foram relatados como sendo associados a expressão HO-1, e os efeitos antiapoptóticos, bem como os pró-angiogênicos são os dois mecanismos possivelmente implicados neste processo (21, 22). Deste modo, há evidências de que existe uma relação entre comportamento maligno e a expressão HO-1 tendo sido identificada atividade elevada de HO-1 em adenocarcinoma renal, linfossarcoma, hepatoma, melanoma e células escamosas de carcinoma (23-26). Também foi relatado que a HO-1 está expressa no câncer de esôfago de ratos, que foram expostos ao refluxo duodenogástrico mais suplementação de ferro (27). Contudo o efeito do refluxo de ácido isoladamente na indução da expressão de HO-1 no esôfago ainda não é bem compreendido.

No presente trabalho, investigamos a expressão de HO-1 no esôfago de ratos em diferentes modelos experimentais de refluxo conforme previamente estabelecido (28). Também apoiamos a hipótese de que é necessária a presença de refluxo de ácido acompanhado por conteúdo duodenal para induzir dano oxidativo.

## **Materiais e Métodos**

### **Modelo Experimental de Carcinogênese Esofágica em Ratos**

Espécimes esofágicos incluídos em parafina foram obtidos de um estudo experimental com ratos (29), o qual avaliou o papel do refluxo gástrico e duodeno-esofágico como promotores e indutores de carcinogênese esofágica.

Cento e dez ratos Wistar (fêmeas com 8 semanas de vida, 250-300g) foram usados no estudo inicial. Os ratos foram divididos em 5 (cinco) grupos de 20 animais em cada grupo e um grupo de controle com 10 animais. Os grupos 1 (um) e 4 (quatro) foram submetidos à cardioplastia para induzir o refluxo gastroesofágico. O esôfago terminal era isolado e realizava-se uma incisão longitudinal de 6mm na porção anterior da junção esôfago-gástrica, a qual era suturada transversalmente com pontos de fio de Prolene 7-0 semelhantes a piloroplastia Heinecke-Mikulicz (Fig. 1A). Uma esofagoduodenostomia foi realizada nos grupos 2 e 5 para induzir o refluxo duodeno-esofágico. Após liberação do duodeno e fechamento da junção gastroesofágica, foi feita uma anastomose esôfago-duodenal látero-lateral com fio de Prolene 6-0; a seguir, fechava-se a junção esofagogástrica com fios de sutura com Prolene 6-0. (Fig. 1B). Os animais operados nos grupos 4 e 5, bem como o grupo sem intervenção cirúrgica (grupo 6) receberam carcinogênico, dietilnitrosamina (DEN), obtido de Sigma (St. Louis, MO, USA; N-nitrosodioethylamine (Sigma Chemical 0756), frasco de 100 ml, densidade = 0,95g/ml, peso molecular 102,1, fórmula química = C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O). Diluída na água de beber, a solução foi administrada aos animais numa dose de 5mg/Kg/day, considerando um consumo médio diário de água por animal de 40ml.

O grupo 3 (10 ratos) não foi exposto a nenhum tratamento. Após 22 semanas, todos os ratos foram mortos com éter.

### **Análise Patológica**

Os tecidos esofágicos fixados com formalina, rotineiramente processados para inclusão em parafina e seções de 5 µm de cada bloco foram preparadas para avaliação histológica usando-se solução de hematoxilina-eosina (HE). Um patologista classificou os estágios histopatológicos de cada grupo experimental de acordo com a classificação previamente descrita por Mello et al (28), conforme abaixo:

Estágio I: esôfago normal, esofagite crônica leve, hiperplasia epitelial moderada ou baixa.

Estágio II: Hiperplasia epitelial acentuada, esofagite crônica moderada ou acentuada, papilomatose, ulceração.

Estágio III: Esôfago de Barrett (metaplasia intestinal).

Estágio IV: Displasia leve.

Estágio V: Displasia moderada ou acentuada.

Estágio VI: Adenocarcinoma ou carcinoma de células escamosas.

### **Dosagem Imunohistoquímica para Expressão de HO-1**

Uma amostra inicial foi selecionada com o objetivo de se estudar as alterações histopatológicas mais graves de cada grupo. Os 3 blocos de parafina que continham as alterações histopatológicas mais graves presentes em cada

grupo foram selecionados para realização da imunohistoquímica, com exceção do grupo 2 que foi incluída uma lâmina com esôfago de Barrett. Os blocos de parafina foram cortados com micrótomo para a obtenção de fatias com aproximadamente 4 micrômetros de espessura. Essas fatias de tecido foram montadas em lâminas de vidro silanizadas (Dako), desparafinizadas com uma solução de xileno e rehidratadas imediatamente. Os cortes de tecido foram permeabilizados em tampão salina fosfato (PBS), pH 7,4 contendo Triton X-100 0,01% por 5 minutos, lavados com PBS e incubados com 2% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) para o bloqueio dos sítios inespecíficos. As fatias de tecido foram incubadas com anticorpo policlonal anti-HO-1(1:50; Santa Cruz Biotechnology) durante toda noite a 4° C. Posteriormente o tecido foi lavado por 3 vezes com PBS e incubado por uma hora com anticorpo anti-IgG conjugado com biotina (1:50; Santa Cruz Biotechnology) seguido de uma incubação com estreptavidina conjugada com FITC(1:50; Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) por uma hora à temperatura ambiente. Lamínulas foram montadas sobre as fatias de tecido usando uma solução de propil gallato 20 mM e 20% de glicerol em PBS. A análise microscópica das imagens foi feita utilizando-se um microscópio de epifluorescência (Olympus BX40, Tokyo, Japan) equipado com filtros apropriados e objetivas de 20x, 40x e 100x de ampliação. A captura de imagem foi feita com uma câmera digital acoplada ao microscópio de fluorescência (CCD; Photometrics, Tucson, AR, USA). As imagens adquiridas foram analisadas através do software Adobe Photoshop.

A intensidade de fluorescência das imagens originais foi analisada com o software Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics) e as imagens cinzas foram

tiradas usando o software Adobe Photoshop. Um patologista também avaliou a expressão de HO-1 nos cortes de tecido de grupos experimentais como negativo ou positivo.

### **Análise Estatística**

A avaliação estatística foi feita usando-se o teste exato de Fisher e teste de qui quadrado. Os valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## **Resultados**

### **Análise histopatológica**

Uma vez que dez ratos morreram antes do experimento acabar, um total de 100 blocos de parafina contendo peças de esôfago estavam disponíveis. A análise histopatológica revelou que somente os ratos expostos ao refluxo duodeno-esofágico desenvolveram carcinoma do esôfago. Três ratos desenvolveram epitélio colunar especializado (Esôfago de Barrett) no grupo que foi submetido somente à anastomose esofagoduodenal (Grupo 2) e todas as lesões malignas encontradas neste grupo foram classificadas como adenocarcinoma. A incidência de câncer esofágico nos ratos tratados com anastomose esofagoduodenal mais DEN (Grupo 5) em água de beber foi de 76% (13 ratos), dos quais um desenvolveu adenocarcinoma e 12 ratos tiveram carcinoma de células escamosas. O epitélio esofágico no grupo de controle foi considerado normal (Estágio I). Com relação aos outros grupos, as alterações histológicas mais severas foram hiperplasia epitelial acentuada e esofagite (Estágio II; Tabela I). Embora tenha sido observado algum grau de esofagite nos grupos expostos ao refluxo de ácido, a intensidade do processo inflamatório foi leve se comparado com os grupos expostos ao refluxo duodenal.

### **Correlação entre a expressão de HO-1 e características histopatológicas**

Fizemos a avaliação da expressão HO-1 em cortes de tecido esofágico de três (3) ratos de cada grupo que apresentam as lesões histopatológicas mais



severas, e também incluímos uma amostra do Grupo 2 com epitélio colunar especializado (Esôfago de Barrett). Os grupos que não foram expostos ao conteúdo duodenal não expressaram HO-1 no esôfago. Mesmo considerando aqueles animais com alterações histopatológicas de Estágio II, não houve expressão significativa da HO-1 nos grupos 1, 3, 4 e 6 (Fig. 2 e Fig. 5). Em todos os cortes estudados de ratos submetidos à anastomose esofagoduodenal (Grupos 2 e 5). Os resultados da análise da intensidade média de fluorescência nos grupos expostos ao refluxo duodenal demonstraram uma diferença significativa de expressão de HO-1 (4,8 e 4,6 vezes respectivamente) (Fig. 5) quando comparados ao controle. Estes dados são semelhantes a intensidade média de fluorescência observada em cortes com tumores (5,5 vezes) (Fig. 5). A fim de identificar as células que apresentavam imunorreatividade para HO-1, examinamos simultaneamente a mesma área esofágica nos cortes corados em HE e naqueles marcados pela imunofluorescência. A partir dessa comparação, concluímos que a expressão de HO-1 não era uniformemente distribuída por todo o tecido esofágico. A expressão HO-1 foi mais intensa nas células inflamatórias (macrófagos, eosinófilos e linfócitos) diretamente abaixo do epitélio ou em áreas de erosão. O epitélio escamoso não expressou a HO-1 na mesma intensidade que as células inflamatórias (Fig. 3). Somente nos terços distal e médio do esôfago foram identificadas áreas com imunorreatividade para HO-1. Nenhuma expressão para HO-1 foi observada no terço superior do esôfago mesmo nos animais que desenvolveram adenocarcinoma.

Nos cortes contendo adenocarcinoma, a HO-1 estava expressa tanto nas células glandulares como também no estroma tumoral, mas a imunoreatividade

principal foi detectada em macrófagos e outras células inflamatórias (eosinófilos e linfócitos) (Fig. 4). Mesmo em áreas de tecido esofágico livres de carcinoma, a expressão da HO-1 foi intensa junto ao infiltrado células inflamatórias dos animais expostos ao refluxo duodenal (Fig. 3).. O mesmo perfil foi observado no tecido que continha carcinoma de células escamosas; as células inflamatórias foram as que mais expressaram a HO-1 .

Quando amostras de todos os animais expostos ao refluxo com conteúdo gástrico foram incluídas num grupo (n=6) e amostras dos animais expostos à secreção duodenal num outro grupo (=6), a expressão da HO-1 mostrou ser diferente entre estes dois tipos de modelos de refluxo ( $p < 0,05$ ; Tabela I).

## **Discussão**

A despeito do progresso na compreensão da relação entre adenocarcinoma esofágico e o refluxo gastroesofágico, poucos estudos têm explorado as causas dessa associação. Existem evidências de que o refluxo duodenogástrico por si causa metaplasia intestinal (Esôfago de Barrett) e adenocarcinoma em ratos, mesmo sem a exposição a carcinogênicos (28, 29). Em contraste, o refluxo com conteúdo gástrico isoladamente não foi capaz de induzir a seqüência metaplasia-carcinoma (30). Por outro lado, a exposição esofágica a um tipo misto de refluxo contendo secreções gástricas e duodenais foi implicada no desenvolvimento de Esôfago de Barrett em pacientes (8, 9), e isto pode explicar por que alguns pacientes não progridem à metaplasia e câncer. Embora os mecanismos exatos através dos quais o refluxo com conteúdo duodenal gera lesão esofágica e

predispõe à neoplasia não serem completamente compreendidos, existem evidências de que a inflamação crônica e o dano oxidativo podem desempenhar um papel importante na lesão do tecido (11, 15).

Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais de hidroxila ( $HO^-$ ) e óxido nítrico (NO) são moléculas oxidativas constantemente geradas *in vivo*, as quais são conhecidas por participar na sinalização de vias regulando o crescimento celular e o controlando o estado reduzido das células. Contudo, no processo inflamatório crônico elas podem ser produzidas em excesso, causando efeitos prejudiciais para o funcionamento celular peroxidação lipídica e dano ao DNA. A progressão do dano gerado pelo estresse oxidativo tem sido relacionado com o surgimento de câncer em humanos (31). No esôfago distal, Sihvo et al.(15) observaram que há um aumento progressivo de estresse oxidativo a medida que evolui a seqüência doença do refluxo-metaplasia-carcinoma, indicando que existe uma relação entre o dano oxidativo e a transformação maligna do epitélio esofágico.

Em condições fisiológicas os tecidos não expressam HO-1, e sua expressão é considerada uma resposta adaptativa que tem como objetivo para proteger as células do dano oxidativo. A indução da HO-1 também exerce efeito citoprotetor nas células neoplásicas através de propriedades anti-apoptóticas e angiogênicas (21, 26). No nosso estudo, os ratos expostos ao refluxo duodenal desenvolveram câncer e expressaram a HO-1 no tecido esofágico num padrão semelhante àquele demonstrado por Chen et al. (27), e a expressão menos intensa da HO-1 na célula glandular encontrada em nosso estudo pode ser atribuída ao fato de que não injetamos ferro intraperitoneal nos ratos. Uma vez

que encontramos áreas inflamatórias com alta expressão de HO-1 distante de lesões malignas, concordamos com outros autores que a progressão da seqüência de esofagite-metaplasia-adenocarcinoma está associada com o estresse oxidativo (15). Mesmo considerando que as alterações histológicas encontradas nos animais expostos ao refluxo gástrico foram menos graves do que aquelas identificadas nos animais expostos a refluxo duodenal, ficou claro que o refluxo de ácido não foi capaz de induzir um estresse oxidativo significativo neste modelo experimento. Portanto, a diferença de expressão da HO-1 nestes dois modelos de refluxo, pode ser um dos motivos pelos quais o refluxo gástrico isoladamente não tem capacidade de induzir adenocarcinoma esofágico.

Embora a doença de refluxo gastroesofágico não tenha sido associada com o carcinoma de células escamosas do esôfago (32), estudos com ratos demonstraram que o refluxo com conteúdo duodenal induz lesão epitelial de alto grau e adenocarcinoma, além de atuar como um co-carcinogênico para o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas quando um carcinogênico é administrados simultaneamente (29, 33, 34). Além disso, foi descrito que a lesão térmica crônica do esôfago causada por abuso de bebidas quentes pode estar envolvida no desenvolvimento de carcinoma de do esôfago (35, 36). De acordo com essas evidências, nossos resultados sugerem que o processo inflamatório crônico mediado por refluxo duodenal poderia levar ao desenvolvimento de carcinoma de células escamosas.

Em conclusão, o refluxo duodenal pode atuar como co-carcinogênico na patogênese do epitélio escamoso do esôfago de ratos. O estresse oxidativo parece ser o mediador do dano gerado pelo refluxo duodenal, conforme pudemos

observar pela expressão de HO-1 durante a transformação maligna do epitélio. Propomos que estudos adicionais sejam realizados enfocando marcadores de estresse oxidativo no epitélio esofágico, assim esses marcadores poderiam ser úteis na identificação dos pacientes com risco de progressão para doença maligna.

## Referências

1. Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraunemi JF. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *J Am Med Assoc* 1991, 265: 1287-1289.
2. Buttar NS, Falk GW. Pathogenesis of gastroesophageal reflux and Barret's esophagus. *Mayo Clin Proc* 2001, 76: 226-34.
3. Campos GMR DeMeester SR, Peters JH, Öberg S, Crookes PF, Hagen JA, Bremner CG, Sillin III LF, Mason RJ, Tom R. DeMeester TR. Predictive factors of Barrett esophagus: multivariate analysis of 502 patients with gastroesophageal reflux disease. *Arch Surg* 2001, 136: 1267-1273.
4. DeMeester SR, Peters JH, DeMeester TR. Barret's esophagus. *Curr Probl Surg* 2001, 38: 558-640.
5. Farrow DC, Vaughan TL. Determinants of survival following the diagnosis of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Causes Control*, 1996, 7: 332-327.
6. Greenlee RT, Hill-Hamon MB, Murray T, Thun M. Cancer Statistics, 2001. *Cancer J Clin* 2001, 51: 15-36.
7. Wild CP, Hardie LJ. Reflux, Barrett's Esophagus and Adenocarcinoma: Burning Questions. *Nature* 2003, 3: 676-684.
8. Nehra D, Howell P, Williams CP, Pye JK, Beynon J. Toxic bile acids in gastro-oesophageal reflux disease: influence of gastric acidity. *Gut* 1999, 44: 598-602.
9. Kauer WK, Peters JH, DeMeester TR, Ireland AP, Bremner CG, Hagen JA. Mixed reflux of gastric and duodenal juices is more harmful to the esophagus than gastric juice alone. *Ann Surg* 1995, 222: 525-533.
10. Farhadi A, Fields J, Banan A, Keshavarzian A. Reactive oxygen species: are they involved in the pathogenesis of GERD, Barrett's esophagus, and latter's progression toward esophageal cancer? *Am J Gastroenterol*. 2002, 97: 22-26.
11. Lee JS, Oh TY, Ahn BO, Cho H, Kim WB, Kim YB, Surh YJ, Kim HJ, Hahm KB. Involvement of oxidative stress in experimentally induced reflux

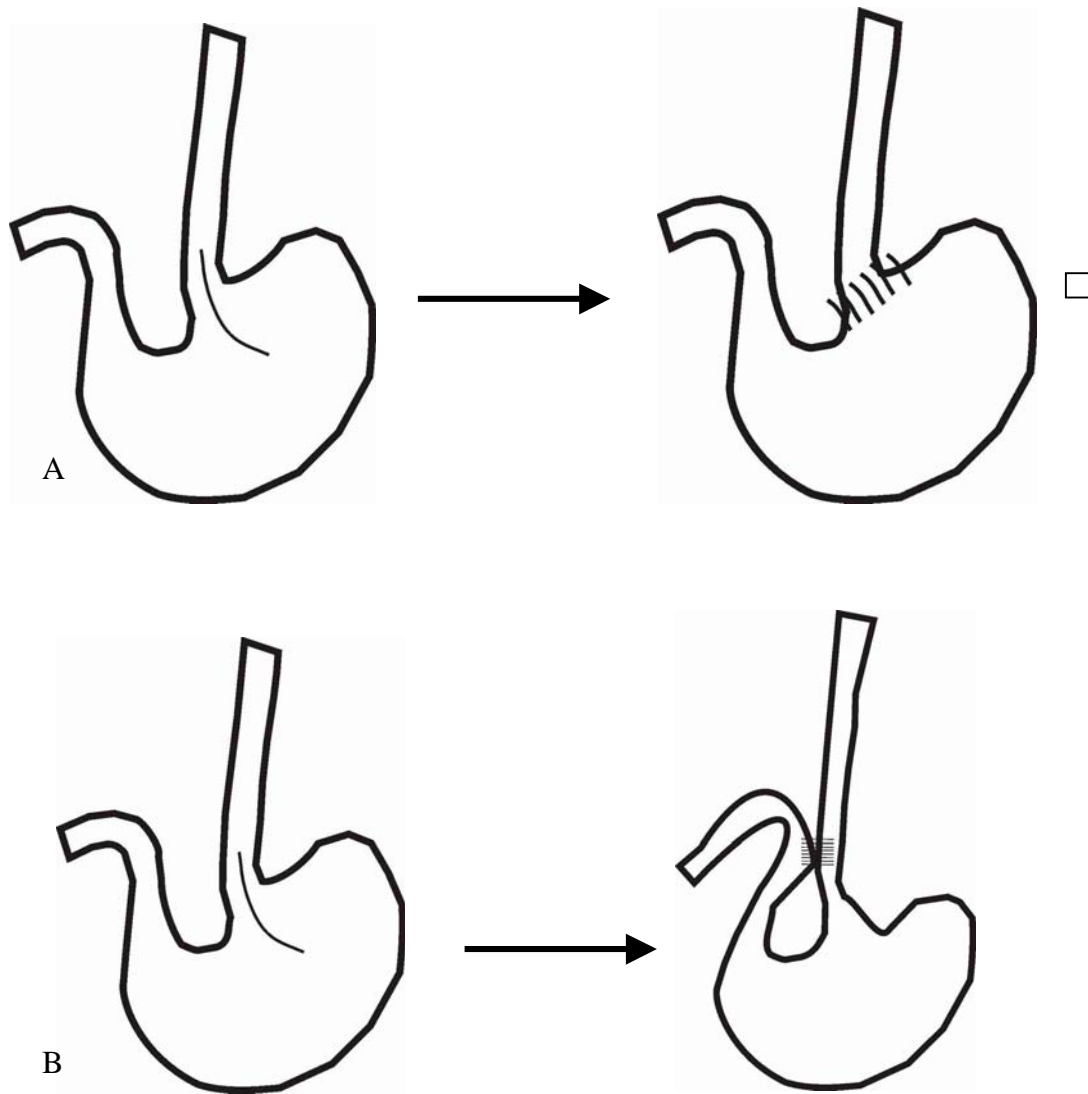
- esophagitis and Barrett's esophagus: clue for the chemoprevention of esophageal carcinoma by antioxidants. *Mutat Res* 2001, 480-481: 189-200.
12. Collins RH, Feldman M, Fordtran JS. Colon cancer, dysplasia and surveillance in patients with ulcerative colitis: a critical review. *N Engl J Med* 1987, 136: 1654-1658.
  13. Shimoda R, Nagashima M, Sakamoto M, Yamaguchi N, Hirohashi S, Yokota J, Kasai H. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Res* 1994, 54: 3171-3172.
  14. Holzinger F, Z'graggen K, Büchler MW. Mechanisms of biliary carcinogenesis: a pathogenic multi-stage cascade towards cholangiocarcinoma. *Ann Oncol* 1999; 10 (suppl 4): S122-S126.
  15. Sihvo EI, Ruohtula T, Auvinen M. Simultaneous progression of oxidative stress and angiogenesis in malignant transformation of Barrett esophagus. *J Thorac Cardiovas Surg*, 2003, 126(6): 1952-1957.
  16. Ohsima H, Tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2003, 417: 3-11.
  17. Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 2046-2050.
  18. Willis D, Moore AR, Willoughby DA. Heme oxygenase isoform expression in cellular and antibody-mediated models of acute inflammation in the rat. *J Pathol* 2000, 190: 627-634.
  19. Tenhunen R, Marver HS, Schmidt R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968, 61: 748-755.
  20. Morse D, Choi AMK. Heme-oxygenase-1-The "Emerging Molecule" has arrived. *Am J Resp. Cell Mol. Biol.* 2002, 27: 8-16.
  21. Fang J, Akaike T, Maeda H. Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis* 2004, 9: 27-35.
  22. Sunamura M, Duda DG, Ghattas MH, Lozonchi L, Motoi F, Yamauchi J, Matsuno S, Shibahara S, Abraham NG. Heme-oxygenase-1 accelerates tumor angiogenesis of human pancreatic cancer. *Angiogenesis* 2003, 6: 15-24.

23. Goodman AI, Choudhury M, da Silva JL, Schwartzman ML, Abraham NG. Overexpression of the heme oxygenase gene in renal cell carcinoma. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997, 214: 54-61.
24. Tsuji MH, Yanagawa T, Iwasa S, Tabuchi K, Onizawa K, Bannai S, Toyooka H, Yoshida H. Heme oxygenase-1 expression in oral squamous cell carcinoma as involved in lymph node metastasis. *Cancer Lett* 1999, 138: 53-59.
25. Torisu-Itakura H, Furue M, Kuwano M, Ono M. Co-expression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanomas. *Jpn J Cancer Res* 2000, 91: 906-910.
26. Doi K, Akaike T, Fujii S, Tanaka S, Ikebe N, Beppu T, Shibahara S, Ogawa M, Maeda H. Induction of haem oxygenase-1 by oxide nitric and ischeamia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. *Br J Cancer* 1999, 80: 1945-1954.
27. Chen X, Ding Y W, Yang G et al. Oxidative damage in an esophageal adenocarcinoma model with rats. *Carcinogenesis* 2000, 21(2): 257-263.
28. Melo LL, Kruel CD, Kliemann LM, Cavazzola LT, Boeno Rda L, Silber PC, Grossi RS. Influence of surgically induced gastric and gastroduodenal content reflux on esophageal carcinogenesis--experimental model in Wistar female rats. *Dis Esophagus*. 1999, 12(2): 106-115.
29. Goldstein SR, Yang GY, Curtis SK, Reuhl KR, Liu BC, Mirvish SS, Newmark HL, Yang CS. Development of esophageal metaplasia and adenocarcinoma in rat surgical model without the use of a carcinogen. *Carcinogenesis*. 1997, 18: 2265-2270.
30. Miwa K, Sahara H, Segawa M, Kinami S, Sato T, Miyazaki I, Hattori T. Reflux of duodenal contents induces esophageal carcinoma in rats. *Int J Cancer*. 1996, 67: 269-274.
31. Cejas P, Casado E, Belda-Iniesta C, De Castro J, Espinosa E, Redondo A, Sereno M, Garcia-Cabezas MA, Vara JA, Dominguez-Caceres A, Perona R, Gonzalez-Baron M. Implications of oxidative stress cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain). *Cancer Causes Control* 2004, 15: 707-719.
32. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Eng J Med* 1999, 340: 825-831.
33. Pera M, Cardesa A, Bombi JA, Ernst H, Pera C, Mohr U. Influence of esophagojejunostomy on the induction of adenocarcinoma of the distal



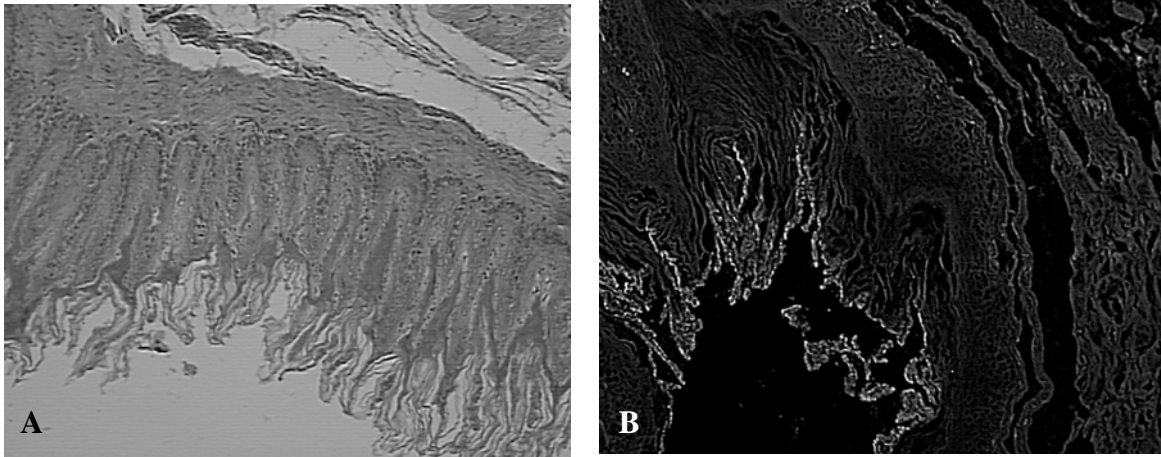
esophagus in Sprague-dawley rats by subcutaneous injection of 2,6-dimethylnitrosomorpholine. *Cancer Res* 1989, 49: 6803-6808.

34. Jang TJ, Min SK, Bae JD, Jung KH, Lee JI, Kim JR, Ahn WS. Expression of cyclooxygenase 2, microsomal prostaglandin E synthase 1, and EP receptors is increased in rat oesophageal squamous cell dysplasia and Barrett's metaplasia induced by duodenal contents reflux. *Gut* 2004, 53: 27-33.
35. Victora CG, Munoz N, Day NE, Barcelos LB, Peccin DA, Braga NM. Hot beverages and oesophageal cancer in southern Brazil: A case-control study. *Int J Cancer* 1987, 39: 710-716.
36. Castellsagué X, Muñoz N, De Stefani E, Victora CG, Castelletto R, Rolón PA. Influence of hot mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. *Int J Cancer* 2000, 88: 658-664.

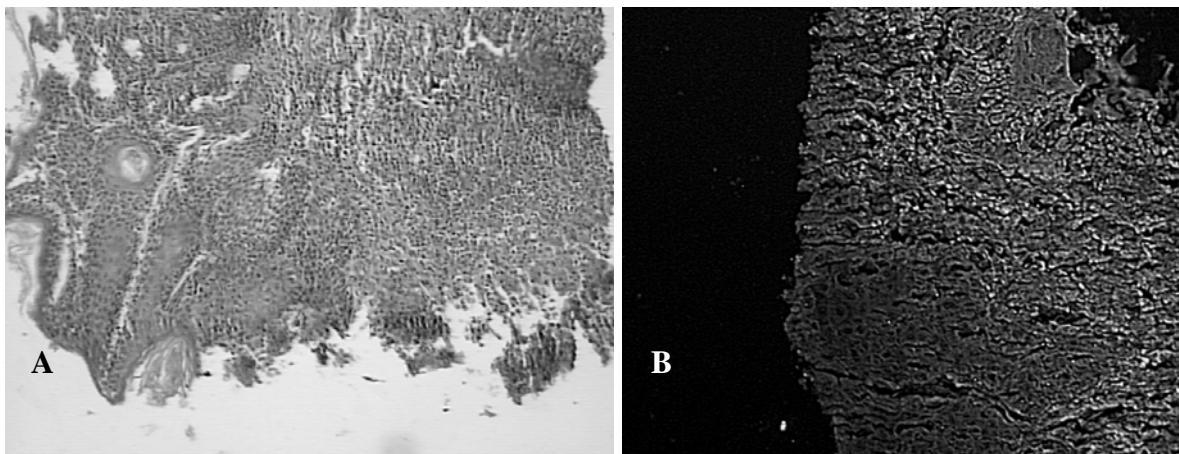


**Figura 1**

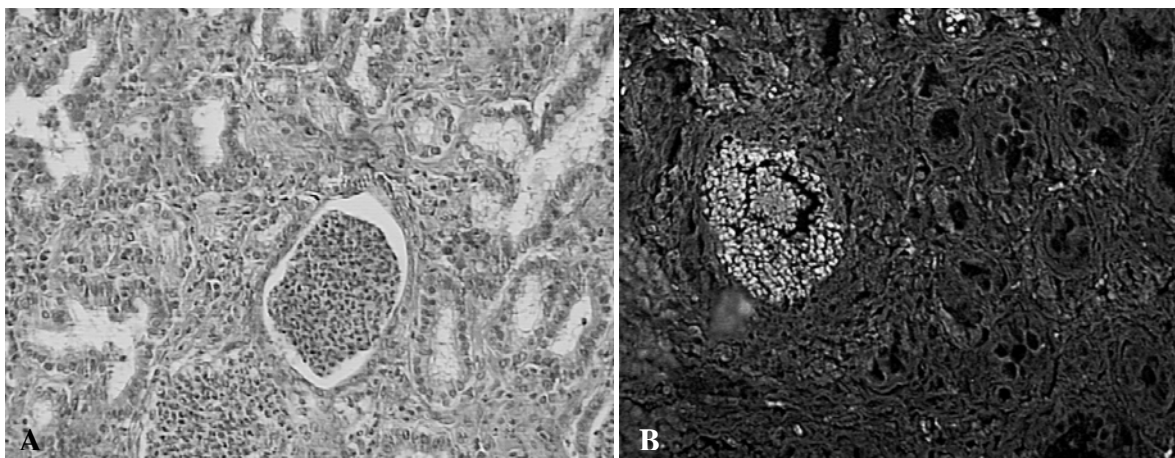
**Figura 1.** Modelo de refluxo gastroesofágico (cardioplastia) (A) e modelo de refluxo duodeno-esofágico (esofagoduodenostomia) (B).



**Figure 2.** Análise histológica e expressão de HO-1 no corte de tecido esofágico apresentando hiperplasia papilar em rato exposto ao refluxo gástrico mais DEN. Os cortes de tecido foram corados pelo HE para avaliação da histologia (A) e imunohistoquímica para HO-1 (B).O corte marcado para imunohistoquímica (b) demonstra uma marcação inespecífica na camada de queratina do epitélio e nenhuma marcação significativa foi detectada nas áreas epiteliais ou subepiteliais. Magnificação: 100x.



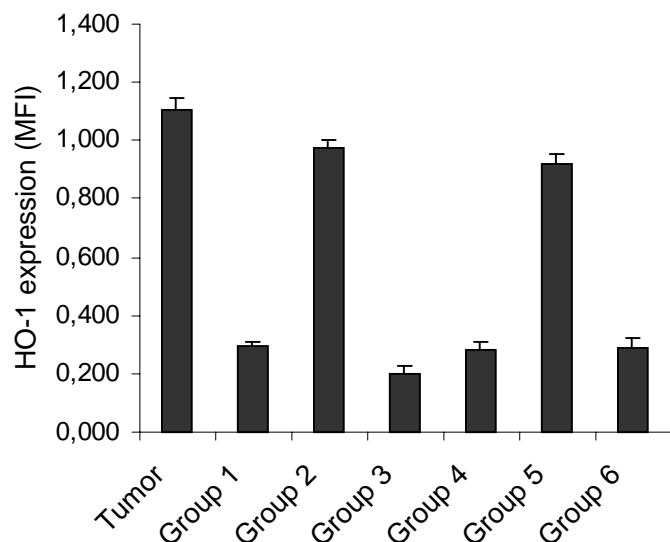
**Figura 3** Análise histológica e da expressão de HO-1 nos cortes de tecido esofágico apresentando epitélio escamoso de animal exposto ao refluxo duodeno-esofágico. No HE há área de epitélio escamoso e erosão adjacente com esofagite severa (A). A expressão da HO-1 foi intensa nas células inflamatórias presentes na área com erosão e também no infiltrado inflamatório da região subepitelial (B). As flechas mostram a marcação para HO-1 na erosão e na região subepitelial. Magnificação: 200x.



**Figura 4.** . Análise histológica e expressão imunohistoquímica da HO-1 no cortes de adenocarcinoma esofágico em animal exposto ao refluxo duodeno-esofágico. A Microfotografia (A) mostra adenocarcinoma com intenso infiltrado

inflamatório . Quase a mesma área marcada para HO-1, demonstra expressão acentuada em células inflamatórias infiltradas dentro do arranjo glandular (B).

Magnificação: 200X



**Figura 5.** A intensidade média da fluorescência referente a expressão da HO-1 nos cortes de tecido esofágico de modelos de refluxo experimentais diferentes. Os cortes de tecido foram marcados para expressão da HO-1 e visualizados por microscopia de fluorescência. Os valores referentes a intensidade da fluorescência foram obtidos após a análise com o Image-Pro Plus 4.0 software. A medida de intensidade da fluorescência está apresentada como uma média + DP nas três amostras de cada grupo. (\* $p < 0,05$  comparado aos valores do grupo controle).

**Tabela I.** A correlação entre as características histopatológicas e a expressão da HO-1 no esôfago distal nos diferentes modelos experimentais de indução de refluxo.

<b>Grupos</b>	<b>Análise Histopatológica</b>	<b>Expressão de HO-1</b>
	1-Estágio I	
Grupo 1: Refluxo gastroesofágico (n=3)	2- Estágio II 3- Estágio II	Todos negativos
	1- Estágio III	
Grupo 2: Refluxo duodeno-esofágico (n=3)	2- Estágio VI 3- Estágio VI	Todos positivos
	1- Estágio I	
Grupo 3: Controle (n=2)	2- Estágio I	Todos negativos
	1- Estágio II	
Grupo 4: Refluxo gastroesofágico mais DEN (n=3)	2- Estágio II 3- Estágio II	Todos negativos
	1- Estágio VI	
Grupo 5: Refluxo duodeno-esofágico mais DEN (n=3)	2- Estágio VI 3- Estágio VI	Todos positivos
	1- Estágio II	
Grupo 6: DEN (n=3)	2- Estágio II 3-Estágio II	Todos negativos