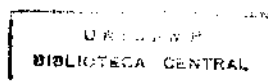


*JOSÉ AFONSO SALLET*

***CARCINOGENESE ESOFÁGICA EXPERIMENTAL :  
CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA HISTOGENESE DO  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE***

*Campinas, 1996*



***JOSÉ AFONSO SALLET***

***CARCINOGENESE ESOFÁGICA EXPERIMENTAL :  
CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA HISTOGENESE DO  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE***

*Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação, da  
Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Estadual  
de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em  
Cirurgia, área de concentração: Gastroenterologia  
Cirúrgica.*

**Orientador : PROF. DR. NELSON ADAMI ANDREOLLO**

*Campinas, 1996*

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - UNICAMP

Sallet, José Afonso

Sa31c      Carcinogênese esofágica experimental: contribuição ao estudo da  
histogênese do carcinoma epidermóide / José Afonso Sallet. Campinas, SP :  
[s.n.], 1996.

Orientador: Nelson Adami Andreollo

Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas.

1. Câncer. 2. Esôfago. 3. Nitrosamina. 4. Histologia. I. Nelson Adami  
Andreollo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências  
Médicas. III. Título.

**BANCA EXAMINADORA DA TESE DE MESTRADO**

**ORIENTADOR:** Nelson Adamsi Audrelio

Nelson Adamsi

**MEMBROS:**

1. Nelson Amor Brandão de Azevedo
2. Bruno Z. Martins
- 3.
- 4.
- 5.

**Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

**DATA:** 01/08/96

*À minha esposa Carla,*

*pelo amor estímulo e compreensão,*

*durante a realização desse trabalho.*

*À minha filha, Carolina, que  
a sua existência continue nos  
estimulando e dando um sentido  
maior as nossas vidas.*

*Aos meus pais, Antonio e  
Itália pelo amor e exemplo de  
esforço dedicados à minha  
formação moral e profissional.*

## *Agradecimentos*

---

*Ao Professor Nelson Adami Andreollo, Professor Livre-Docente do Departamento de Cirurgia da FCM - UNICAMP, orientador dessa pesquisa, pela amizade e dedicação durante a realização do trabalho, pessoa a qual aprendi a admirar pela humildade e eficiência com que transmite os seus conhecimentos, demonstrando toda a sua capacidade profissional como docente.*

*Ao Professor Bruno Zilberstein, Professor Livre-Docente do Departamento de Gastroenterologia da FM - USP, mestre e amigo de sempre, um exemplo a ser seguido de dedicação profissional e à vida universitária, a quem devo diretamente a minha formação como cirurgião, obrigado pela sua amizade, orientação e incentivo a minha carreira científico-profissional, o senhor nunca esteve cansado para me escutar e ajudar em minhas atividades profissionais.*

*Ao Dr. Filadelfio E. Venco, médico diretor do Serviço de Patologia da Unidade Diagnóstica, com especialização em patologia gastrointestinal na Universidade de Tsukuba, Japão. Agradeço a sua amizade e o tempo dedicado à análise histológica desse estudo, o seu conhecimento em patologia gastrointestinal permitiu a realização dessa pesquisa.*

*Ao Professor Luiz Sergio Leonardi, Professor Titular do Departamento de Cirurgia da FCM - UNICAMP, criador e líder de uma escola cirúrgica, a qual tive o privilégio de conviver nesses últimos dois anos, pela amizade e apoio dedicados na realização desse estudo.*

*Ao Professor Ivan Ceconello, Professor Livre-Docente do Departamento de Gastroenterologia da FM - USP, pela amizade e orientação na minha formação como cirurgião, a quem eu admiro e respeito como ser humano e pela sua competência científico-profissional.*

*Ao Professor Henrique Walter Pinotti, Professor Titular do Departamento de Gastroenterologia da FM - USP, criador e mestre de uma escola cirúrgica à qual tenho orgulho de pertencer.*



*Ao Professor Nelson Ary Brandalise, Professor-Adjunto e chefe do Grupo de Esôfago, Estômago e Duodeno do Departamento de Cirurgia da FCM - UNICAMP, pela amizade e apoio na realização dessa pesquisa.*

*Ao Professor Cleber Dario Pinto Krueel, chefe do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital das Clínicas de Porto Alegre. Professor-Adjunto do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela amizade e colaboração na realização dessa pesquisa, o seu estudo de carcinogênese esofágica experimental, pioneiro no Brasil, foi fonte de inspiração para realização do nosso estudo.*

*Ao Dr. Richard Gurski, mestre em cirurgia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela amizade e auxílio na revisão bibliográfica dos composto N-nitrosos.*

*Ao Dr. Luis Fernando Moreira, doutor em cirurgia pela Okayama University Medical School, Japan, pelo desprendimento e auxílio na revisão bibliográfica dos carcinomas precoces do esôfago.*

*Ao Dr. Luiz Felipe Ribeiro Pinto, doutor em Bioquímica pela Universidade de Londres, professor adjunto do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, pela amizade e orientação no estudo da carcinogênese esofágica induzida por compostos N-nitrosos.*

*À Dra. Cristina Helena Toledo Pelizon, patologista da Unidade Diagnóstica com especialização em patologia gastrointestinal na Tokyo Medical and Dental University, Japão, pela realização das fotos de microscopia apresentadas nesse estudo.*

*Ao Professor Kiyoshi Iriya, professor associado do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, médico diretor da Unidade Diagnóstica de patologia, pela amizade e apoio na realização dessa pesquisa.*

*Ao Dr. Roberto El Ibrahim, médico diretor da Unidade Diagnóstica de Patologia, com especialização em patologia gastrointestinal pela Harvard School of Medicine, USA e Tsukuba University, Japão, pela amizade e apoio na realização dessa pesquisa.*

*À Dra. Yoko Iriya, patologista da Unidade Diagnóstica, doutora em patologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, especialista em patologia gastrointestinal, pela Tokyo Medical College, pela amizade e apoio na realização dessa pesquisa.*

*Ao Professor Djalma Carvalho Moreira Filho, professor do Departamento de Medicina Preventiva e Social da FCM -UNICAMP, pela orientação da análise estatística dessa pesquisa.*

*Ao Prof.Dr. Juarez Fogliatto, Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Digestiva da U.F.S.M. - R.S., pelo incentivo e orientação na minha iniciação acadêmica.*

*Ao Dr. Almino Cardoso Ramos, médico diretor da Gastromed, pela amizade e espírito de equipe que permitiram dispor de tempo para realizar esse trabalho.*

*À Dra. Carla G.S. Sallet, Dra. Suely Nakano e ao Dr. Fidêncio Campos Jr., médicos do Serviço de Cirurgia Digestiva da Gastromed, cuja a dedicação profissional supriu a minha ausência durante a realização deste estudo.*

*Aos Acadêmicos Rony Eshkenazy, Alexandre Tsai e Rodrigo Bronze pela colaboração efetiva na revisão bibliográfica e auxílio na confecção gráfica desse estudo.*

*À Vera Lúcia Bazzana, pela amizade e abnegação com que auxiliou na digitação desse estudo.*

*À Rosana C.M. Ribeiro de Paiva, Bióloga do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da FCM - UNICAMP pela valiosa colaboração nos cálculos e diluição das drogas utilizadas.*

*À Ana Cristina de Moraes, Willian Adalberto Silva, Biólogos do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental e demais técnicos de laboratório, pelo auxílio e dedicação com que cuidaram dos animais nas fase experimentais desse trabalho, e a precisão dos resultados obtidos.*

*Ao Sr. Ismael Vêncio e Sra. Gisele C.F. Turini, técnicos do Laboratório de Anatomia Patológica, do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, pela colaboração e competência no preparo das lâminas para o estudo histológico.*

*À Seção de Apoio Didático da FCM/UNICAMP, em especial ao Sr. César A. Rodrigues pela documentação macroscópica; professora Maria Rita, pela correção de ortográfica e à Renata Maia e Jefferson Spindola, pela editoração desse trabalho.*

## **Sumário**

---

RESUMO.....	i
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Câncer do Esôfago.....	2
1.2. Fatores Etiológicos Envolvidos no Câncer Esofágico.....	2
1.3. Carcinogênese Esofágica induzida por Agentes Químicos.....	5
1.4. Modelos Experimentais de Câncer Esofágico usando Compostos N-Nitrosos..	6
1.5. Objetivos.....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.1. Material.....	12
2.1.1. Animais.....	12
2.1.2. Acondicionamento no Biotério.....	12
2.1.3. Droga utilizada.....	13
2.1.4. Solução e concentração utilizada.....	13
2.1.5. Materiais usados na análise macroscópica.....	13
2.1.6. Materiais usados na análise microscópica.....	14
2.2. Método.....	14
2.2.1. Grupos de animais.....	14
2.2.2. Preparo da solução.....	15
2.2.3. Delineamento experimental.....	15
2.2.4. Alimentação e administração do carcinógeno.....	16
2.2.5. Observação dos animais.....	16
2.2.6. Sacrifício dos animais e necropsia.....	17
2.2.7. Análise macroscópica.....	17

2.2.8. Fotocópia das peças.....	20
2.2.9. Análise microscópica.....	20
2.2.10. Classificação das lesões.....	22
2.2.11. Análise estatística.....	26
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
3.1. Controle de Peso dos Animais.....	28
3.2. Quantidades Ingeridas de Solução e de Água.....	28
3.3. Análise Macroscópica das Lesões Esofágicas .....	30
3.4. Análise Microscópica das Lesões Esofágicas.....	38
3.5 Correlação dos Achados Macroscópicos com a Microscopia dos Carcinomas Esofágicos em cada grupo .....	43
3.6. Correlação dos Achados Macroscópicos com os níveis de invasão Microscópica nos Carcinomas Microinvasivos e Submucosos do Esôfago .....	48
3.7. Correlação Percentual Global dos Achados Microscópicos com a Macroscopia dos Carcinomas Esofágicos .....	50
3.8. Localização dos Carcinomas Esofágicos .....	52
3.9. Índice de Mortalidade Global durante o Experimento .....	52
3.10. Análise Estatística.....	53
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
4.1. Dificuldades na Carcinogênese Química Experimental .....	63
4.2. Compostos N-Nitrosos e Carcinogênese Esofágica .....	64
4.3. Incidência de Câncer Esofágico em Modelos Experimentais .....	69
4.4. Uso do Lugol no Diagnóstico do Carcinoma Epidermóide do Esôfago.....	70
4.5. Lesões consideradas Precursoras do Carcinoma Epidermóide do Esôfago.....	73
4.6. Câncer do Esôfago: Classificação Histológica e Conduta Terapêutica.....	78

5. CONCLUSÃO.....	83
6. SUMMARY.....	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88
8. APÊNDICE.....	105

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático das lesões esofágicas superficiais tipo 0-III.....	19
Figura 2 - Fotocópia da peça cirúrgica do esôfago e estômago, evidenciando as lesões; esofágicas em analogia com esse conjunto fixado em solução de formalina.....	21
Figura 3 - Superposição da peça cirúrgica anteriormente descrita com a fotocópica desse conjunto, mostrando detalhes dos cortes macroscópicos por ordem numérica de 1 a 6.....	21
Figura 4 - Desenho esquemático mostrando os níveis de invasão microscópica do; carcinoma <i>In situ</i> , carcinoma microinvasivos (mm1,mm2 e mm3) e submucosos (sm1,sm2,sm3).....	24
Figura 5 - Peça cirúrgica retirada do animal, mostrando as divisões em terços superior, médio e inferior para demonstrar a padronização do diagnóstico microscópicos das lesões.....	25
Figura 6 - Peça cirúrgica do grupo T200 evidenciando lesões elevadas tipo Ip, Ipl e lesões superficiais tipo II a e II a com erosão(seta).....	34

Figura 7 - Peça específica do grupo T200 com lesão elevada tipo Ipl, lesão superficial tipo II a (seta) e hiperqueratose.....	34
Figura 8 - Peça cirúrgica do grupo T200 mostra, lesão plana tipo II a e lesão elevada tipo Ipl com erosão (seta).....	35
Figura 9 - Peça cirúrgica do grupo T120 mostrando lesão tipo II a (seta), com palidez de mucosa adjacente sugestiva de lesão superficial plana tipo II b.....	35
Figura 10 - Peça cirúrgica do grupo T200 mostrando lesão superficial tipo mista IIa + IIb.....	36
Figura 11 - Peça cirúrgica do grupo T120 mostrando lesão superficial tipo II a, lugol negativo.....	36
Figura 12 - Peças cirúrgicas do grupo T200, mostra lesão avançada tipo BORRMANN II, com várias lesões elevadas e superficiais em todo o esôfago. Além disso, nota-se presença de metástases pulmonar e hepática.....	37
Figura 13 - Microfotografia mostrando aspecto histológico do esôfago normal com aumento de 100 vezes (grupo T0).....	55
Figura 14 - Microfotografia com aumento de 200 vezes mostrando esofagite, notar presença de células inflamatórias no epitélio esofágico (grupo T90).....	55
Figura 15 - Microfotografia de esôfago normal com aumento de 200 vezes (grupo T0).....	56
Figura 16 - Microfotografia evidenciando expansão papilar do epitélio, caracterizando um papiloma com aumento de 200 vezes (grupo T200).....	56

Figura 17 - Microfotografia mostrando alterações de maturação celular com atípias evidentes restritas ao epitélio plano (tipo II b). Carcinoma <i>In situ</i> aumento 100 vezes (grupo T200).....	57
Figura 18 - Microfotografia mostrando o carcinoma <i>In situ</i> da Figura 17 com aumento de 200 vezes, nota-se limite preciso da invasão epitelial (grupo T200).....	57
Figura 19 - Microfotografia mostrando carcinoma microinvasivo mm1, nota-se a progressão de um carcinoma intraepitelial invadindo superficialmente a lâmina própria. Aumento de 40 vezes (grupo T200).....	58
Figura 20 - Microfotografia mostrando carcinoma microinvasivo mm1 da Figura 19 com aumento de 100 vezes, nota-se o detalhe da invasão superficial da lâmina própria (grupo T200).....	58
Figura 21 - Microfotografia mostrando carcinoma microinvasivo mm2 com invasão superficial mais acentuada da lâmina própria, aumento de 40 vezes (grupo T200).....	59
Figura 22 - Microfotografia mostrando carcinoma microinvasivo mm2 da Figura 21 com aumento de 100 vezes, nota-se um crescimento superficial (“superficial spreading”) até o terço médio da lâmina própria (grupo T200).....	59
Figura 23 - Microfotografia mostrando carcinoma microinvasivo mm3, nota-se invasão superficial da <i>muscularis mucosae</i> , aumento de 100 vezes (grupo T200).....	60
Figura 24 - Microfotografia mostrando carcinoma submucoso sm1, nota-se invasão superficial da submucosa, aumento de 40 vezes (grupo T200).....	60



Figura 25 - Microfotografia mostrando carcinoma submucoso sm2, nota-se invasão mais profunda da submucosa, aumento de 100 vezes (grupo T200)..... 61

Figura 26 - Microfotografia mostrando carcinoma submucoso sm3, nota-se invasão evidente de toda a submucosa, rebatendo a muscular própria, aumento 100 vezes (grupo T200)..... 61

### **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Mostra a distribuição dos animais nas gaiolas, separados pelo sexo e o número de ratos utilizados no experimento em cada grupo: T0, T90, T120, T150 e T200..... 14

Tabela 2 - Mostra o controle de peso dos animais durante o experimento nos grupos T0, T90, T120, T150 e T200..... 28

Tabela 3 - Mostra o volume de água ingerido durante o experimento no grupo T0 e o volume de DEN ingeridos pelos grupos T90, T120, T150 e T200..... 28

Tabela 4 - Mostra a correlação absoluta e percentual dos achados macroscópicos nos grupos T0, T90, T120, T150 e T200..... 33

Tabela 5 - Mostra a correlação absoluta e percentual entre os diferentes grupos de animais (T0, T90, T120, T150 e T200) e a classificação microscópicas dos carcinomas, sem considerar as subdivisões dos carcinomas microinvasivos e submucosos..... 42

Tabela 6 - Mostra a correlação absoluta e percentual entre os diferentes grupos de animais (T0, T90, T120, T150 e T200) e a classificação microscópicas dos carcinomas, considerando as subdivisões dos carcinomas microinvasivos e submucosos..... 42

Tabela 7 - Mostra o número de óbitos ocorrido nos diferentes grupos de animais, identificando o sexo e o volume de DEN ingerido durante todo o experimento.....	53
Tabela 8 - Mostra a correlação de carcinomas obtidos agrupando-se os grupos T120 e T150, comparando-os com o grupo T200.....	54
Tabela 9 - Mostra alguns autores que utilizaram a DEN em carcinogênese esofágica experimental.....	69

### **LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1A - Mostra o volume de água consumido pelo grupo T0 e o volume de DEN consumido pelos grupos T90, T120, T150 e T200, considerando o volume médio ingerido por animal/dia e o volume médio consumido por gaiola/dia.....	29
Gráfico 1B - Mostra o volume total de água consumido pelo grupo T0 e o volume total de DEN consumido pelos grupos T90, T120, T150 e T200 durante todo o experimento.....	29
Gráfico 2 - Mostra os tipos de lesões macroscópicas encontradas no grupo T120.....	31
Gráfico 3 - Mostra os tipos de lesões macroscópicas encontradas no grupo T150.....	32
Gráfico 4 - Mostra os tipos de lesões macroscópicas encontradas no grupo T200.....	33
Gráfico 5 - Mostra o diagnóstico microscópico dos carcinomas do grupo T120.....	38
Gráfico 6 - Mostra o diagnóstico microscópico dos carcinomas microinvasivos e submucosos do grupo T120.....	39
Gráfico 7 - Mostra o diagnóstico microscópico dos carcinomas no grupo T150.....	40

Gráfico 8 - Mostra o diagnóstico microscópico dos carcinomas microinvasivos e submucosos do grupo T150.....	40
Gráfico 9 - Mostra o diagnóstico microscópico dos carcinomas no grupo T200.....	41
Gráfico 10 - Mostra o diagnóstico microscópico dos carcinomas microinvasivos e submucosos do grupo T200.....	41
Gráfico 11 - Mostra a correlação dos achados macroscópicos (lesões tipo Ip, II a e II b) com o diagnóstico microscópico do grupo T120.....	44
Gráfico 12 - Mostra a correlação dos achados macroscópicos (lesões tipo II c, II b + II c, BORRMANN I e II) com o diagnóstico microscópico do grupo T120.....	44
Gráfico 13 - Mostra a correlação dos achados macroscópicos (lesões tipo Ip, Ipl, II a e II b) com o diagnóstico microscópico do grupo T150.....	45
Gráfico 14 - Mostra a correlação dos achados macroscópicos (lesões tipo Ip, Ipl, II a, II b e II c) com o diagnóstico microscópico do grupo T200.....	47
Gráfico 15 - Mostra a correlação dos achados macroscópicos (lesões tipo II a + II b, II b + II c, I + II c, BORRMANN II e III) com o diagnóstico microscópico do grupo T200.....	47
Gráfico 16 - Mostra a correlação percentual global do estudo microscópico (Carcinomas <i>In situ</i> , microinvasivos e submucosos) com os achados macroscópicos dos 183 carcinomas diagnosticados nos grupos T120, T150 e T200.....	51
Gráfico 17 - Mostra a correlação percentual global do diagnóstico microscópico dos carcinomas invasivos do esôfago e as lesões em outros órgãos com a macroscopia nos grupos T120, T150 e T200.....	51



*Resumo*

Esta pesquisa refere-se ao estudo da histogênese do carcinoma espidermóide do esôfago. Para tal foi utilizado como modelo experimental o rato WISTAR ingerindo o carcinógeno dietilnitrosamina (DEN) na dose de 10mg/kg de peso. Os animais foram divididos em gaiolas contendo cinco cada uma, separados pelo sexo. Objetivando reconhecer alterações morfológicas distintas nas lesões, foi estabelecido um cronograma de sacrifícios de acordo com o tempo de exposição a droga, à saber: T0 - grupo controle (dez animais), só ingeriram água durante todo o tempo do experimento; T90 - (dez animais); T120 - (vinte animais); T150 - (cinco animais); T200 - (Vinte animais), que ingeriram DEN, e foram sacrificados nesses tempos determinados.

O estudo macroscópico e coloração com lugol foram realizados à fresco, sendo que a classificação macroscópica seguiu a Escola Japonesa. Foram diagnosticados, nos trinta animais sobreviventes dos grupos T120, T150 e T200, 183 carcinomas esofágicos, com média de 6.1% focos de carcinoma por esôfago examinado. As lesões macroscópicas diagnosticadas foram: tipo Ip - onze carcinomas (6,01%), tipo Ipl - oito carcinomas (4,37%), tipo II a 33 carcinomas (18,05%), tipo II b - 102 carcinomas (55,73%), tipo II c cinco carcinomas (2,73%), tipo misto - nove carcinomas (4,92%), BORRMANN I - três carcinomas (1,64%), BORRMANN II - cinco carcinomas (2,73%) e BORRMANN III - sete carcinomas (3,82%).

A classificação microscópica desses 183 carcinomas também seguiu os parâmetros da Escola Japonesa. Foram diagnosticados 119 carcinomas *In situ*, restritos ao epitélio (65,02%) e 24 carcinomas microinvasivos os quais invadiam a mucosa (13,11%). Desses, sete eram mm1 (3,82%), 15 mm2 (8,19%) e dois mm3 (1,09%). Os carcinomas submucosos apresentavam níveis de invasão diferentes da submucosa. Foram diagnosticados 25 carcinomas submucosos (13,66%), destes 12 eram sm1 (16,55%); dez sm2 (5,46%) e três sm3 (1,63%). Ocorreram 15 carcinomas invasivos (8,19%).

O teste estatístico do Qui-Quadrado mostrou uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os níveis de invasão dos carcinomas dos grupos T120 e T150 versus T200, sendo que o grupo T200 apresentou maior número de lesões invasivas.

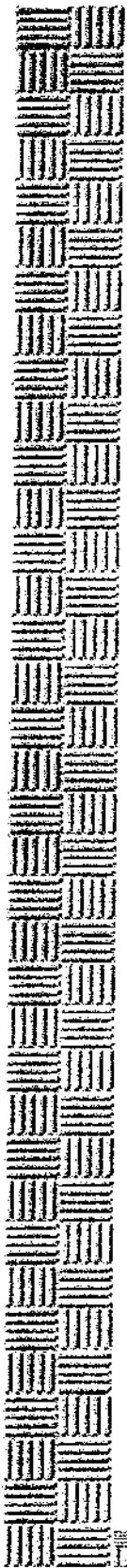
Foi observado que as lesões elevadas tipo Ip e Ipl, apresentaram níveis de invasão predominantemente de submucosa em 61,11% dos casos, (11/18). Por outro lado as lesões superficiais tipo II a apresentaram níveis de invasão restritos predominantemente à mucosa em 70,8% dos casos (17/24) e as lesões superficiais tipo II b foram todas restritas ao epitélio representando 85,7% (102/119) dos carcinomas *In situ*

Os resultados desse estudo Estão em concordância com a literatura no sentido de que as lesões elevadas tendem a serem mais invasivas, enquanto que as lesões planas tipo II b e II a são restritas predominantemente ao epitélio e a mucosa respectivamente.

Um dos objetivos desse estudo foi obter as possíveis diferenciações histológicas entre displasias e carcinoma *In situ* (neoplasia intra-epitelial). A análise histológica não mostrou nenhum caso de displasia, sendo que as alterações de maturação celular nas neoplasias epiteliais foram semelhantes aos carcinomas microinvasivos, submucosos e invasivos, portanto foram classificadas como carcinoma *In situ*.

É importante considerar que talvez ocorra a presença de um genótipo tumoral já no início da multiplicação celular que atinge uma expressão fenotípica de carcinoma podendo então ser diretamente reconhecida.

A principal dificuldade na terminologia consiste em usar duas expressões (displasia e carcinoma *In situ*), para designar o mesmo processo biológico. O problema mais significativo decorrente disso é que dependendo da terminologia usada, pode-se determinar condutas terapêuticas distintas para uma mesma doença, com prejuízos óbvios para o paciente.



## ***1. Introdução***

## **1.1. CÂNCER DO ESÔFAGO**

O câncer do esôfago é considerado a quarta neoplasia que mais frequentemente acomete o aparelho digestivo do homem.

Existe uma característica epidemiológica marcante dessa doença que é a de apresentar zonas endêmicas, com alto índice de incidência e mortalidade. Tem uma incidência prevalente nas regiões banhadas pelo mar Cáspio, nordeste do Irã, planícies do Turquistão, norte do Afeganistão e norte da China (GHADIRIAN, THOUÉZ, SINARD, 1988).

Encontram-se, também, zonas de alta ocorrência na África do Sul, na Índia (Bombaim), no norte da França e na América do Sul, em sua posição setentrional (GHADIRIAN et al., 1988).

No norte da China, nas províncias de Henan, Hebei e Shanxi, a incidência da doença é tão elevada que chega a 170 casos por 100.000 habitantes, por ano, com mortalidade anual de 53,96 / 100.000 habitantes (GHADIRIAN et al., 1988; KRÜEL, 1992).

No Brasil, o Rio Grande do Sul é considerado uma zona de média ocorrência, com 27 casos / 100.000 habitantes, por ano, em várias micro-regiões (PROLLA, 1992).

## **1.2. FATORES ETIOLÓGICOS ENVOLVIDOS NO CÂNCER ESOFÁGICO**

A população composta por homens idosos (acima de 60 anos), usuários crônicos de tabaco e álcool, possuem maior risco de desenvolver o carcinoma epidermóide de esôfago.

Os fumantes têm um risco cinco vezes maior de desenvolver a doença, sendo que este aumenta ainda mais com o uso combinado de álcool, principalmente bebidas destiladas (BLOT, 1994).



No sul da Europa e Estados Unidos, o fumo e o álcool também são os principais fatores epidemiológicos envolvidos, com uma prevalência de quatro homens para uma mulher (STEMMERMANN et al., 1994).

Além destes fatores, concluiu-se também que, nos países de alta incidência de câncer esofágico (China, Irã e Índia-Bombaim), foi constatado que a dieta ingerida habitualmente é pobre em betacaroteno, vitamina C e vitamina E (THURNHAM et al., 1988; BLOT et al., 1993).

Estudos epidemiológicos, realizados no Irã, demonstraram que, 80% dos casos, nessa região, estavam relacionados ao hábito alimentar e ao estilo de vida dessa população (MAHBOUBI & ARANESH, 1980).

Análises de caso-controle, comparando pacientes portadores deste carcinoma e controles normais, demonstraram que a ingestão de bebidas à temperatura elevada, tabagismo, etilismo, baixo consumo de água, vegetais verdes e frutas cítricas são riscos associados ao carcinoma de esôfago (De JONG et al., 1974; LI et al., 1989; WANG et al., 1992 e CHENG et al., 1992).

Em 1994, CHENG demonstrou, em estudos de intervenção na população do norte da China (Huixian), usando substâncias consideradas “protetoras” (retinol, riboflavina, zinco e vitaminas C e E), que estes micronutrientes, acrescentados à dieta da população, resultavam em efeito protetor ao carcinoma esofágico. Esse autor considerou três fatores importantes na facilitação da carcinogênese esofágica: (a) contato íntimo entre o carcinógeno e o epitélio; (b) mecanismo de transporte do carcinógeno da superfície para a camada basal; (c) aumento do *turn-over* celular devido à irritação do carcinógeno.

A dieta deficiente tanto em vitaminas E como de agentes antioxidantes, combinados com a ingestão de carcinógenos, usados na conservação dos alimentos (compostos N - nitrosos), são os principais fatores epidemiológicos, na ocorrência do carcinoma esofágico na Ásia Central e China. Os dois sexos são expostos a esses fatores de

risco, o que justifica uma incidência semelhante (1:1) do câncer esofágico em homens e mulheres, nessas regiões (STEMMERMANN et al., 1994).

O papiloma virus humano (HPV) vem sendo implicado na etiopatogenia do carcinoma de células escamosas, especialmente no trato urogenital, sabe-se que esse vírus tem afinidade pelo epitélio epidermóide (TOH et al, 1992).

A infecção pelo HPV no epitélio esofágico foi demonstrada pela primeira vez por SYRJÄNEN em 1982. Esse autor pesquisou o HPV no epitélio adjacente e tumoral do esôfago, encontrando 40% de lesões condilomatosas.

A presença do HPV no esôfago foi confirmado pela detecção do antígeno HPV e DNA do HPV em lesões esofágicas benignas e malignas (GOLDSMITH, 1984; LESEC et al, 1985; WINKLER et al, 1985; DE BORGES et al, 1986; HILLE et al, 1986).

Em estudos realizados usando diferentes técnicas diagnósticas para a detecção do HPV (microscopia ótica e eletrônica, hibridização do DNA *In situ* e reação de polimerase em cadeia - PCR), as alterações histológicas mostraram-se positivas em 49% das biópsias estudadas e o DNA do HPV foi detectado em 43,1% delas.

A positividade do HPV é maior nas áreas de hiperplasias e displasias do que nas lesões francamente tumorais. Os tipos de HPV mais frequentemente encontrados foram o 16 e 18 (CHANG, et al, 1990 e 1992).

Em 1993 CHANG et al, identificaram o DNA do HPV em 12,3% dos linfonodos metastáticos dos carcinomas de esôfago operados.

O provável mecanismo de ação do HPV na etiopatogenia do carcinoma epidermóide seria pela presença de duas oncoproteínas (E6 e E7) do HPV, mais frequentemente encontradas no HPV 16 e 18, interagindo com dois produtos de genes supressores (Rb e P53), presumivelmente inativando a ação desses genes (BENAMOUIZIG et al, 1992; CHANG et al, 1993).

Em adição as oncoproteínas produzidas pelo genoma do HPV o fato de que compostos carcinógenos podem determinar a inativação dos genes de supressão tumoral, pode ser a base molecular para a ação sinérgica do HPV com outros agentes carcinógenos (TOH et al, 1992).

Estudos que correlacionam o carcinoma de células escamosas do esôfago com o HPV, indicam esse vírus como um provável agente etiológico a mais na patogênese multifatorial do câncer esofágico.

Considerando os resultados obtidos na revisão bibliográfica, pode-se afirmar que a etiopatogenia do carcinoma epidermóide do esôfago é multifatorial. Os principais fatores envolvidos são: tabagismo, etilismo, ingestão de bebidas quentes, deficiências nutricionais, o papiloma vírus, e exposição aos compostos N - nitrosos, principalmente na dieta, substâncias estas, sabidamente carcinogênicas.

### **1.3. CARCINOGENESE ESOFÁGICA INDUZIDA POR AGENTES QUÍMICOS**

A carcinogênese esofágica induzida por agentes químicos é um processo de múltiplos estágios, envolvendo gerações sucessivas de células, aproximando-se cada vez mais do fenótipo maligno (KRUEL, 1992). Os modelos experimentais permitiram identificar dois destes estágios: a iniciação e a promoção (MILLER & MILLER, 1981; FARBER, 1988).

A iniciação consiste na alteração irreversível do genótipo de uma ou mais células alvo, podendo expressar o crescimento neoplásico, porém sem um fenótipo tumoral o que não permite serem reconhecidas diretamente. A promoção seria uma estimulação seletiva da proliferação de células iniciadas, modificando-se de um fenótipo normal até o neoplásico (PITOT & SIRICA, 1980; MILLER et al, 1981; FARBER, 1988).

Um terceiro estágio foi descrito por BERENBLUM & HARAN em 1955 que indicava o desenvolvimento de tumores malignos a partir de lesões benignas.

Os agentes carcinogênicos ingeridos com a dieta provavelmente sofrem ação enzimática e convertem-se em “carcinógenos finais”, alterando informações a nível de DNA que controlam o crescimento dos tecidos (DRUCKREY, 1972).

Estes compostos promovem o desenvolvimento de carcinomas mediante mutação celular e comportam-se como agentes alquilantes, reagindo com proteínas e ácidos nucleicos do DNA e RNA celular, promovem modificações nas estruturas das suas bases púricas e pirimídicas, causando profundas alterações tanto no núcleo como nas demais estruturas celulares (MOOLGAVKAR & KNUNSON, 1981; BARTSCH & MONTESANO, 1984).

Assim, esses compostos mostram notável grau de especificidade orgânica a qual varia de acordo com suas estruturas químicas e tumores têm sido induzidos na maioria dos órgãos de roedores e outros animais pela administração de seus diferente tipos, sob as mais variáveis condições experimentais.

A dietilnitrosamina (DEN) é uma substância química do grupo das nitrosaminas, de peso molecular 102,1, constituída de um radical nitroso ligado a quatro átomos de carbono e dez de hidrogênio -  $C_4H_{10}N_2O$ -( IARC, 1978).

A DEN é um carcinógeno completo produzindo indução e promoção tumoral em várias espécies de animais acometendo mais freqüentemente os sistemas respiratório, digestivo alto, fígado e rins (MAGGE & BARNES, 1967).

#### **1.4. MODELOS EXPERIMENTAIS DE CÂNCER ESOFÁGICO USANDO COMPOSTOS N-NITROSOS**

Os compostos N-nitrosos são hoje considerados um grupo de substâncias orgânicas resultantes da interação entre nitritos e aminas, formando as nitrosaminas, entre os nitritos e amidas, formando as nitrosamidas e os nitritos e as uréias formando as nitrosuréias. Pesquisas avançadas dos mecanismos moleculares e celulares de

carcinogênese tem sido concentradas nos compostos N-nitrosos, na tentativa de descobrir porque e como estas drogas produzem tumores em mais de 40 espécies animais com especificidade celular e orgânica. Desde a descoberta da ação carcinogênica de uma das mais conhecidas nitrosaminas em 1956, a nitrosodimetilamina, cerca de 200 nitrosaminas já foram identificadas como carcinogênicas em experimentos com animais, incluindo os mamíferos (entre eles os macacos), répteis, pássaros, anfíbios e peixes. Sem dúvida, todas as espécies testadas mostraram vários graus de susceptibilidade e é muito improvável que o homem seja uma exceção (MIRVISH, 1983; BARTSCH et al., 1984; HOTCHKISS, 1987; LIJINSKY, 1987).

Praticamente todos os órgãos são passíveis de indução de tumores pelas nitrosaminas. No aparelho digestivo, o estômago é o mais estudado, não apenas pela facilidade, como em decorrência do fato que várias são as drogas que induzem a carcinogênese. O estômago operado tem também sido objeto de inúmeras pesquisas experimentais, no sentido de demonstrar que a gastrectomia a longo prazo tem importantes implicações no surgimento do carcinoma no coto gástrico remanescente (BARTSCH et al., 1984; ANDREOLLO, 1994).

As nitrosaminas não são intrinsecamente ativas e devem ser primeiro ativadas através de enzimas pelos organismos e usualmente produzem tumores distantes dos locais de aplicação. As nitrosamidas, pôr outro lado, têm sua atividade biológica associada a sua estrutura química e desenvolvem tumores principalmente nos locais de aplicação.

A ocorrência de tumores esofágicos espontâneos em animais de laboratório, é pouco freqüente (REFERENCES ON NATURALLY OCCURRING NEOPLASMAS IN ANIMALS - 1974). Em 1958, CRAIN descreveu apenas um carcinoma escamoso em 786 ratos e BAKER, em 1953, encontrou somente um caso, em 1200 ratos WISTAR estudados.

A raridade de tumores espontâneos do trato digestivo dos animais, justifica a tentativa de criar cepas especiais de animais em laboratório, com maior propensão de desenvolver esses tumores.

Estudos realizados por LONG & JENNER em 1963 usando dihidrosafrol (agente aromatizante), conseguiu induzir carcinoma de células escamosas no esôfago de ratos, com uma incidência de 50%.

A partir da criação de um modelo experimental de DRUCKREY em 1961, usando metil-nitrosoanilina, administrada, por via oral, em ratos, obteve-se carcinoma de células escamosas, na maioria dos animais. Esse modelo consolidou a indução de tumores esofágicos, em laboratório.

O uso da DEN, induzindo carcinomas de células escamosas no esôfago de camundongos, foi realizado primeiramente por CLAPP & GRAIG (1967), obtendo 18% de tumores em 180 dias, em exposição ao carcinógeno.

Uma cepa de ratos Búffalo foi submetida à ingestão, via oral, de DEN, durante 160 dias, com uma incidência de 50% de câncer epidermóide do esôfago (REUBER, 1975, 1977).

A administração de DEN em ratos, por intubação orogástrica, foi realizada por NAPALKOV & POZHARISSKI (1969), com uma incidência de carcinoma esofágico, dependente do tempo de administração e a dosagem.

Em 1979, BULAY & MIRVISH usaram a metil N-amilnitrosamina por via intra-peritoneal e obtiveram uma incidência de 50% de carcinoma esofágico. A via subcutânea foi a utilizada por STINSON (1979) inoculando a metil-N benzilnitrosamina com uma ocorrência de 35% de carcinomas.

O camundongo constitui um modelo experimental efetivo, usado mais recentemente por vários autores (RUBIO et al, 1982, 1983, 1987, 1988; MUNK - WILKLAND et al, 1990; KRUEL, 1992).

O rato WISTAR foi utilizado por poucos autores como modelo experimental de carcinogênese esofágica. Em 1984, MANDARD et al., induziram o carcinoma epidermóide do esôfago, usando 120 ratos WISTAR, sendo que o carcinógeno empregado foi a

etil N-butilnitrosamina, na dose de 10mg/kg de peso , na água de beber, por um período superior a três meses. A lesão prevalente, nesse estudo, foi o papiloma com uma incidência de 49%. A ocorrência de carcinoma epidermóide de esôfago foi de apenas 2,5%.

Esse autor concluiu que o carcinoma esofágico evolui a partir dos papilomas ou em associações com esses. Além disso, que os tumores esofágicos, induzidos experimentalmente no rato, são diferentes do carcinoma epidermóide do esôfago humano. Considerou ainda que as displasias ou as neoplasias intra-epiteliais, em mucosa plana, encontradas no homem são achados raros no rato. Portanto, seus estudos sugerem que o modelo de carcinogênese química do esôfago do rato não permitem estabelecer uma comparação com o carcinoma esofágico do homem.

O conhecimento da histogênese e morfogênese do carcinoma esofágico é fundamental na profilaxia, diagnóstico e tratamento das lesões precoces.

O estudo da morfogênese e histogênese torna-se difícil com o material obtido de cirurgias ou necropsias (MANDARD et al., 1981). A maioria das pesquisas realizadas em esôfagos humanos tendem a denominar algumas alterações patológicas como “pré-cancerosas” devido à frequência com que elas se associam ao câncer esofágico (POSTLETHWAIT & MUSSER, , 1974; MANDARD, 1978). Obviamente, esse critério não é adequado para provar a eventual natureza “pré-cancerosa” dessas lesões e não permitem um seguimento morfo-dinâmico do processo patológico.

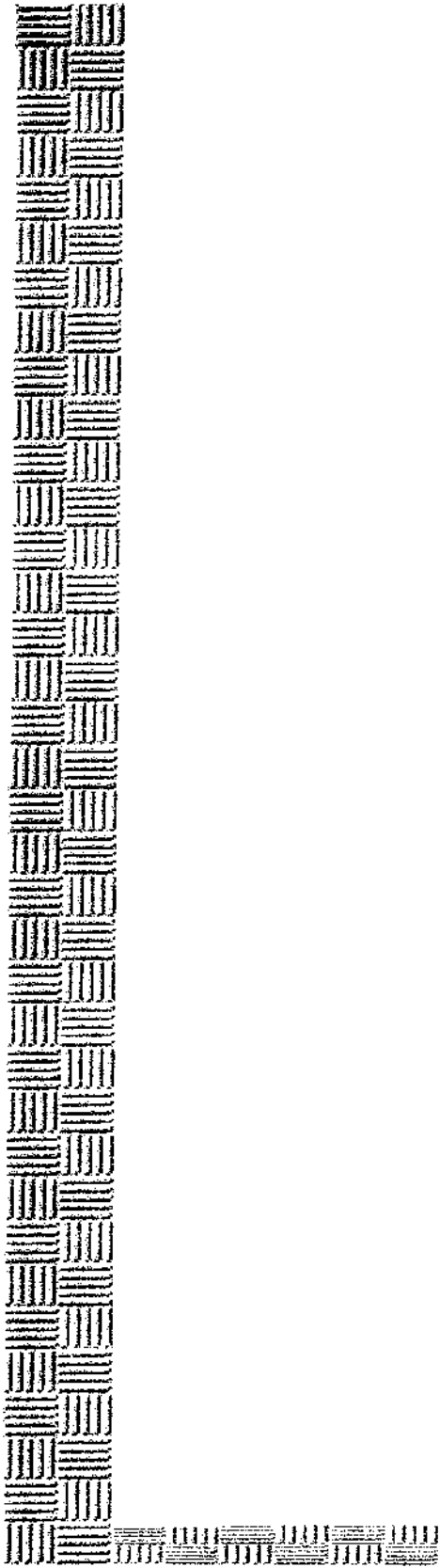
Os modelos experimentais, por outro lado permitem um estudo sistemático e compreensivo tanto da histogênese e morfogênese, como da etiopatogenia do câncer de esôfago. Além disso, esses modelos são facilmente reproduzíveis e apresentam um número de lesões expressivas para o estudo do câncer precoce do esôfago (NAPALKOV et al, 1969; RUBIO et al, 1983; KRUEL, 1992).

## 1.5. OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo experimental foram:

- 1 - Padronizar um modelo efetivo de carcinogênese esofágica experimental utilizando como droga a dietilnitrosamina e como animal o rato WISTAR.
- 2 - Determinar as alterações macroscópicas encontradas no carcinoma epidermóide precoce do esôfago do rato.
- 3 - Verificar a sensibilidade do lugol no auxílio diagnóstico do carcinoma epidermóide do esôfago.
- 4 - Demonstrar a classificação histológica do carcinoma superficial do esôfago, dando ênfase aos diferentes níveis de invasão: carcinoma *In situ*, carcinoma microinvasivo (mm1, mm2 e mm3), carcinoma submucoso (sm1, sm2 e sm3) e a sua correlação com as lesões macroscópicas encontradas. Além disso, mostrar aspectos de diferenciação histológica entre displasia e carcinoma intra-epitelial neste modelo experimental.





## *2. Material e Métodos*

## **2.1. MATERIAL**

### **2.1.1. Animais**

Neste estudo, foram utilizados sessenta ratos da raça WISTAR (*Rattus norvegicus albinus*, Rodente, Mammalia), trinta machos e trinta fêmeas, com cerca de três meses de idade e peso variável de 150 a 250g., (peso médio 217g.), fornecidos pelo CEMIB, Centro de Bioterismo da UNICAMP.

Os animais foram criados no próprio CEMIB, em condições especiais, sendo considerados, saudáveis e livres de doenças específicas (animais SPF - *Specific Pathogen Free*).

A pesquisa foi realizada no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE). Os animais eram mantidos à temperatura ambiente, em ciclos diurnos de luz ,sob fluxo de ar contínuo, recebendo alimentação *ad libitum*, diariamente.

### **2.1.2. Acondicionamento no biotério**

Os animais eram acondicionados em gaiolas, com grade metálica forrada com serragem e tampa de plástico, higienizadas três vezes por semana, permanecendo sempre na mesma gaiola, até o final do experimento.

A manipulação das gaiolas foi feita, durante toda a pesquisa, por técnico de laboratório treinado, utilizando-se luvas.

### **2.1.3. Droga utilizada**

O carcinógeno empregado, durante todo o período de observação da pesquisa, foi a Dietilnitrosamina (DEN), (SIGMA CHEMICALS CO. St. LOUIS USA), com as seguintes características:

N.NITROSODIETHYLAMINE - (SIGMA QUÍMICA - 0756)

Frasco de 100ml

Densidade = 0,95g/ml

Peso Molecular = 102.1

Fórmula Química = C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O

### **2.1.4. Solução e concentração utilizada**

A DEN foi diluída na água de beber, sendo oferecida aos animais na dose 10mg/kg de peso (MANDARD, 1984), preparada conforme a necessidade dos animais e armazenada em recipiente de vidro próprio.

### **2.1.5. Materiais usados na análise macroscópica**

Os materiais usados para a análise macroscópica do esôfago foram:

- a) Luminária tipo RAMBOR com capacidade de aumento real de 10 vezes.
- b) Solução de Lugol a 10% em frasco de vidro para coloração dos espécimes cirúrgicos.
- c) Madeira compensada para fixação da peça cirúrgica.
- d) Alfinetes para estirar o conjunto esôfago-estômago
- e) Solução de formalina tamponada a 10%.
- f) Máquina fotocopadora (XEROX).

### 2.1.6. Materiais usados na análise microscópica

Os materiais usados na análise microscópica foram:

- a) Navalha de secção (LEICA-818).
- b) Cápsula de plástico, onde os segmentos esofágicos eram acondicionados.
- c) Processador automático histoténico (AUTOTÉCNICO-ULTRA II).
- d) Blocos de parafina paraplastic.
- e) Micrótopo (AMERICAN OPTICAL CO).
- f) Lâminas 76 x 26mm (OBJERTTRÄGEN).
- g) Material adequado para procedimento convencional de coloração em Hematoxilina e Eosina (HE).
- h) Microscópio ótico convencional

## 2.2. MÉTODO

### 2.2.1. Grupos de Animais

Os animais foram divididos e acondicionados em gaiolas diferentes, separados pelo sexo, com cinco animais em cada gaiola e mantidos sempre na mesma até o final do experimento. A tabela abaixo resume os grupos:

Tempo de Observação (dias)	Nº de Animais	Grupos de animais separados pelo sexo
TO (grupo controle)	10 animais	5 machos / 5 fêmeas
T 90	05 animais	5 machos
T 120	20 animais	15 fêmeas / 5 machos
T 150	05 animais	5 fêmeas
T 200	20 animais	15 machos / 5 fêmeas
Total	60 animais	30 machos / 30 fêmeas

Tabela 1: mostra a distribuição dos animais quanto ao tempo de observação, número e sexo.

### **2.2.2. Preparo da solução**

A solução de DEN foi feita com água potável, manipulada em capela própria por técnicos treinados, utilizando-se de luva, máscara e pipeta automática de alta precisão (TRANSFERPETTE - MERCK). Esses cuidados foram necessários, pois a DEN é um carcinógeno volátil, podendo ser absorvido por inalação ou contato direto com a pele.

Para obter a dose de DEN, desejada (10mg / kg de peso) foram considerados o peso médio dos animais (200mg) a densidade da DEN (0,95g / ml) e a média diária aproximada de ingestão de água por animal (40ml).

A solução final era acondicionada em recipiente de vidro, envolta em papel alumínio, protegida da luz e colocada em geladeira a 4°C, evitando com isso a desestabilização química do carcinógeno.

### **2.2.3. Delineamento experimental**

O experimento constituiu-se na indução de carcinogênese química esofágica, segundo modelo proposto por RUBIO et al. (1983); MANDARD et al. (1984) & KRÜEL (1992).

No presente estudo, os animais dos grupos T90, T120, T150, T200 ingeriram solução de DEN, 3 dias por semana, durante toda a experiência, na água de beber, na dose de 10mg/kg de peso global dos animais, por gaiola. O grupo controle (T0) só ingeriu água.

O peso inicial foi obtido no princípio do ensaio e o peso final, quando o animal foi sacrificado.

Os volumes ingeridos de água e solução de DEN, expressos em ml, foram calculados de forma a determinar o volume médio, ingerido, diariamente, por cada animal (VMIA/dia), o volume médio, ingerido, diariamente, por gaiola (VMIG/dia) e o volume total ingerido por cada grupo, até os animais serem sacrificados (VTI-S).

O cronograma de sacrifício dos animais foi estabelecido em intervalo de tempo variado, com a finalidade de poder avaliar as alterações morfológicas em fases distintas da carcinogênese.

#### **2.2.4. Alimentação e administração do carcinógeno**

Todos os animais foram alimentados com água e ração para roedores, usadas no biotério do CEMIB (Apêndice 5), *ad libitum*. A ração foi trocada uma vez por semana e a água de beber foi da rede de abastecimento da UNICAMP.

O carcinógeno DEN (Dietilnitrossamina), foi diluído e administrado na água de beber, na dose total de 10mg /kg de peso e colocada à disposição dos animais como única opção de ingestão hídrica, durante três dias.

Esta solução era colocada, em cada gaiola, nas sextas-feiras e retirada às segundas-feiras. Posteriormente, era retirado e medido o volume ingerido pelos animais de cada gaiola e desprezado o volume residual. A solução era substituída por água sem DEN, durante os outros quatro dias (segundas, terças, quartas e quintas-feiras). Esse critério de alternância foi mantido durante todo o período do ensaio.

#### **2.2.5. Observação dos animais**

Os animais foram observados diariamente, excepto sábados e domingos. O volume de DEN, ingerido por gaiola, era medido semanalmente.

Os animais foram pesados uma vez por mês, no sentido de manter corrigida a concentração do carcinógeno, de acordo com a variação do peso.

### **2.2.6. Sacrifício dos animais e necropsia**

Os animais foram sacrificados com inalação de éter etílico, em cuba de vidro fechado.

A necropsia foi realizada imediatamente após o óbito, fixando-se o animal em prancha de madeira com fixadores elásticos. Para facilitar a dissecação esofágica foi introduzida uma sonda de polietileno fina (SNG), via oral, até o estômago. Em seguida, procedia-se a ressecção da parede abdominal anterior e o gradil costal direito e esquerdo até a região mentoniana, com tesoura de Mayo, com ampla exposição da cavidade abdominal, torácica e região cervical, identificando-se no estômago a sonda oro-gástrica previamente posicionada.

Tracionando-se o estômago, caudalmente, (com pinça anatômica delicada) era iniciada a dissecação gástrica, liberando a grande curvatura, o ligamento gastrolienal, e a pequena curvatura (ligamento hepato-gástrico). Após a secção do pilar diafragmático, foi realizada a dissecação esofágica pela liberação do hiato esofágico, progredindo cranialmente pelo mediastino posterior. Enquanto isso, a sonda oro-gástrica facilitava na orientação da dissecação das estruturas vizinhas do esôfago, quais sejam, as pleuras mediastinais, bifurcação da traquéia e aorta torácica, sem lesar a sua parede. Após a dissecação do esôfago cervical, foi realizada a secção do órgão, junto à faringe.

A peça operatória do esôfago e estômago era retirada em monobloco. Encontrando-se tumores hepáticos associados, estes eram ressecados para posterior estudo histológico.

### **2.2.7. Análise macroscópica**

Após a obtenção do esôfago e estômago, foi realizada a abertura do estômago pela grande curvatura, desde o piloro até a cárdia. A sonda nasogástrica era fixada na extremidade proximal do esôfago, com fio de polipropileno 5.0, permitindo então a eversão

total do órgão. Com o esôfago evertido, foi possível a análise macroscópica inicial, no sentido de identificar eventuais alterações e orientar a abertura do esôfago, sem incluir na borda de secção, as alterações macroscopicamente visíveis.

Em seguida, procedia-se a análise macroscópica a fresco das lesões esofágicas, classificando-as conforme a Escola Japonesa (GUIDE LINES for the CLINICAL and PATHOLOGIC STUDIES on CARCINOMA of the ESOPHAGUS by JAPANESE SOCIETY for ESOPHAGEAL DISEASES, 1976)

#### A) Características macroscópicas

##### A 1.) 0 - lesões tipo superficial

##### I - tipo superficial e protuso:

p. - tipo polipóide

pl. - tipo platô

sep. - tipo predominantemente subepitelial

##### II - tipo superficial e plano:

a - levemente elevado

b - plano

c - levemente deprimido

##### III - tipo superficial e claramente deprimido

##### A 2.) - lesões com características infiltrativas

1 - tipo protuso (BORRMANN I)

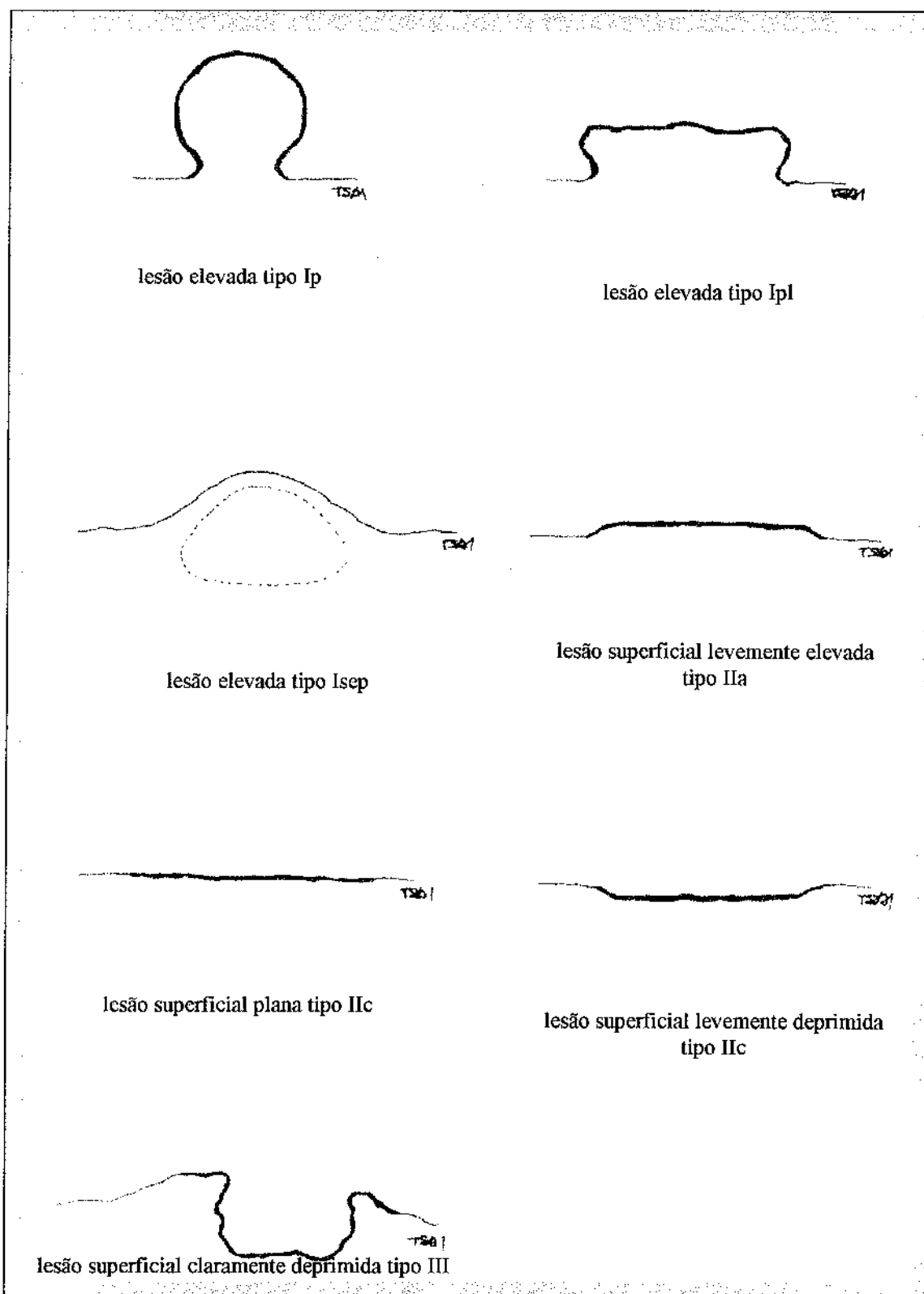
2 - tipo ulcerativo e localizado (BORRMANN II)

3 - tipo ulcerativo e infiltrativo (BORRMANN III)

4 - tipo infiltrativo difuso (BORRMANN IV)



Figura 1: mostra o desenho esquemático das lesões esofágicas superficiais: tipo 0 - I, 0 - II e 0 - III.



A seguir, o conjunto esôfago e estômago era submergido em solução de lugol à 10% , por um período de 30 segundos. Após a secagem da peça, por cerca de 1 minuto, procedia-se à análise da extensão da mucosa esofágica corada, considerando-se lugol negativo, as áreas não coradas. Toda a análise macroscópica à fresco e, após coloração com lugol, era descrita separadamente em cada animal, indicando-se a gaiola e o tempo de exposição ao carcinógeno, para posterior correlação com os achados microscópicos.

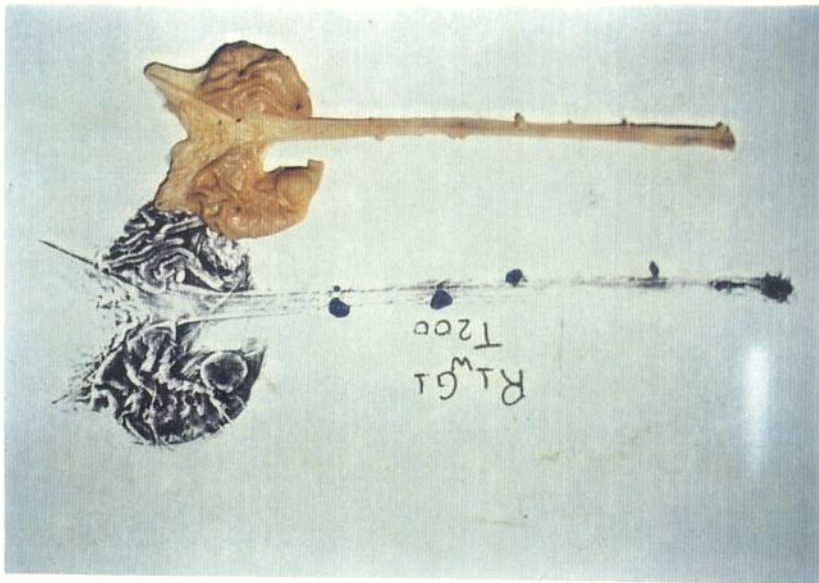
#### **2.2.8. Fotocópia das peças**

As peças eram envolvidas em plástico e fotocopiadas. A fotocópia do segmento esofágico teve como objetivo facilitar e racionalizar a descrição dos achados microscópicos. As figuras 2 e 3, mostram exemplo da documentação realizada.

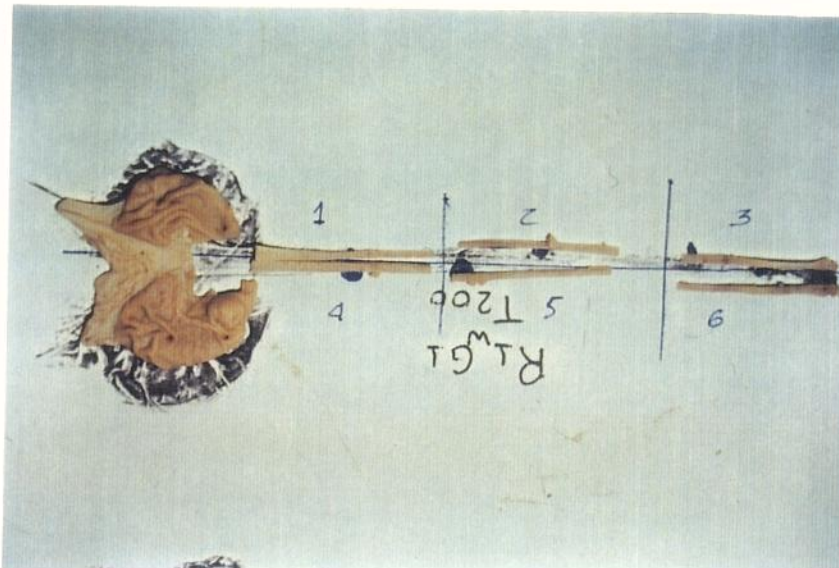
#### **2.2.9. Análise microscópica**

Após a coloração com lugol à 10%, as peças foram fixadas, em madeira compensada, com alfinetes, na extremidade da parede gástrica e do esôfago distal, com margem proximal à direita e distal à esquerda, o suficiente para manter o esôfago estirado. O segmento esôfago-gástrico era imerso em frasco de formalina tamponada à 10% e devidamente identificado. O tempo de fixação em formalina foi de 72 horas.

A preparação dos cortes a serem enviados para histologia foi padronizado pela Escola Japonesa (GUIDE LINES for the CLINICAL and PATHOLOGIC STUDIES on CARCINOMA of the ESOPHAGUS by JAPANESE SOCIETY for ESOPHAGEAL DISEASES, 1976), realizando o corte longitudinal, paralelo ao maior eixo esofágico e dois cortes transversais, dividindo o esôfago em terço superior, terço médio e terço inferior. Com isso, obtinha-se seis fragmentos do órgão que eram numerados de 1 a 6, a partir do fragmento distal para o proximal, (Figura 3).



**Figura 2:** Peça cirúrgica do esôfago e estômago, evidenciando as lesões esofágicas em analogia com o espécime cirúrgico fixado em solução de formalina.



**Figura 3:** Superposição da peça cirúrgica anteriormente descrita com a fotocópia deste conjunto, mostrando detalhes dos cortes macroscópicos por ordem numérica de 1 a 6.

Cada um desses segmentos foi colocado, individualmente, em cápsula de plástico e identificado. O material, assim acondicionado, foi submetido a processador automático histotécnico que permitia a desidratação, diafanização e impregnação com parafina ( tipo *paraplástico*).

Após a inclusão em blocos de parafina, o material foi cortado com micrótomo em seis níveis de profundidade, com espessura de 3 micras, designados de A,B,C,D,E e F. Os cortes foram fixados em lâminas, desparafinizados em estufa e xilol, desidratados em álcool e corados pela Hematoxilina - Eosina (HE).

Após a coloração padrão com HE, as lâminas foram examinadas em microscópio ótico convencional.

#### **2.2.10. Classificação das lesões**

O exame microscópio classificou as lesões em esofagite crônica com ou sem hiperplasia reacional e neoplasia. As neoplasias foram classificadas, segundo o nível de invasão das camadas da parede esofágica conforme a Escola Japonesa (GUIDE LINES for the CLINICAL and PATHOLOGIC STUDIES on CARCINOMA of the ESOPHAGUS by JAPANESE SOCIETY for ESOPHAGEAL DISEASES, 1976), em:

- Carcinoma *In situ*- todas as lesões restritas ao epitélio (intra-epiteliais).
- Carcinoma microinvasivo - todas as lesões que invadem até a lâmina própria e, por sua vez foram subdivididos em três outros níveis:

mm1 - junto a membrana basal.

mm2 - no espaço entre a membrana basal e a *muscularis mucosae*.

mm3 - quando havia contato com a *muscularis mucosae*.

- Carcinoma submucoso: todas as lesões que invadiam a submucosa até a muscular própria, e por sua vez subdividida em três outros níveis:

sm1 - superficial.

sm2 - intermediário.

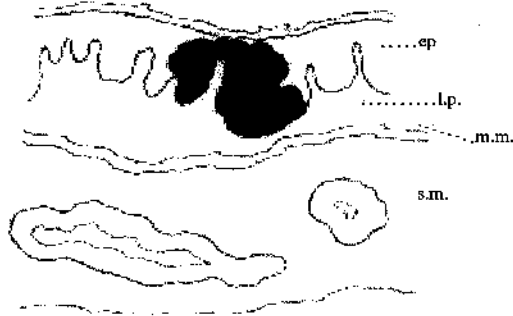
sm3 - quando havia contato com a camada muscular própria.

- Carcinoma avançado - quando havia invasão além da camada muscular própria.

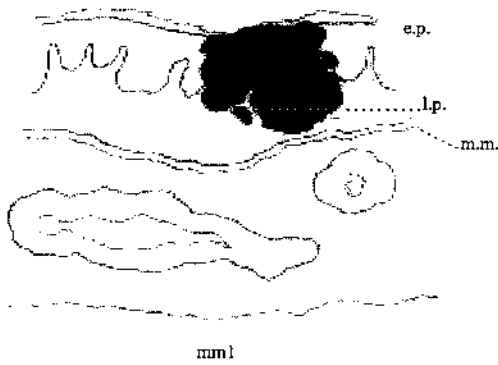
A seguir, é mostrada na figura 4 os níveis de invasão dos carcinomas *In situ*, microinvasivos e submucosos.

Figura 4: mostrada na página 24 refere-se ao desenho esquemático mostrando os níveis de invasão dos carcinomas *In situ*, microinvasivos (mm1, mm2, mm3) e submucosos (sm1, sm2, sm3).

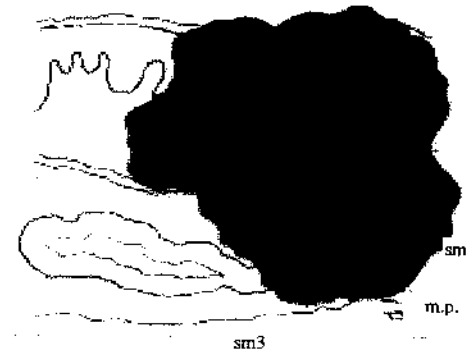
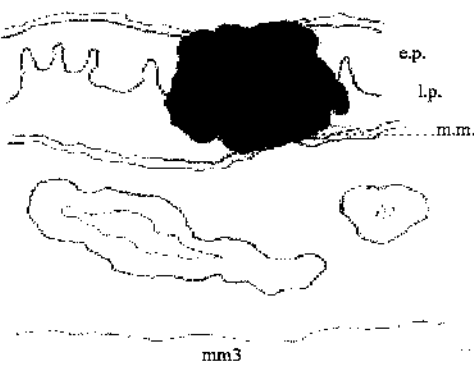
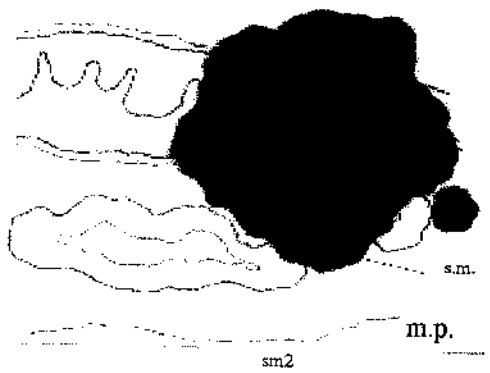
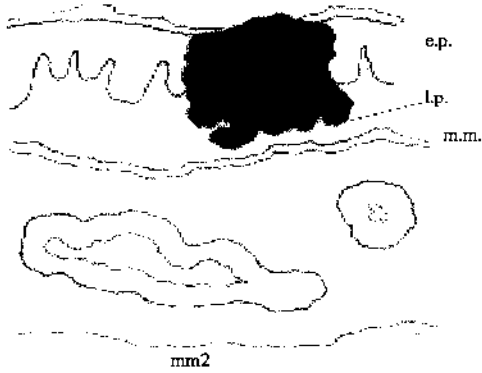
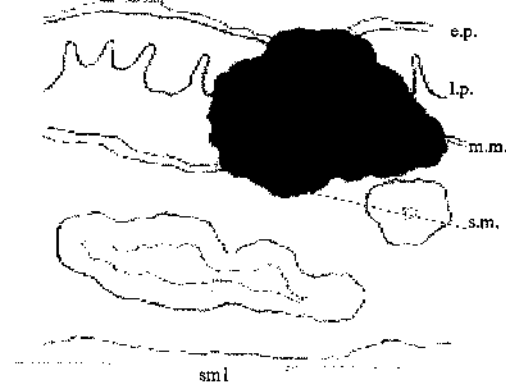
(1) *Cárcinoma In situ* (intra-epitelial)








(2) *Cárcinoma microinvasivo* (mucoso)

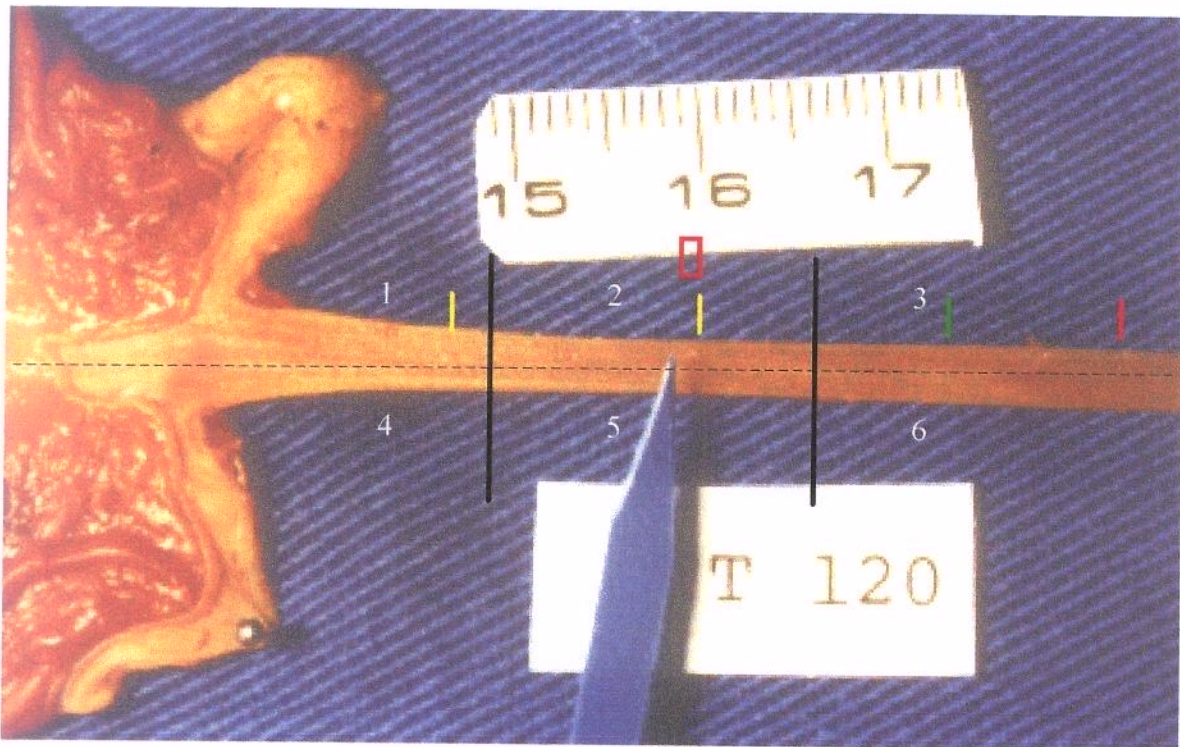


(3) *Cárcinoma submucoso*



No sentido de dinamizar e ordenar a análise microscópica das lesões esofágicas facilitando a interpretação dos resultados foi utilizada fotocópia da peça, designando cores diferentes para cada nível de invasão do carcinoma. Isso permitiu a caracterização diagnóstica microscópica precisa mesmo nos espécimes esofágicos com vários focos de carcinoma. A figura 5, a seguir, mostra essa metodização.

-  Carcinoma *In situ*
-   Carcinoma microinvasivo
-  Carcinoma submucoso
-  Carcinoma avançado

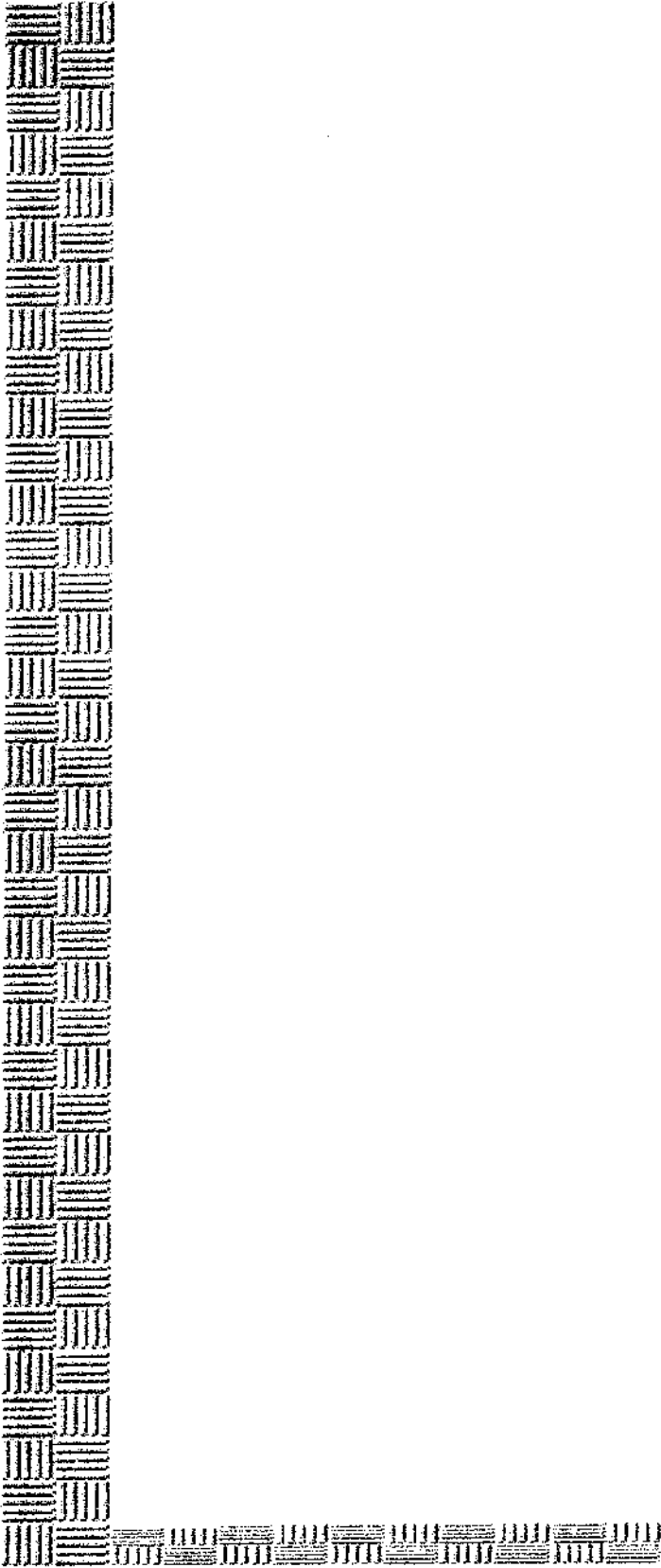


**Figura 5** - Peça cirúrgica retirada do animal mostrando as divisões em terço superior, médio e inferior, para demonstração esquemática da metodização do diagnóstico microscópico das lesões.

### **2.2.11. Análise estatística**

Os resultados obtidos foram avaliados empregando-se os testes estatísticos do Qui-Quadrado e Teste Exato de Fisher, considerando valores significativos como sendo  $p < 0,05$ .





### ***3. Resultados***

### 3.1. CONTROLE DE PESO DOS ANIMAIS

O controle de peso dos animais foi realizada com a média, em gramas, do peso inicial (P.I), do peso final (P.F.), e a diferença de peso no final do estudo (P.F. - P.I), mostrada na tabela abaixo:

	<b>Dieta hídrica</b>	<b>PI</b>	<b>PF</b>	<b>(PF - PI)</b>
TO	Água	236,0	575	339
T 90	DEN	321	426	105
T 120	DEN	207	382	175
T 150	DEN	146	268	122
T 200	DEN	201	320	119

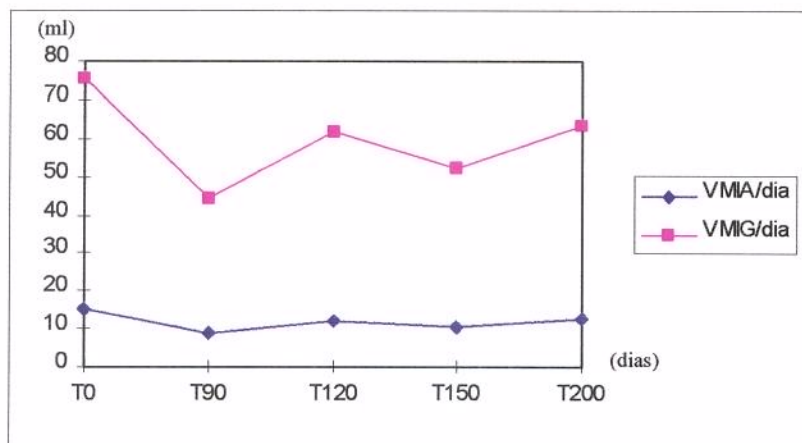
Tabela 2 - mostra que o grupo controle (T0) apresentou significativo ganho de peso em relação aos grupos que ingeriram DEN, cujo ganho ponderal foi aproximadamente igual.

### 3.2. QUANTIDADES INGERIDAS DA SOLUÇÃO E DE ÁGUA

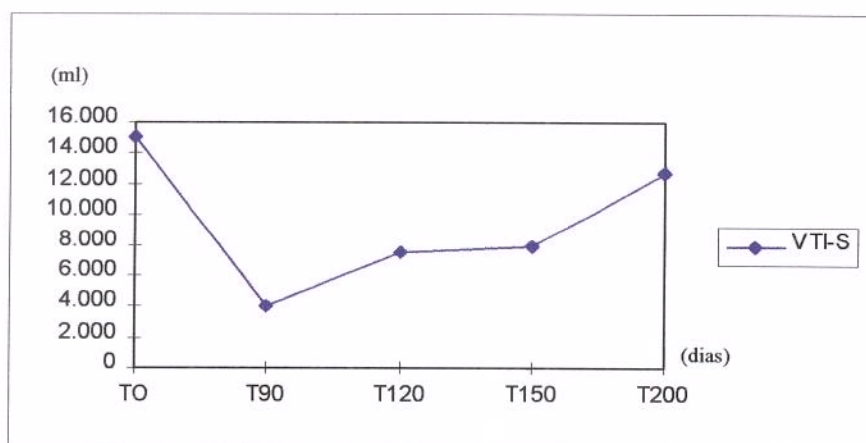
As quantidades de solução ingerida correspondem aos grupos T 90, T 120, T 150 e T 200, sendo que, o grupo controle (T0) só ingeriu água: Os volumes ingeridos de água e solução, expressos em ml, estão discriminados na tabela abaixo, sendo VMIA/dia (volume médio ingerido, diariamente, por cada animal), VMIG/dia (volume médio ingerido, diariamente, por gaiola) e VTI -S (volume total ingerido por cada grupo até os animais serem sacrificados).

	<b>Dieta hídrica</b>	<b>VMIA/dia</b>	<b>VMIG/dia</b>	<b>VTI-S</b>
TO	Água	15,13	75,66	15.132
T 90	solução de DEN	8,90	44,53	4.008
T 120	solução de DEN	12,36	61,85	7.547
T 150	solução de DEN	10,53	52,66	7.900
T 200	solução de DEN	12,73	63,66	12.732

Tabela 3 - mostra que o grupo controle (T0) ingeriu um volume de água significativamente maior que os volumes de solução de DEN ingeridos pelos outros grupos.



**Gráfico 1A** - mostra o volume de água consumido pelo grupo T0 e o volume de DEN consumido pelos grupos de T90, T120, T150 e T200, considerando o volume médio ingerido por animal/dia (VMIA/dia) e o volume médio ingerido por gaiola/dia (VMIG/dia)



**Gráfico 1B** - mostra o volume total de água consumido pelo grupo T0 e o volume total de DEN consumido pelos grupos T90, T120, T150 e T200 durante todo o experimento.

### 3.3. ANÁLISE MACROSCÓPICA DAS LESÕES ESOFÁGICAS

No grupo TO (grupo controle - dez animais), todos apresentaram os esôfagos sem anormalidades, sendo lugol positivo.

No grupo T 90 (cinco animais) não se verificou nenhuma alteração macroscópica do epitélio esofágico e todos foram lugol positivo.

No grupo T 120 (20 animais, um óbito) foram identificados 57 lesões de esôfago cuja a classificação macroscópica revelou:

tipo Ip - uma lesão.

tipo IIa - seis lesões.

tipo IIb - 43 lesões.

tipo IIc - uma lesão.

tipo IIb + IIc - uma lesão.

tipo BORRMANN I - três lesões.

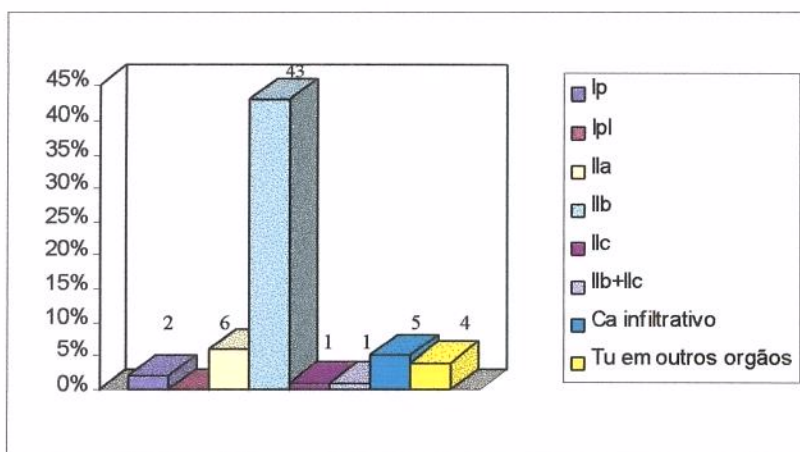
tipo BORRMANN II - duas lesões.

A coloração com lugol foi negativa em todas as 57 lesões.

Foram encontrados ainda quatro tumores hepáticos. Ocorreu um óbito no sentésimo primeiro dia do estudo, cuja necropsia mostrou hemoperitônio com necrose hepática hemorrágica.

A média de lesões esofágicas nesse grupo (T 120) foi de 3,94 lesões por animal.

O gráfico 2, a seguir, mostra estes resultados.



**Gráfico 2:** mostra os tipos de lesões macroscópicas encontradas no grupo T 120 (19 animais - 57 carcinomas - média de três carcinomas por animal).

No grupo T 150 (cinco animais), dois animais morreram antes do tempo previsto, ambos no sentésimo trigésimo dia devido a necrose hepática hemorrágica e hemoperitonêo, não podendo serem avaliados para este estudo. Nos três animais restantes foram identificados 21 lesões esofágicas e classificadas macroscopicamente em:

tipo Ip - uma lesão.

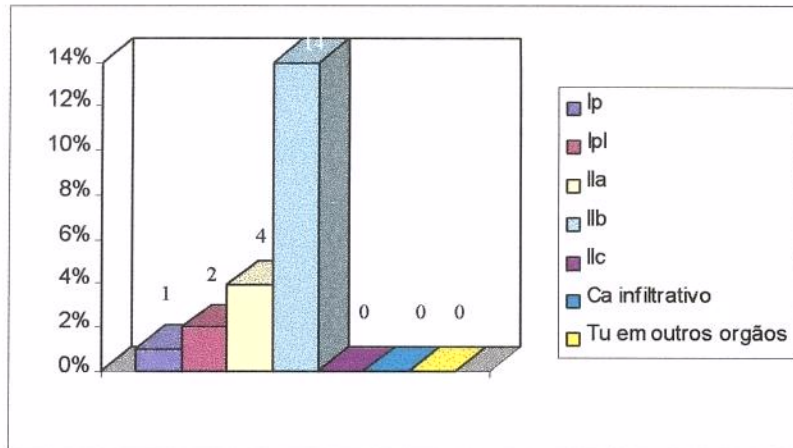
tipo Ipl - duas lesões.

tipo Ila - quatro lesões.

tipo IIb - 14 lesões.

Não foi identificado nenhuma lesão com caráter infiltrativo ou em outros órgãos. A coloração com lugol foi negativa em todas às 21 lesões esofágicas encontradas nesse grupo.

A média de lesões esofágicas por animal encontrada no grupo T 150 foi de sete lesões. O gráfico 3, a seguir, mostra estes resultados.



**Gráfico 3:** mostra os achados macroscópicos do grupo T150 (três animais - 21 carcinomas - média de sete carcinomas por animal).

No grupo T 200 (20 animais), 12 animais morreram antes do tempo previsto, três animais no sentésimo vigésimo dia e cinco animais no sentésimo quadragésimo dia, também devido a necrose hepática hemorrágica e hemoperitoneo. Nos oito animais que sobreviveram até o final do estudo foram identificados 105 lesões esofágicas e classificadas macroscopicamente em:

tipo Ip - dez lesões.

tipo Ipl - seis lesões.

tipo IIa - 23 lesões.

tipo IIb - 45 lesões.

tipo IIc - quatro lesões.

tipo misto - oito lesões (I + IIc - duas lesões; IIa + IIc - uma lesão; IIb + IIc - quatro lesões e IIa + IIb - uma lesão).

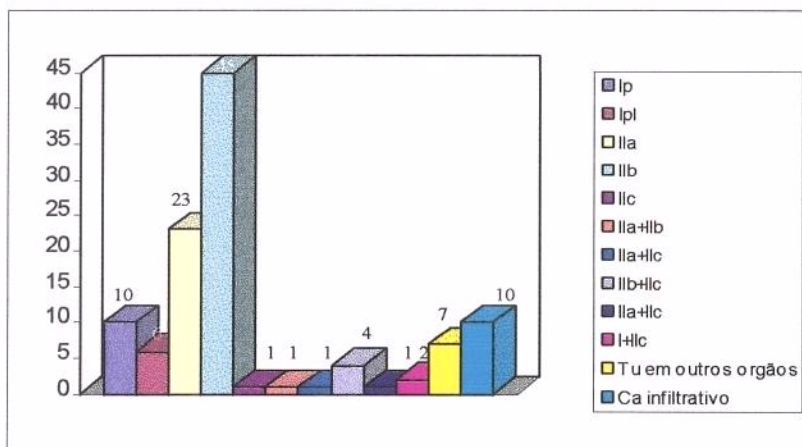
BORRMANN II - três lesões.

BORRMANN III - sete lesões.

Todas às 105 lesões esofágicas do grupo T 200 submetidas a coloração com lugol mostraram-se negativas.

Ocorreram sete lesões em outros órgãos, seis lesões hepáticas e uma lesão pulmonar.

A média de lesões esofágicas por animal encontradas no grupo T 200 foi de 13,12 lesões.

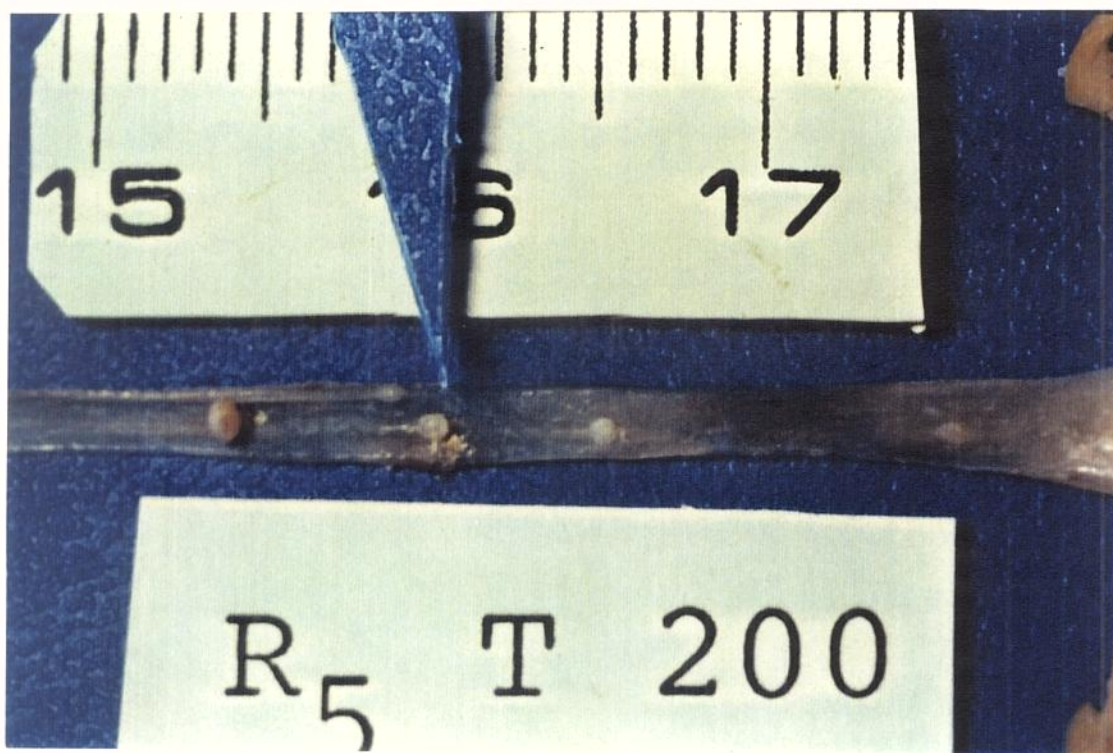


**Gráfico 4:** mostra os achados macroscópicos do grupo T200 (oito animais - 105 carcinomas - média de 13,12 focos de carcinoma por animal).

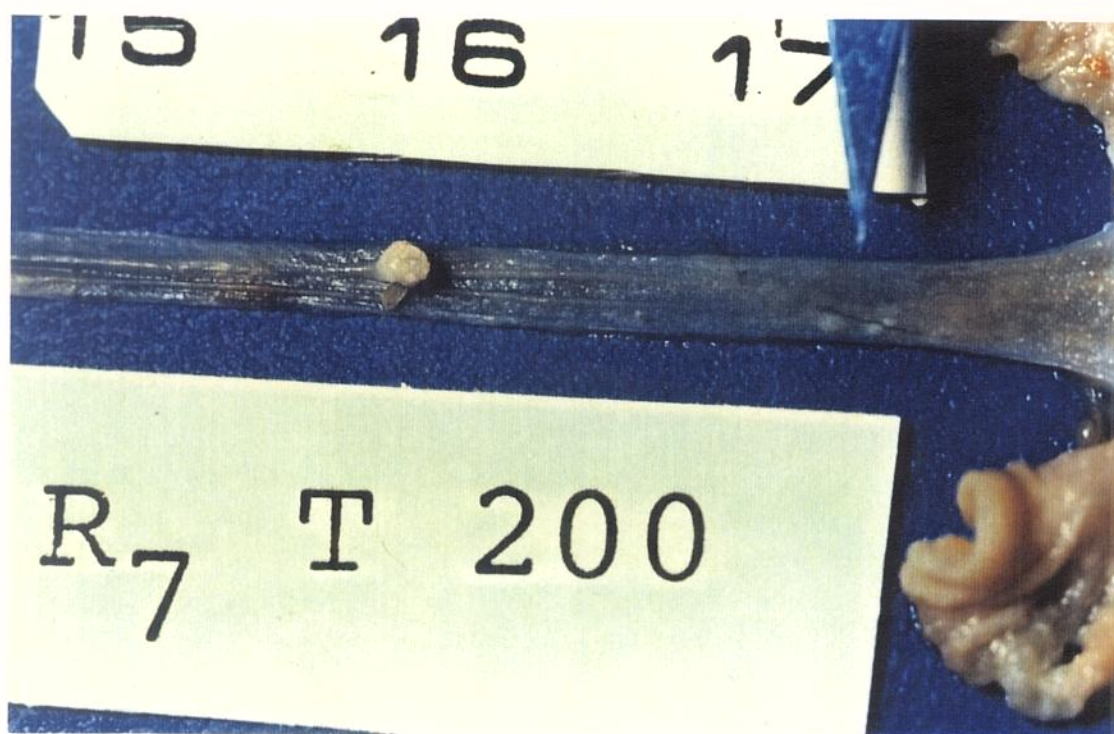
**Tabela 4:** a tabela abaixo mostra os achados macroscópicos e a correlação absoluta e percentual entre todos os grupos de animais (T0, T90, T120, T150 e T200) e os tipos de lesões encontradas.

Macro/ Tempo	TIPO 0-I			TIPO 0-II				AVANÇADOS				TOTAL
	Ip	Ipl	Isep	Ila	Ilb	Ilc	Mistos	I	II	III	IV	
T0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0
T90	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0
T120	1 (1,7%)	---	---	6 (10,6%)	43 (75,43%)	1 (1,7%)	1 (Ilb+Ilc) (1,7%)	3 (5,26%)	2 (3,54%)	---	---	57 (100%)
T150	1 (4,76%)	2 (9,52%)	---	4 (19,04%)	14 (66,6%)	---	---	---	---	---	---	21 (100%)
T200	10 (9,57%)	6 (5,7%)	---	23 (21,9%)	45 (42,85%)	3 (2,87%)	1 (Ila+Ilb) 0,95% 2 (I+Ilc) 1,9% 4 (Ilb+Ilc) 3,8% 1 (Ila+Ilc) 0,95% 8 (7,6%)	---	3 (2,85%)	7 (6,66%)	---	105 (100%)
TOTAL	11 (6,01%)	8 (4,37%)	---	33 (18,05%)	102 (55,73%)	5 (2,73%)	9 (4,92%)	3 (1,64%)	5 (2,73%)	7 (3,82%)	---	183 (100%)

As figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12, a seguir, mostram os aspectos macroscópicos das lesões encontradas nos diferentes grupos.

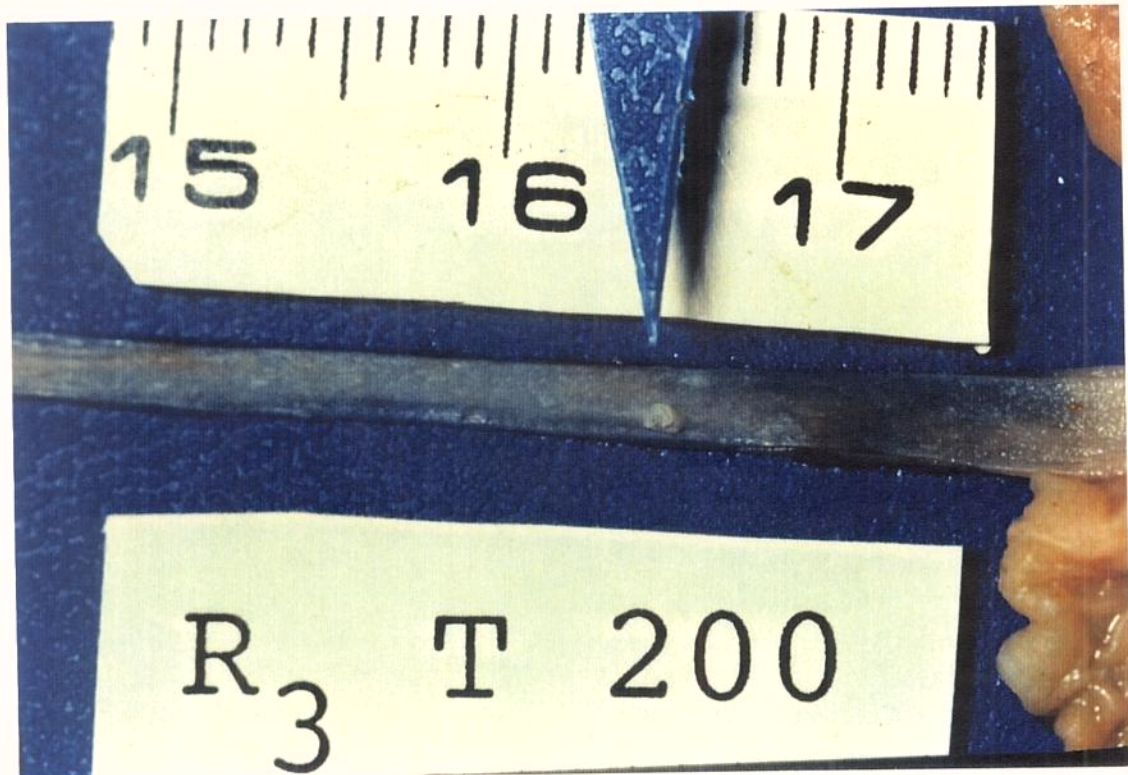


**Figura 6:** Peça cirúrgica do grupo T 200, evidenciando lesões elevadas tipo Ip, Ipl e lesões superficiais tipo IIa e IIa com erosão (seta).

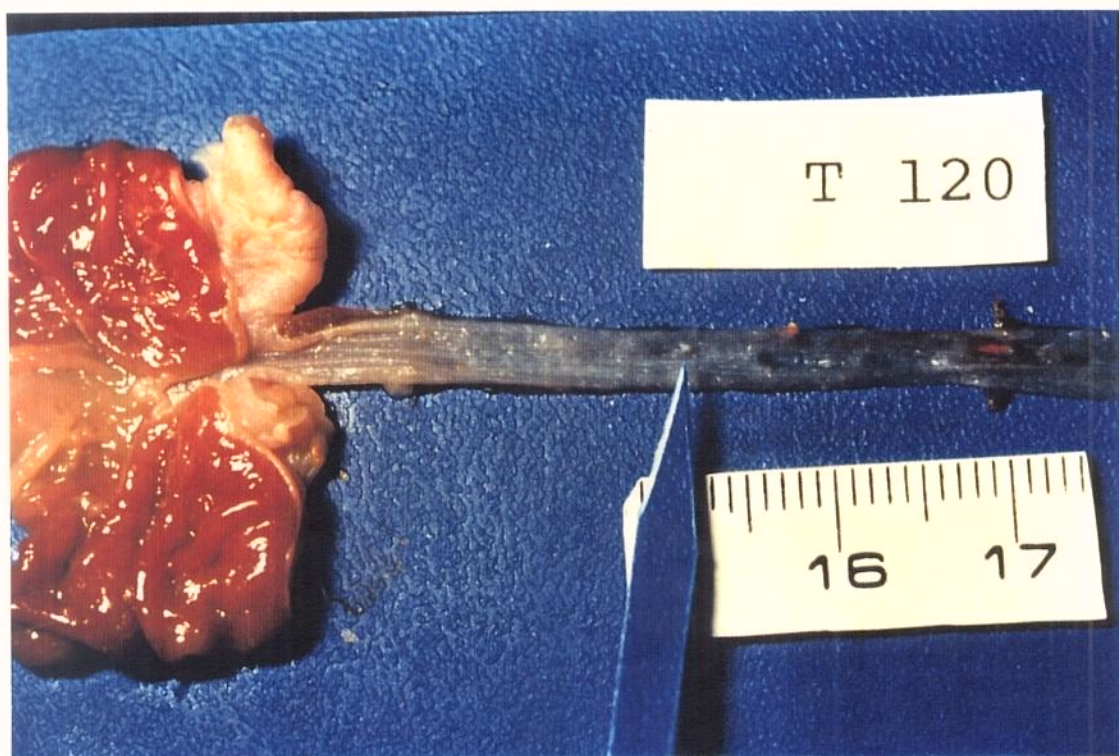


**Figura 7:** Peça esofágica do grupo T 200, com lesão elevada tipo Ipl, lesão superficial tipo IIa (seta) e hiperqueratose.





**Figura 8 :** Peça cirúrgica do grupo T200, mostrando lesão superficial tipo IIa e lesão elevada tipo Ipl com erosão (seta).



**Figura 9:** Peça cirúrgica do grupo T120, mostrando lesão superficial tipo IIa (seta), com palidez de mucosa adjacente sugestiva de lesão superficial plana tipo IIb.



Figura 10: Peça cirúrgica do grupo T 200, mostrando lesão superficial tipo mista IIa + IIb.

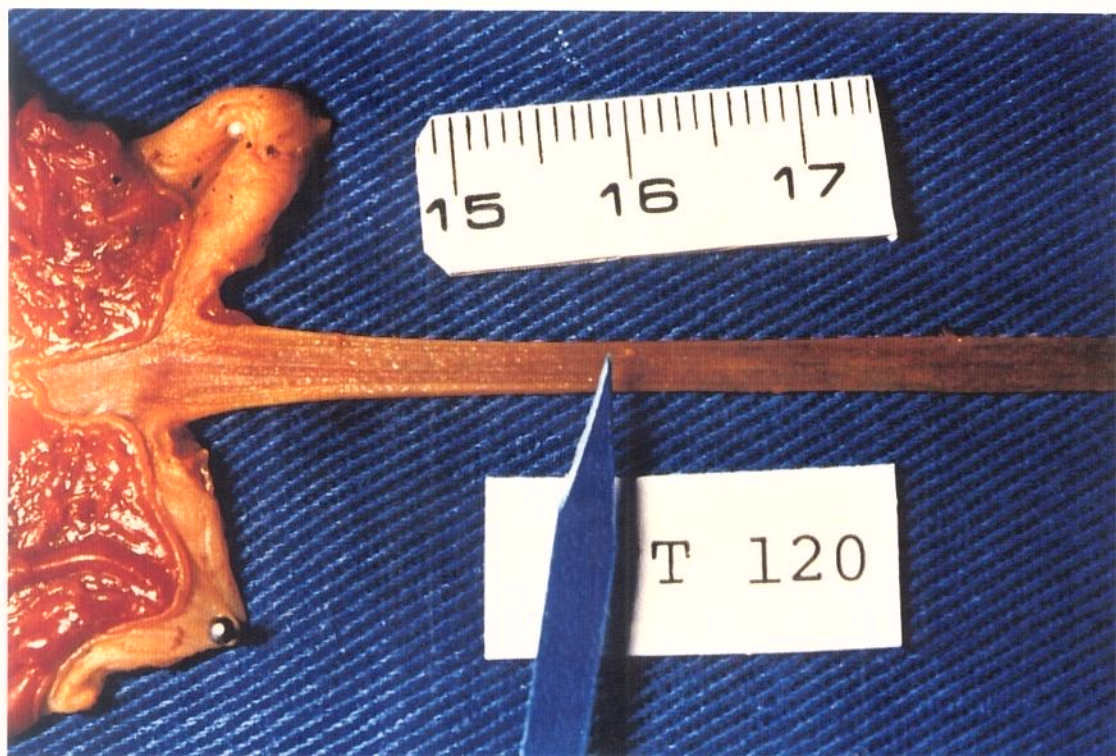
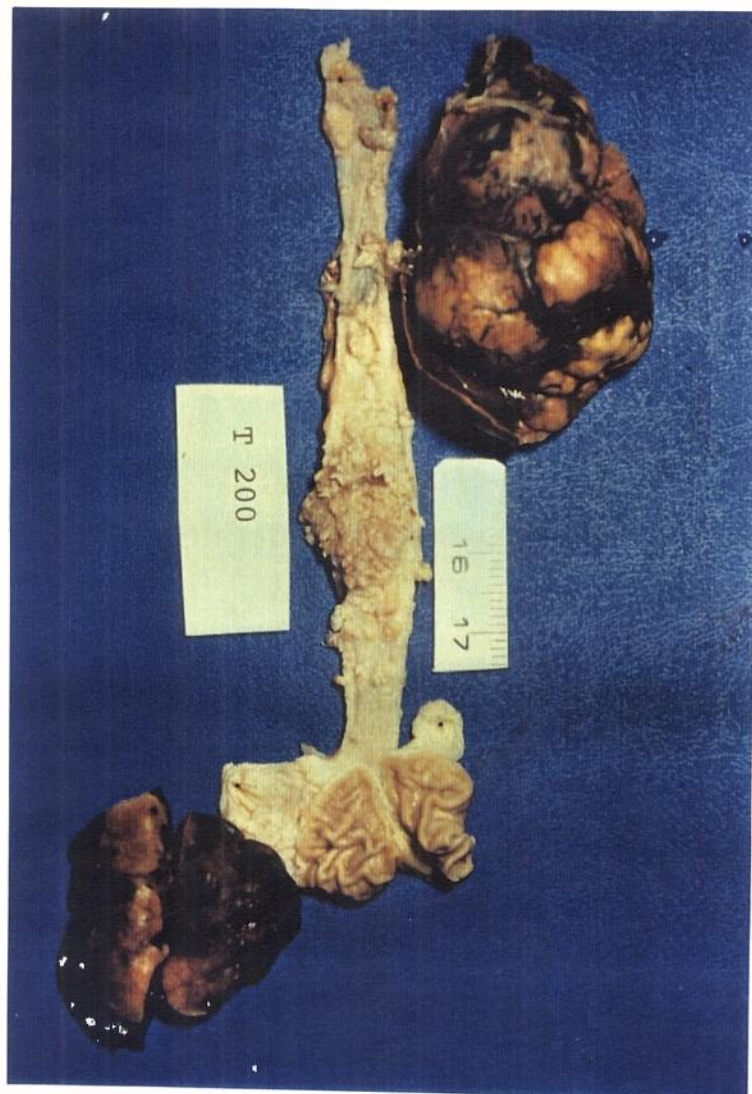


Figura 11: Peça cirúrgica do grupo T120, mostrando lesão superficial tipo IIa, lugol negativo.



**Figura 12:** Peças cirúrgicas do grupo T200, mostram lesão avançada tipo BORRMANN II, com várias lesões elevadas e superficiais em todo o esôfago. Além disso, nota-se presença de metástases pulmonar e hepática no mesmo animal.

### 3.4. ANÁLISE MICROSCÓPICA DAS LESÕES ESOFÁGICAS

No grupo TO (grupo de controle) (dez animais), todos apresentavam esôfago normal ao exame histológico (foto microscopia).

No grupo T 90 (cinco animais) todos apresentavam esofagite crônica com ou sem hiperplasia reacional (foto microscopia).

O grupo T 120 (19 animais) o exame microscópico demonstrou 57 carcinomas de esôfago que foram classificados em:

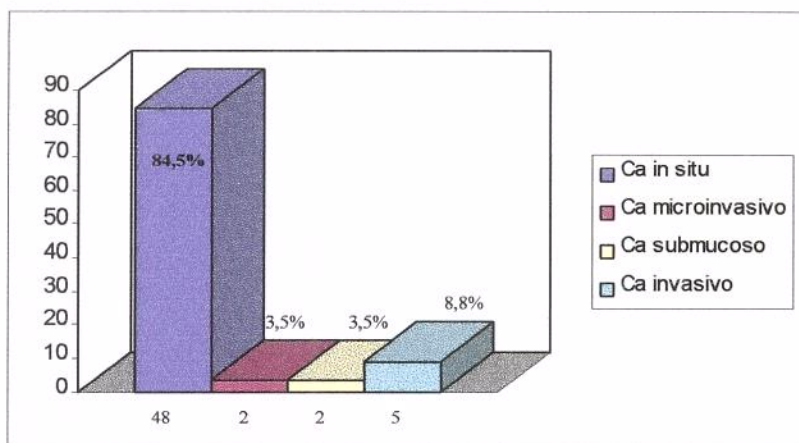
In Situ - 48 carcinomas.

microinvasivo - dois carcinomas (um mm1 e um mm2).

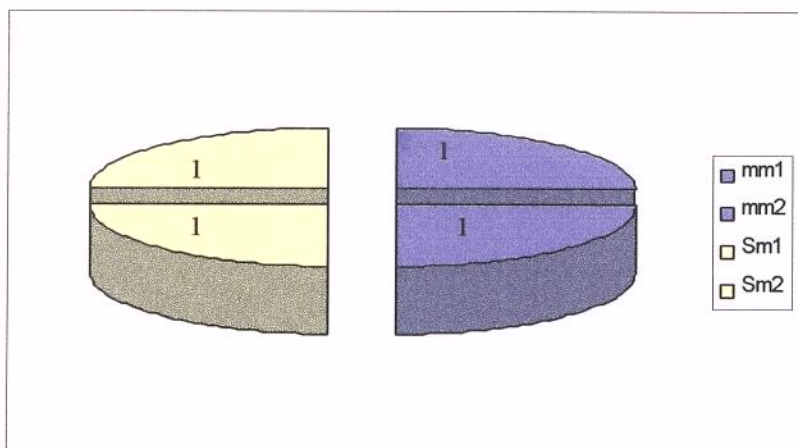
submucoso - dois carcinomas (um sm1 e um sm2).

invasivo - cinco carcinomas (três BORRMANN I e dois BORRMANN II).

Ocorreram quatro lesões hepáticas, todas primárias do fígado (quatro hepato carcinomas). Os gráficos 5 e 6 e as tabelas 5 e 6, a seguir, mostram esses resultados.



**Gráfico 5:** mostra o diagnóstico microscópico dos carcinomas do grupo T120 (57 carcinomas em 19 animais, com média de três por animal).



**Gráfico 6:** mostra o diagnóstico microscópicos dos carcinomas microinvasivos (um mm1- 50% e outro mm2 - 50%) e submucosos (um sm1- 50% e outro sm2 - 50%) do grupo T120.

No grupo T 150, nos três animais sobreviventes, o exame microscópico demonstrou 21 carcinomas de esôfago que foram classificados em:

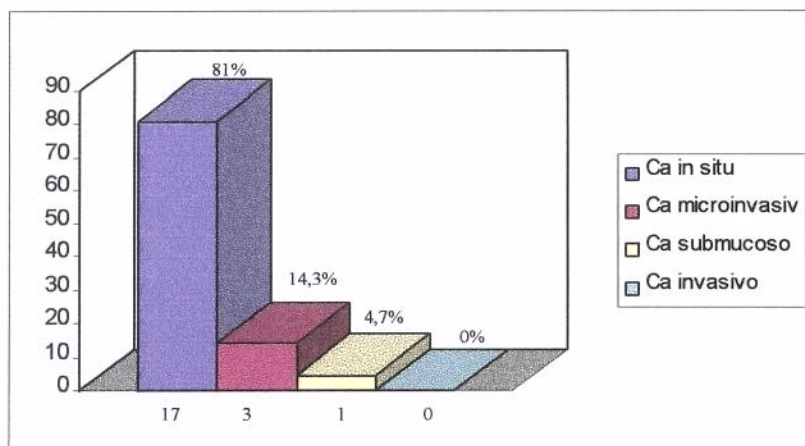
*In situ* - 17 carcinomas.

microinvasivo - três carcinomas (dois mm2 e um mm3).

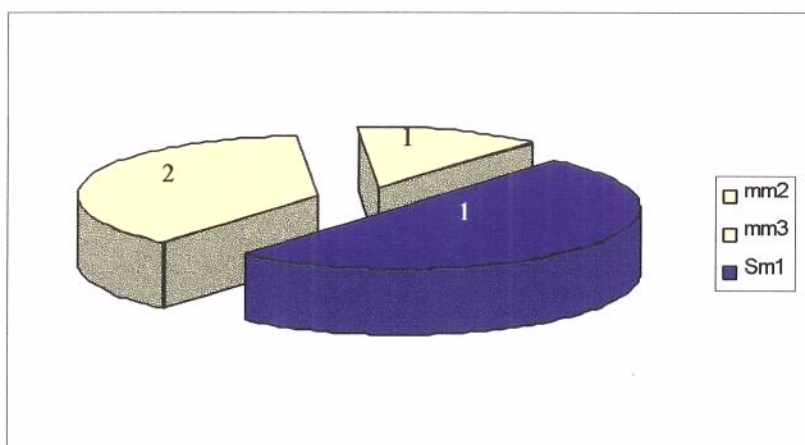
submucoso - um carcinoma - sm1.

Não foram diagnosticados nenhum carcinoma invasivo e ou lesões em outros órgãos nesse grupo, sendo diagnosticado um papiloma.

Os gráficos 7 e 8 e as tabelas 5 e 6, a seguir, mostram esses resultados.



**Gráfico 7** : mostra o diagnóstico microscópico dos carcinomas no grupo T150 (três animais, 21 carcinomas, com média de sete focos de carcinoma por animal).



**Gráfico 8**: mostra o diagnóstico microscópico dos carcinomas microinvasivos (dois mm2 - 75% e um mm3- 25%) e submucosos (um sm1- 100%) do grupo T150.

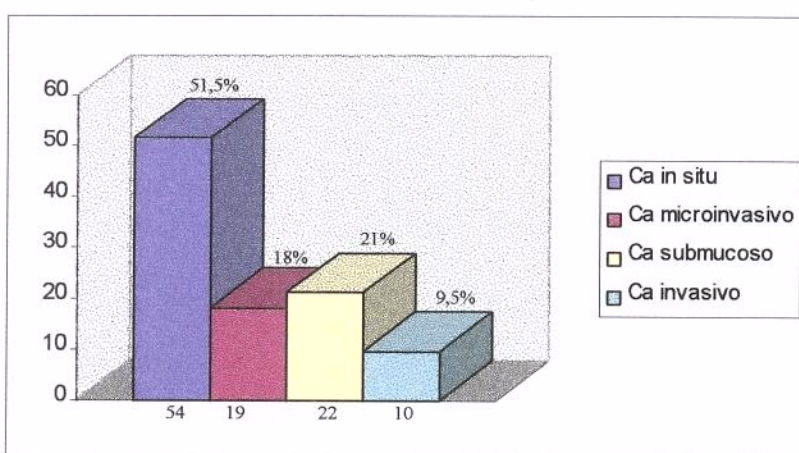
No grupo T 200, nos oito animais sobreviventes, o exame microscópico demonstrou 105 carcinomas de esôfago ( gráficos 9 e 10 e tabela 5 e 6) que foram classificados em:

In situ - 54 carcinomas.

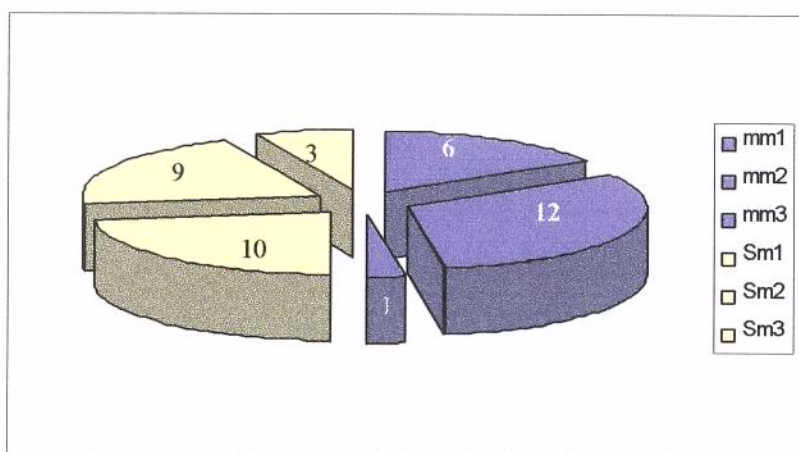
microinvasivo - 19 carcinomas (seis mm1, 12 mm2 e um mm3).

submucoso - 22 carcinomas (dez sm1, nove sm2 e três sm3).

invasivo - dez carcinomas (três BORRMANN II e sete BORRMANN III). Ocorreram sete lesões em outros órgãos no grupo T 200 ( três hepato carcinoma, duas metástases hepáticas, um cisto hemorrágico, uma metástase pulmonar).



**Gráfico 9:** mostra o diagnóstico microscópicos dos carcinomas no grupo T200 (oito animais - 105 carcinomas - média de 13,12 focos de carcinoma por animal).



**Gráfico 10:** mostra o diagnóstico microscópicos dos carcinomas microinvasivos (seis mm1 - 31,5%, doze mm2 - 63,2%, um mm3 - 5,2%) e submucosos (dez sm1 - 45,5%, nove sm2 - 41% e três sm3 - 13,5%) do grupo T200.

As tabelas 5 e 6 resumem os diagnósticos microscópicos nos respectivos grupos de animais.

**Tabela 5:** mostra a correlação absoluta e percentual entre os diferentes grupos de animais (T0, T90, T120, T150 e T200) e a classificação microscópica dos carcinomas, sem considerar as subdivisões dos carcinomas microinvasivos e submucosos.

Tempo/ Micro	T0	T90	T120	T150	T200	TOTAL
In Situ	---	---	48 (84,21%)	17 (80,95%)	54 (51,43%)	119 (65,02%)
Microinvasivo	---	---	2 (3,51%)	3 (14,29%)	19 (18,09%)	24 (13,11%)
Submucoso	---	---	2 (3,51%)	1 (4,76)	22 (20,95%)	25 (13,66%)
Invasivo	---	---	5 (8,77%)	---	10 (9,52%)	15 (8,19%)
TOTAL	---	---	57	21	105	183 (100%)

Correlacionando-se o tempo de exposição ao DEN com os níveis de invasão microscópicas dos tumores e empregando o teste do Qui-Quadrado para avaliar a significância dos resultados, conclui-se que existe diferença significativa com  $p < 0,05$  (apêndice 1).

**Tabela 6:** mostra a correlação absoluta e percentual entre os diferentes grupos de animais (T0, T90, T120, T150 e T200) e a classificação microscópica dos carcinomas, considerando as subdivisões dos carcinomas microinvasivos (mm1, mm2 e mm3) e dos carcinomas submucosos (sm1, sm2 e sm3).

Micro/ Tempo	IN SITU	MICROINVASIVO			SUBMUCOSO			INVASIVO	TOTAL
		mm1	mm2	mm3	sm1	sm2	sm3		
T0	---	---	---	---	---	---	---	---	0
T90	---	---	---	---	---	---	---	---	0
T120	48 (84,21%)	1 (1,75%)	1 (1,75%)	---	1 (1,75%)	1 (1,75%)	---	5 (8,77%)	57 (100%)
T150	17 (80,95%)	---	2 (9,52%)	1 (4,76%)	1 (4,76%)	---	---	---	21 (100%)
T200	54 (51,43%)	6 (5,71%)	12 (11,42%)	1 (0,95%)	10 (9,52%)	9 (8,57%)	3 (2,85%)	10 (9,52%)	105 (100%)
TOTAL	119 (65,02%)	7 (3,82%)	15 (8,19%)	2 (1,09%)	12 (6,55%)	10 (5,46%)	3 (1,63%)	15 (8,19%)	183 (100%)

Total microinvasivo = 24 (13,11%)      Total submucoso = 25 (13,66%)



### 3.5. CORRELAÇÃO DOS ACHADOS MACROSCÓPICOS COM A MICROSCOPIA DOS CARCINOMAS ESOFÁGICOS EM CADA GRUPO

No grupo T 120 (19 animais) foram identificadas 57 lesões esofágicas cuja à correlação entre a macroscopia e a microscopia segue-se abaixo:

lesão tipo Ip - uma lesão (1,7%) - um carcinoma submucoso - sm2 (100%).

lesão tipo IIa - seis lesões (10,6%) - cinco carcinomas *In situ* (83,3%) e um carcinoma microinvasivo mm2 (16,7%).

lesão tipo IIb - 43 lesões (75,43%) - 43 carcinomas *In situ* (100%).

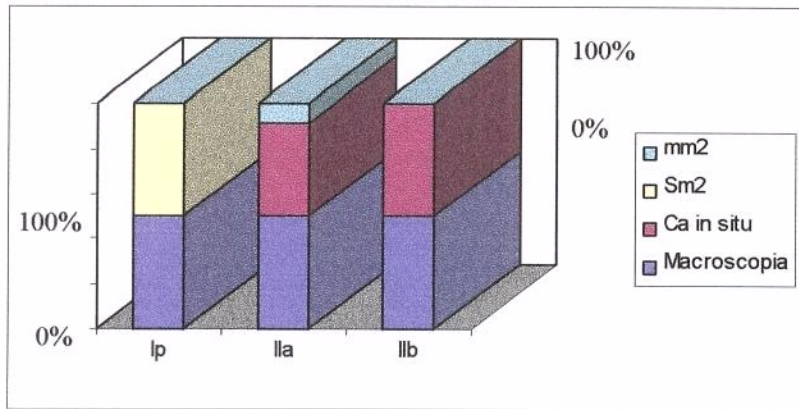
lesão tipo IIc - uma lesão (1,7%) - um carcinoma submucoso sm1 (100%).

lesões mistas - uma lesão tipo IIb + IIc (1,7%) - um carcinoma microinvasivo mm1, (100%).

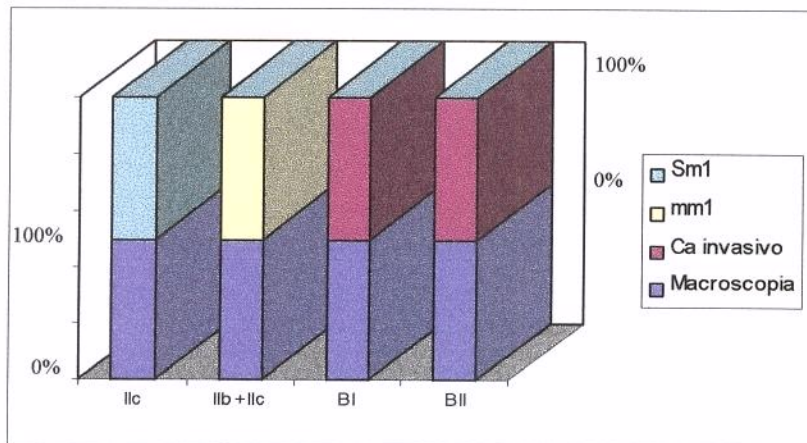
lesão tipo BORRMANN I - três lesões (5,37%) - carcinoma invasivo até a muscular própria (100%).

lesão tipo BORRMANN II - duas lesões (3,54%) - carcinoma invasivo até a adventícia (100%).

Estes resultados são demonstrados, a seguir, nos gráficos 11 e 12.



**Gráfico 11:** mostra a correlação dos achados macroscópicos (lesões tipo Ip, Ila e Ilb) com o diagnóstico microscópico do grupo T120 (57 carcinomas).



**Gráfico 12:** mostra a correlação dos achados macroscópicos (lesões tipo Ilc, Ilb + Ilc, Borrmann I e II) com o diagnóstico microscópico do grupo T120 (57 carcinomas).

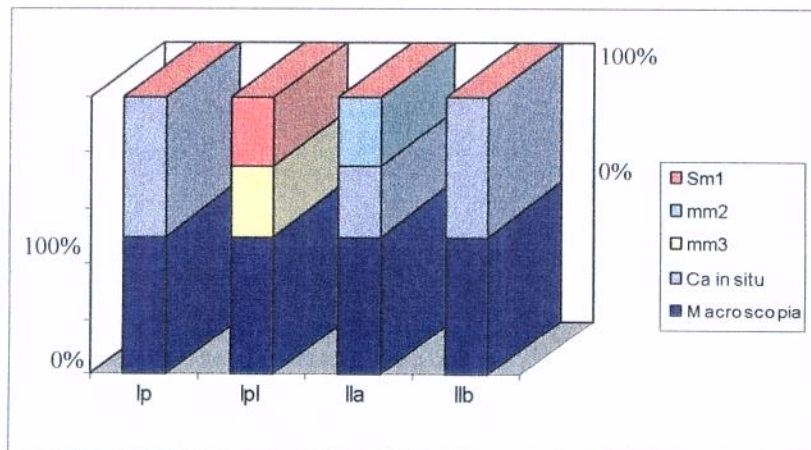
No grupo T 150 (três animais) foram identificados 21 lesões esofágicas cuja à correlação entre a macroscopia e a microscopia segue-se abaixo, mostrada no gráfico 13:

lesão tipo Ip - uma lesão (4,76%) - carcinoma *In situ* (100%).

lesão tipo Ipl - duas lesões (9,52%) - um carcinoma microinvasivo mm3 (50%) e um carcinoma submucoso sm1 (50%).

tipo Ila - quatro lesões (19,04%) - dois carcinomas *In situ* (50%) e dois carcinomas microinvasivos mm2 (50%).

tipo Iib - 14 lesões (66,6%) - 14 carcinomas *In situ* (100%).



**Gráfico 13:** mostra a correlação dos achados macroscópicos (lesões tipo Ip, Ipl, Ila e Iib) com o diagnóstico microscópico do grupo T150 (21 carcinomas).

No grupo T 200 (oito animais) foram identificados 105 lesões cuja à correlação entre a macroscopia e microscopia segue-se abaixo:

tipo Ip - dez lesões (9,57%) - dez carcinomas submucosos (100%) - sm1 - cinco carcinomas (50%), sm2 quatro carcinomas (40%) e um carcinoma sm3 (10%).

tipo Ipl - seis lesões (5,7%) - quatro carcinomas microinvasivos mm1 (66,6%) , dois carcinomas submucoso sm2 (44,4% ).

tipo IIa - 23 lesões (21,9%) - nove carcinomas *In situ* (39,1%), 14 carcinomas microinvasivos (60,86%) - seis mm1 (42,8%) e oito mm2 (67,2%).

tipo IIb - 45 lesões (42,85%) - 45 carcinomas *In situ* (100%).

tipo IIc - três lesões (2,87%), três carcinomas submucosos (100%) - dois sm1 (66,6%) e um sm2 (33,4%).

tipo misto oito lesões (7,6%):

IIa + IIb uma lesão (0,95%) - um carcinoma submucoso sm2 (100%).

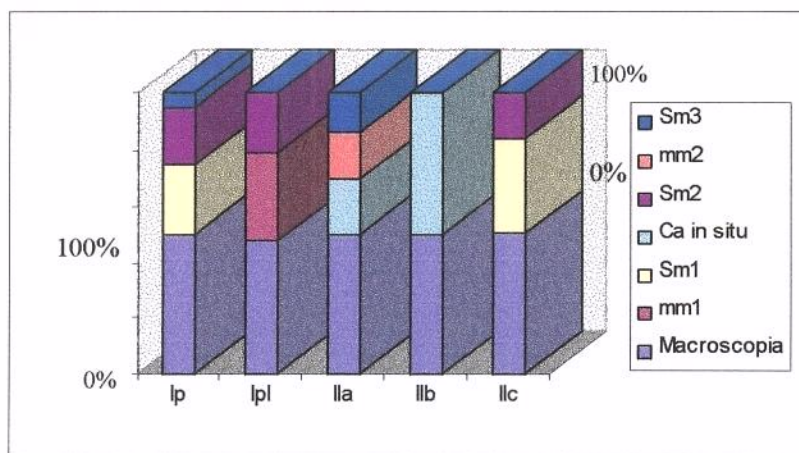
IIa + IIc uma lesão (0,95%) - um carcinoma microinvasivo mm3 (100%).

IIb + IIc quatro lesões (3,8%) - quatro carcinomas submucosos (100%), três sm1 (75%) e um sm2 (35%).

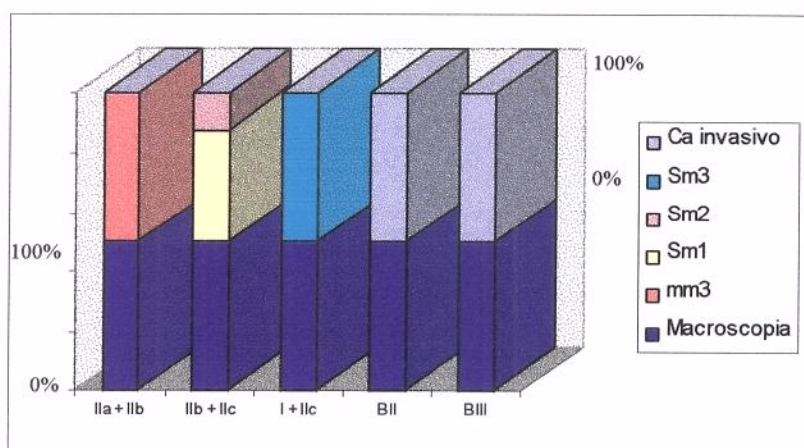
I + IIc - duas lesões (1,9%) - dois carcinomas submucosos sm3 (100%).

Foram encontradas dez lesões infiltrativas (9,52%): três BORRMANN II (30%) - carcinoma invasivo até muscular própria (100%); sete BORRMANN III (70%), carcinoma invasivo até além da adventícia (100%). Nesse grupo foram diagnosticados quatro papilomas.

Os gráficos 14 e 15, a seguir, mostram esses resultados.



**Gráfico 14:** mostra a correlação dos achados macroscópicos (lesões tipo Ip, Ipl, Ila, Ilb e Ilc) com o diagnóstico microscópico do grupo T200 (105 carcinomas).



**Gráfico 15:** mostra a correlação dos achados macroscópicos (lesões tipo Ila + Ilb , Ilb + Ilc, I + Ilc, Borrmann II e III) com o diagnóstico microscópico do grupo T200.

### 3.6. CORRELAÇÃO DOS ACHADOS MACROSCÓPICOS COM OS NÍVEIS DE INVASÃO MICROSCÓPICA NOS CARCINOMAS MICROINVASIVOS E SUBMUCOSOS DO ESÔFAGO

Foram diagnosticados 24 carcinomas microinvasivos, sendo classificados como:

- carcinomas microinvasivos mm1 - sete carcinomas (29,1%), as lesões macroscópicas identificadas nesse grupo foram:

tipo IIa - seis lesões (85,7%)

tipo IIb + IIc - uma lesão (14,28%).

- carcinomas microinvasivos mm2 - 15 carcinomas (62,5%), as lesões macroscópicas identificadas nesse grupo foram:

tipo IIa - 11 lesões (73,3%).

tipo Ipl - quatro lesões (26,6%).

- carcinomas microinvasivos mm3 - dois carcinomas (8,33%), as lesões macroscópicas identificadas nesse grupo foram:

tipo Ipl - uma lesão (50%)

tipo IIa + IIc - uma lesão(50%).

As lesões por ordem de frequência dos carcinomas microinvasivos foram: tipo IIa 17 lesões (70,8%), tipo Ipl cinco lesões (20,83%) e tipo misto duas lesões (IIa + IIc, IIb + IIc) (8,3%).

Foram diagnosticados 25 carcinomas submucosos, sendo classificados como:

- carcinomas submucoso sm1 - 12 carcinomas (48%), as lesões macroscópicas identificadas foram:

tipo Ip - cinco lesões (46,66%).

tipo Ipl - uma lesão (8,3%).

tipo IIc - três lesões (25%)

tipo misto - três lesões IIb + IIc (25%)

- carcinoma submucoso sm2 - dez carcinomas (40%), as lesões macroscópicas identificadas forma:

tipo Ip - cinco lesões (50%).

tipo Ipl - duas lesões (20%).

tipo misto - três lesões (30%), uma lesão IIa + IIb (10%), uma lesão IIb + IIc (10%) e uma lesão

tipo IIc - uma lesão (10%).

- carcinomas submucosos sm3 - três carcinomas (12%), as lesões macroscópicas identificadas foram:

tipo Ip - uma lesão (33,33%).

tipo I + Iic - duas lesões (66,66%).

As lesões por ordem de frequência nos carcinomas submucosos foram: tipo Ip 11 lesões (44%); tipo misto sete lesões (28%), desses quatro lesões eram IIb + IIc (57,14%), duas lesões tipo IIa + IIb (28,57%) e uma lesão tipo I + IIc (14,28%); tipo IIc quatro lesões (16%) e três lesões tipo Ipl (12%).

### 3.7. CORRELAÇÃO PERCENTUAL GLOBAL DOS ACHADOS MICROSCÓPICOS COM A MACROSCOPIA DOS CARCINOMAS ESOFÁGICOS

Em trinta animais portadores de carcinoma esofágico, nos grupos T 120 (19 animais), T 150 (três animais) e T 200 (oito animais), encontraram-se 183 carcinomas epidermóide do esôfago com média de 6.1 por animal.

Foram diagnosticados 119 carcinomas *In situ* (65,02%) e a classificação macroscópica identificou: uma lesão tipo Ip (0,84%); 16 lesões tipo IIa (13,4%) e 102 lesões tipo IIb (85,7%).

O número de carcinomas microinvasivos foi de 24 (13,11%) e a classificação macroscópica identificou: cinco lesões tipo Ipl (20,8%); 17 lesões tipo IIa (70,8%); uma lesão tipo IIa + IIc (4,16%); uma lesão tipo IIb + IIc (4,16%). Em relação ao nível de invasão microscópica, foram encontrados: sete carcinomas microinvasivos mm1 (29,1%), quinze microinvasivos mm2 (62,5%) e dois microinvasivos mm3 (8,33%).

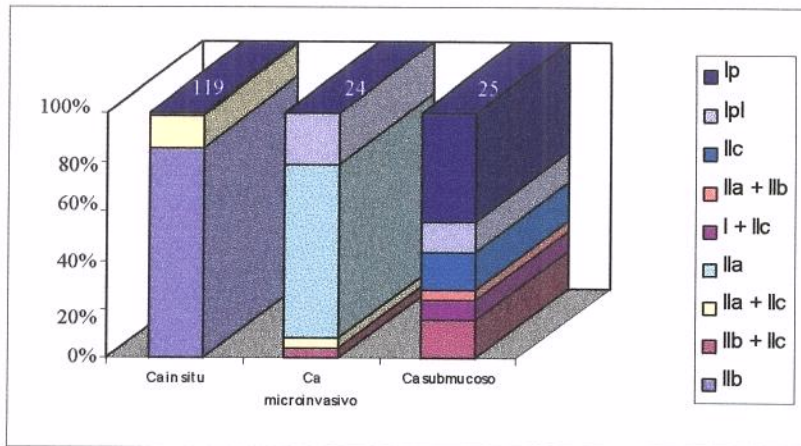
Ocorreram 25 carcinomas submucosos (13,66%) e a classificação macroscópica identificou: onze lesões tipo Ip (44%); três lesões tipo Ipl (12%); uma lesão tipo IIa + IIb (4,0%); quatro lesões tipo IIb + IIc (16%); duas lesões tipo I + IIc (8%) e quatro lesões tipo IIc (16%).

Em relação ao nível de invasão microscópica, foram encontrados: doze carcinomas submucosos sm1 (48%), dez submucosos sm2 (40%) e três submucosos sm3 (12%).

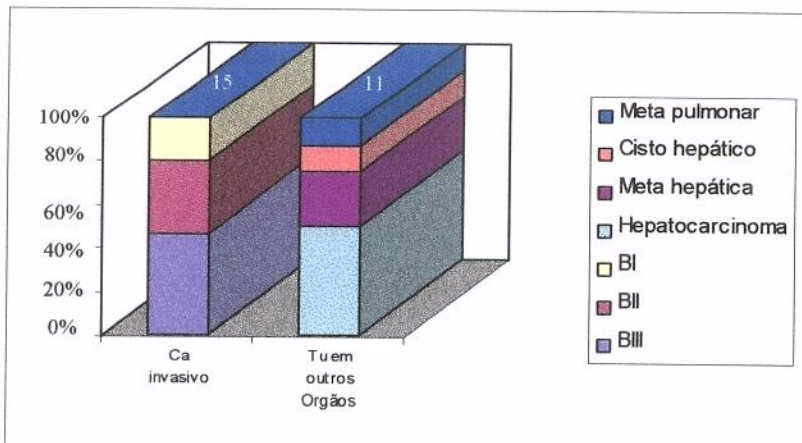
O total de carcinomas invasivos foi de quinze (8,19%) e a classificação macroscópica identificou: três lesões tipo BORMANN I (20%); cinco tipo BORMANN II (33,33%) e sete tipo BORMANN III (46,66%). Os gráficos 16 e 17, a seguir, mostram esses resultados.

Os gráficos 16 e 17, a seguir mostram estes resultados.





**Gráfico 16:** mostra a correlação percentual global do diagnóstico microscópico (carcinoma *In situ*, microinvasivo e submucoso) com os achados macroscópicos dos 183 carcinomas diagnosticados nos grupos T120, T150 e T200 (30 animais, média de 6,1 focos de carcinoma por animal).



**Gráfico 17:** mostra a correlação percentual global do diagnóstico microscópico dos carcinomas invasivos do esôfago e as lesões em outros órgãos com a macroscopia nos grupos T120, T150 e T200.

### **3.8. LOCALIZAÇÃO DOS CARCINOMAS ESOFÁGICOS**

Dos 183 carcinomas epidermóides do esôfago diagnosticados neste estudo, a localização mais frequente foi do terço médio com 87 (47,5%), seguidos do terço inferior com 69 (37,7%) e o terço superior com 27 (14,8%).

### **3.9. ÍNDICE DE MORTALIDADE GLOBAL DOS ANIMAIS DURANTE O EXPERIMENTO**

O índice de mortalidade dos animais, durante o experimento, variou conforme o tempo de exposição à droga (DEN) e o volume total de DEN ingerido.

Ao grupo controle (T0 dez animais, cinco machos e cinco fêmeas) foi oferecido água potável durante os 200 dias até o sacrifício, não ocorrendo óbitos nesse grupo.

O grupo T 90 (cinco machos) foi submetido à ingestão hídrica com DEN, três vezes por semana, durante o período de 90 dias. O volume médio ingerido de solução de DEN, por gaiola, nesse grupo foi de 4.008 ml. Não houve mortalidade nesse grupo.

O grupo T 120 (20 animais, 15 fêmeas e cinco machos) foi submetido à ingestão hídrica com DEN, três vezes por semana, durante 120 dias. O volume médio ingerido de solução DEN, por gaiola, nesse grupo, foi de 7.547 ml. Ocorreu um óbito (fêmea), com índice de 15% de mortalidade.

O grupo T 150 (cinco fêmeas) foi submetido à ingestão hídrica com DEN, três vezes por semana, durante o período de 150 dias. O volume médio ingerido de solução de DEN, por gaiola, nesse grupo foi de 7.900 ml. Ocorreram dois óbitos nesse grupo (fêmeas), com um índice de 40% de mortalidade.

O grupo T 200 (20 animais, 15 machos, cinco fêmeas) foram submetidos à ingestão hídrica com DEN, três vezes por semana, durante o período de 205 dias. O volume médio ingerido de solução de DEN, por gaiola, nesse grupo foi 12.732 ml.

Ocorreram doze óbitos, nesse grupo, nove machos (60%) e três fêmeas (60%). O percentual de mortalidade desse grupo foi de 60%.

A tabela 7: mostra o número de óbitos ocorridos, nos diferentes grupos, identificando o sexo e o volume de DEN ingerido, conforme o tempo de observação.

<b>Tempo de Observação</b>	<b>Nº de Óbitos</b>	<b>Volume Médio de DEN ingerido</b>
<b>T0</b>	Não houve	
<b>T90</b>	Não houve	4.008
<b>T120</b>	1 (fêmea)	7.547
<b>T150</b>	2 (fêmeas)	7.900
<b>T200</b>	12 (9 machos e 3 fêmeas)	12.732
<b>TOTAL</b>	15 (9 machos e 6 fêmeas)	32.187

O total de animais submetidos a ingesta hídrica com DEN, três vezes por semana, foi de 50 animais. O volume ingerido da solução de DEN por esses animais foi 32.187 ml. Ocorreram 15 óbitos, sendo que o percentual global de óbitos do grupo que ingeriu a solução de DEN foi de 30%.

A mortalidade dos animais foi proporcional ao tempo de exposição à droga e ao volume de DEN ingerido. Não houve diferença significativa de mortalidade entre fêmeas e machos.

### **3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O cálculo do Qui-Quadrado (apêndices 1 e 2), mostram que é possível comparar os valores das somas dos grupos T120 e T150, com os valores do grupo T200, agrupando com isso os valores dos carcinomas *In Situ* e microinvasivos versus carcinomas

que não existe diferença significativa entre os valores de T120 e T150, permitindo o seu agrupamento.

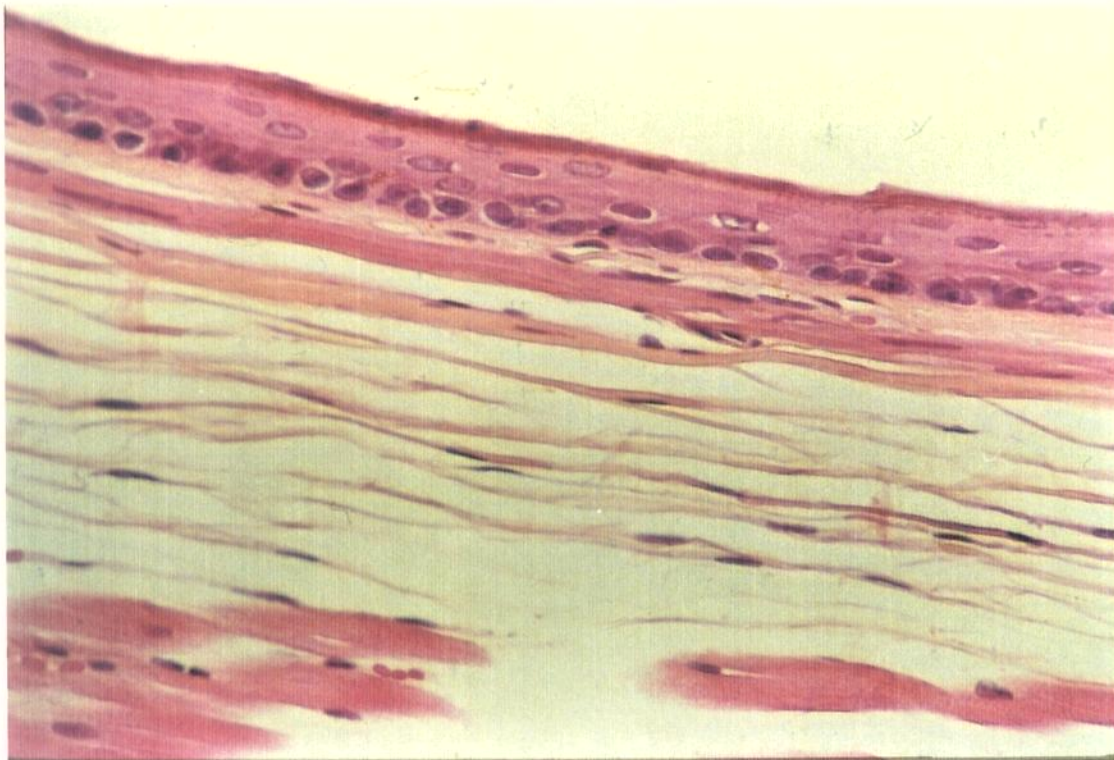
A tabela 8 abaixo mostra os valores absolutos e percentuais da soma dos grupos T120 e T150, com os valores do grupo T200:

<b>Tempo Micro</b>	<b>T120 + T150</b>	<b>T200</b>	<b>Total</b>
<i>In situ</i>	65 (54,62%)	54 (43,37%)	119
Microinvasivos	5 (20,83%)	19 (79,16%)	24
Submucoso	3 (12%)	22 (88%)	25
Invasivo	5 (33,33%)	10 (66,66%)	15
<b>Total</b>	<b>78 (42,62%)</b>	<b>105 (57,37%)</b>	<b>183</b>

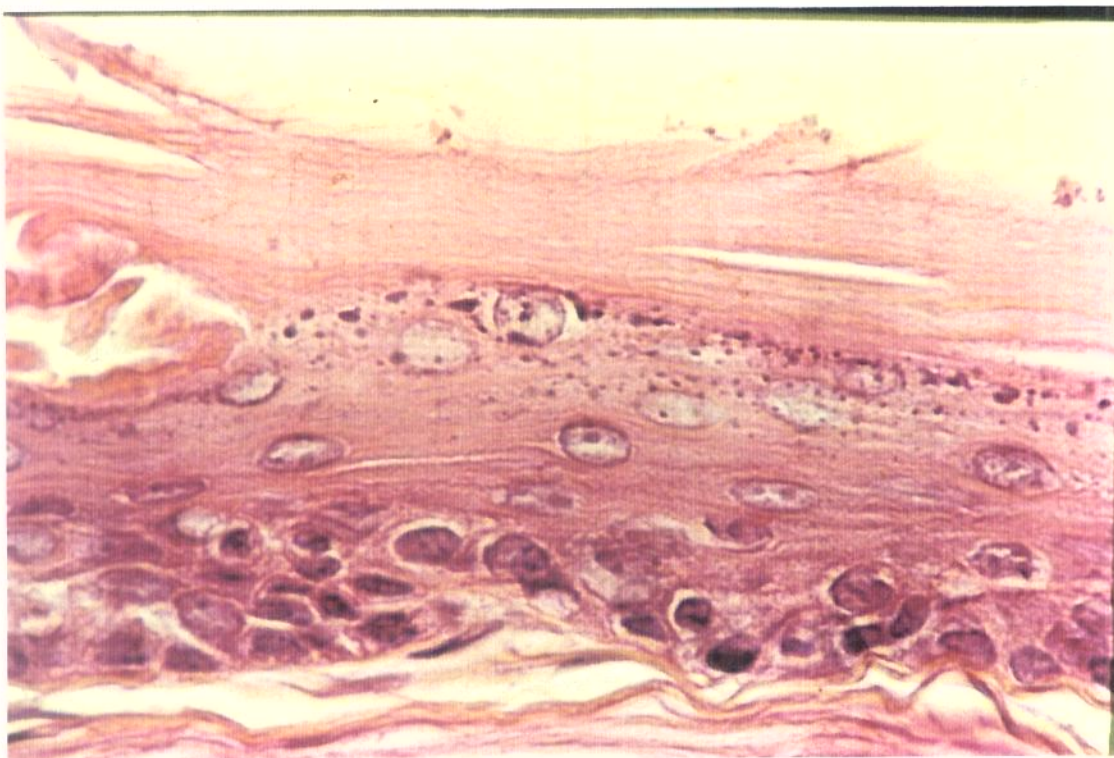
Tabela 8: mostra a correlação absoluta e percentual do total de carcinomas obtidos, agrupando-se os animais dos grupos T120 + T150 e comparando-os com o grupo T200.

Usando novamente o cálculo do Qui-Quadrado (apêndice 4), foi comparado a incidência de carcinomas *In situ* e microinvasivos com os submucosos e invasivos, agrupando-se os animais dos grupos T120 e T150, versus o grupo T200. O valor obtido de  $p=0,00007248$ , portanto  $p<0,05$ . Esse resultado mostra que existe diferença estatística significativa entre os grupos T120 + T150 versus T200. Portanto existe associação significativa entre o tempo de administração da DEN e a gravidade da evolução dos carcinomas encontrados.

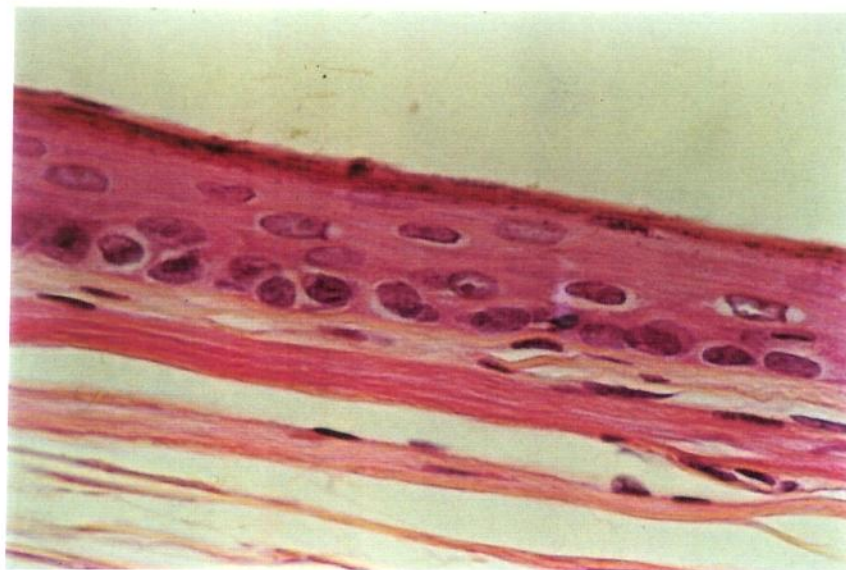
A seguir são demonstradas as microfotografias, figuras 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 e 26, mostrando respectivamente os diagnósticos histológico de esôfago normal, esofagite, papiloma, carcinoma *In situ*, carcinomas microinvasivos mm1, mm2, mm3 e carcinomas submucosos sm1, sm2, sm3:



**Figura 13:** Microfotografia mostrando aspecto histológico do esôfago normal com aumento de 100 vezes (grupo T0)



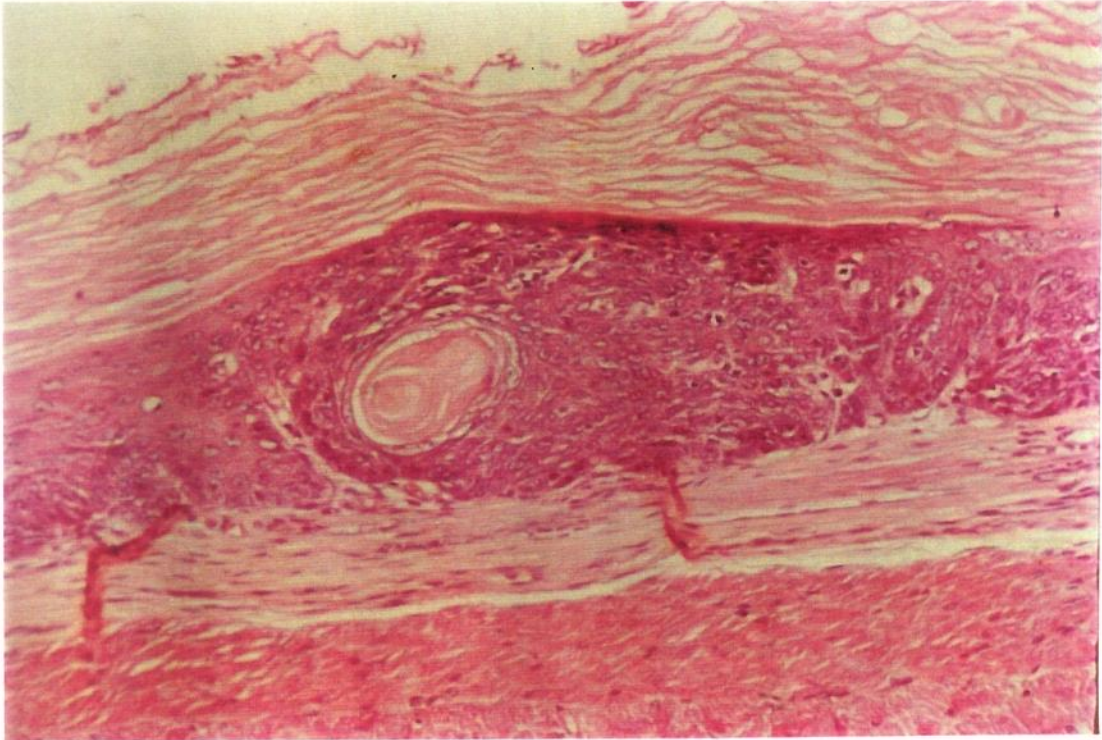
**Figura 14:** Microfotografia com aumento de 200 vezes mostrando esofagite, notar presença de células inflamatórias no epitélio esofágico (grupo T90).



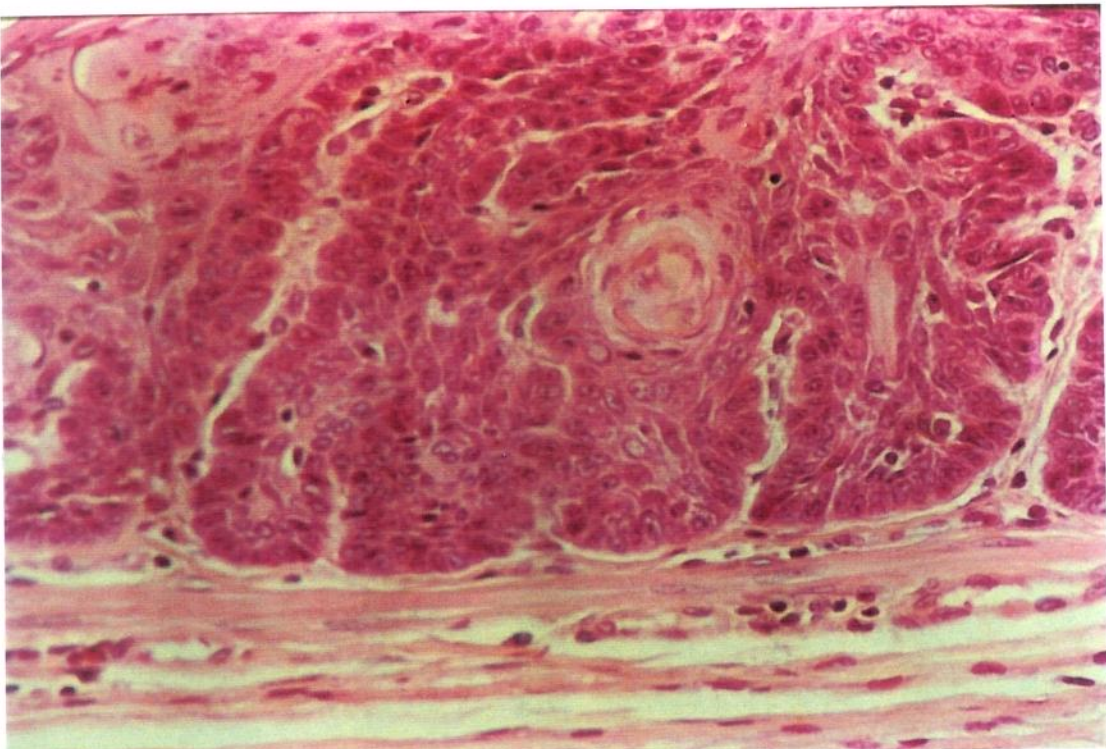
**Figura 15:** Microfotografia de esôfago normal com aumento de 200 vezes (grupo T0).



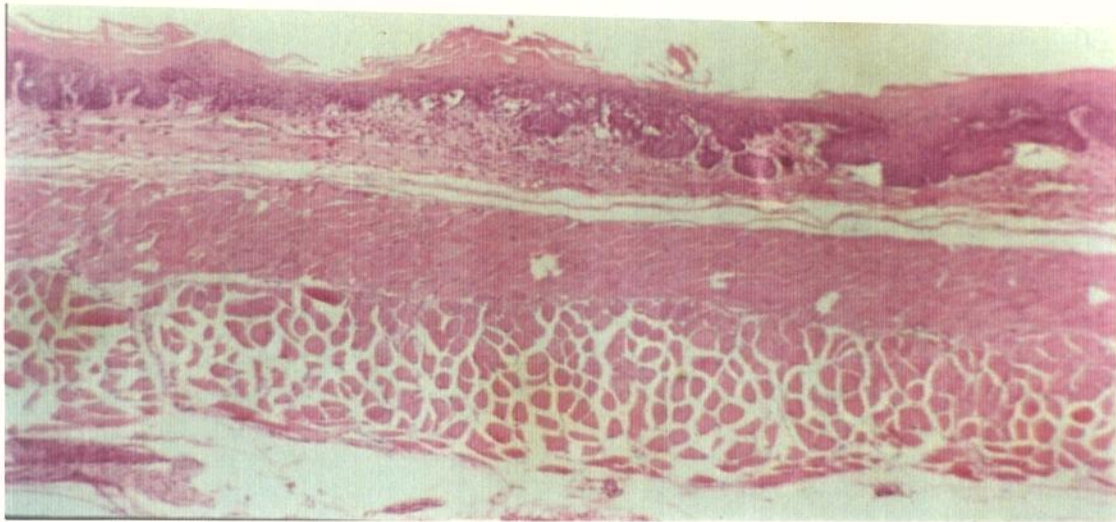
**Figura 16:** Microfotografia evidenciando expansão papilar do epitélio, caracterizando um papiloma com aumento de 200 vezes (grupo T200).



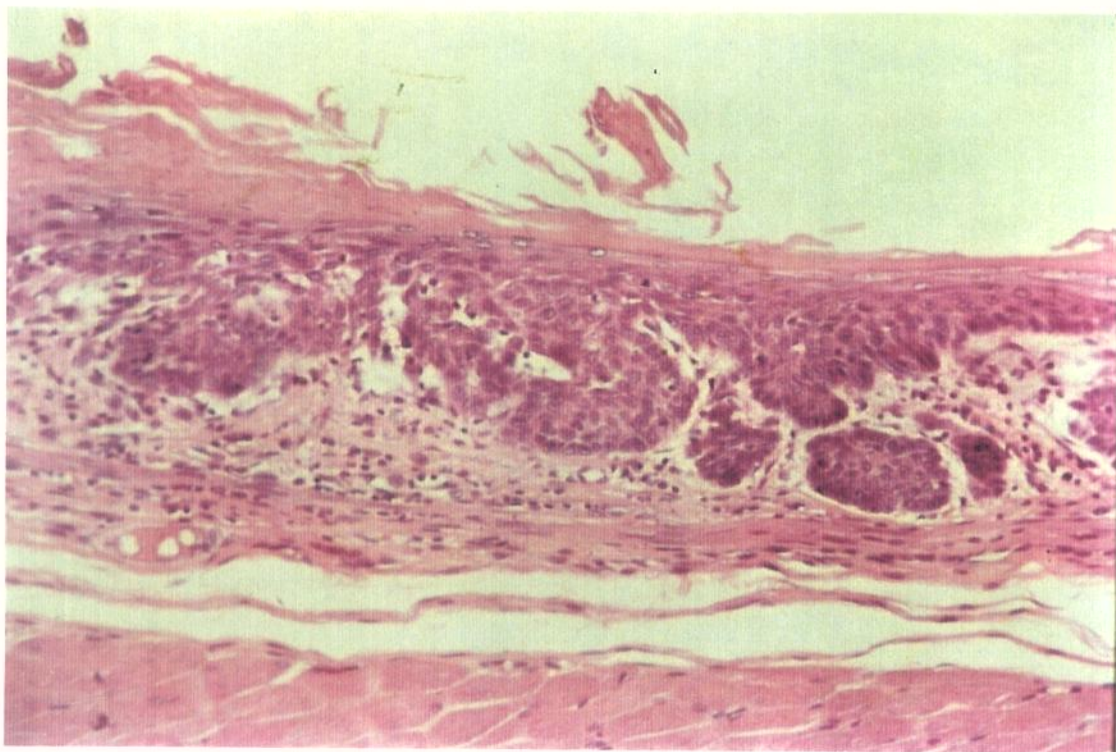
**Figura 17:** Microfotografia mostrando alterações de maturação celular com atipias evidentes restritas ao epitélio plano (tipo IIb). Carcinoma *In situ* aumento de 100 vezes (grupo T200).



**Figura 18:** Microfotografia mostrando o carcinoma *In situ* da figura 17 com aumento de 200 vezes, nota-se limite preciso da invasão epitelial (grupo T200).

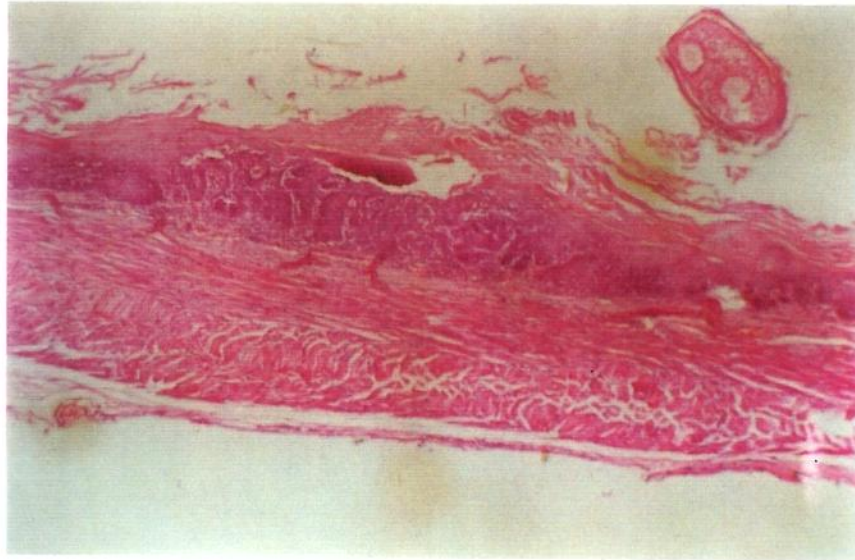


**Figura 19:** Microfotografia mostrando carcinoma microinvasivo mm1, nota-se a progressão de um carcinoma intra-epitelial invadindo superficialmente a lâmina própria. Aumento de 40 vezes (grupo T200).

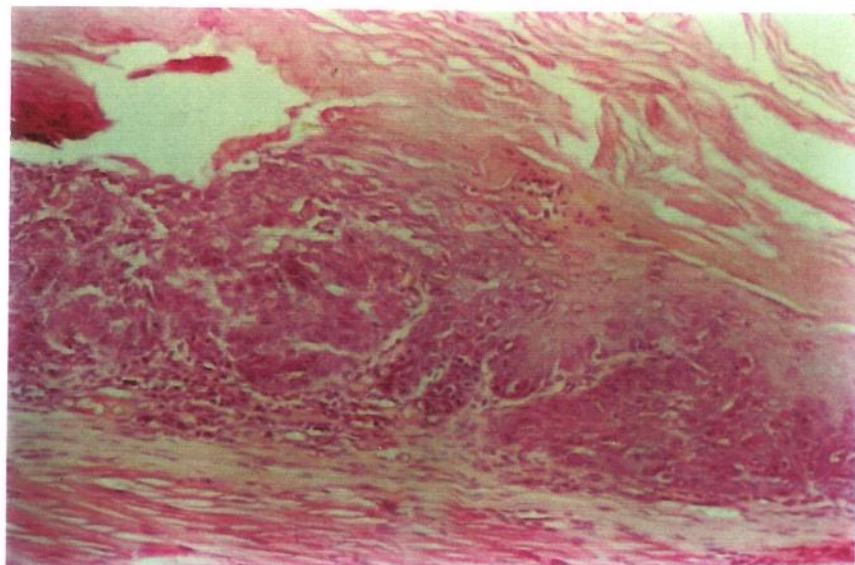


**Figura 20:** Microfotografia mostrando o carcinoma microinvasivo mm1 da figura 19 com aumento de 100 vezes, nota-se o detalhe da invasão superficial da lâmina própria (grupo T200).





**Figura 21:** Microfotografia mostrando carcinoma microinvasivo mm2 com invasão mais acentuada da lâmina própria aumento de 40 vezes (grupo T200).



**Figura 22:** Microfotografia mostrando o carcinoma microinvasivo mm2 da figura 21 com aumento de 100 vezes. Nota-se um crescimento superficial (“superficial spreading”) até o terço médio da lâmina própria (grupo T200).

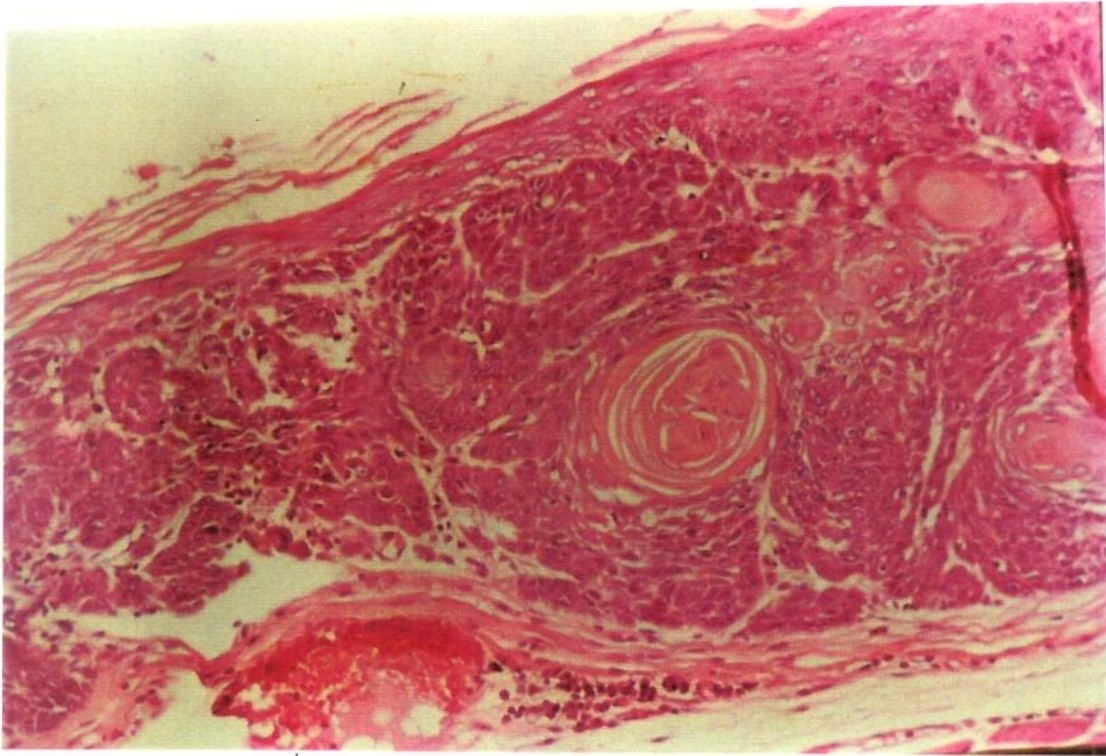


Figura 23: Microfotografia mostrando carcinoma microinvasivo mm3. Nota-se invasão superficial da *musculares mucosae*. Aumento de 100 vezes (grupo T200).

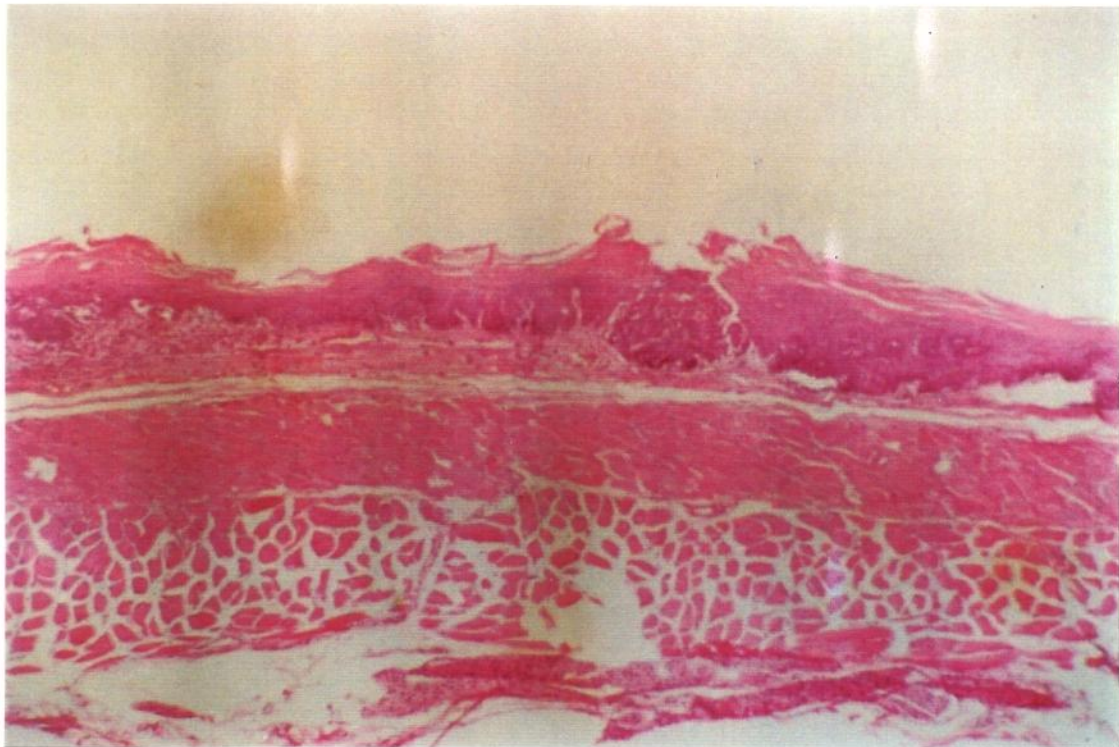
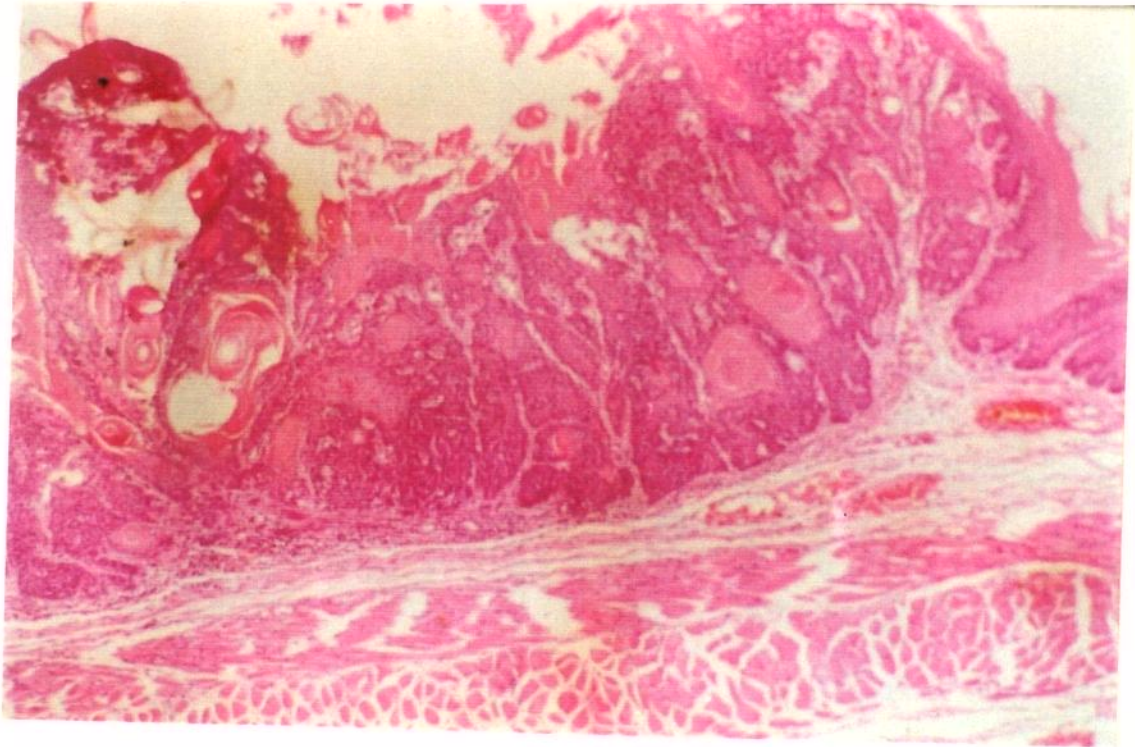
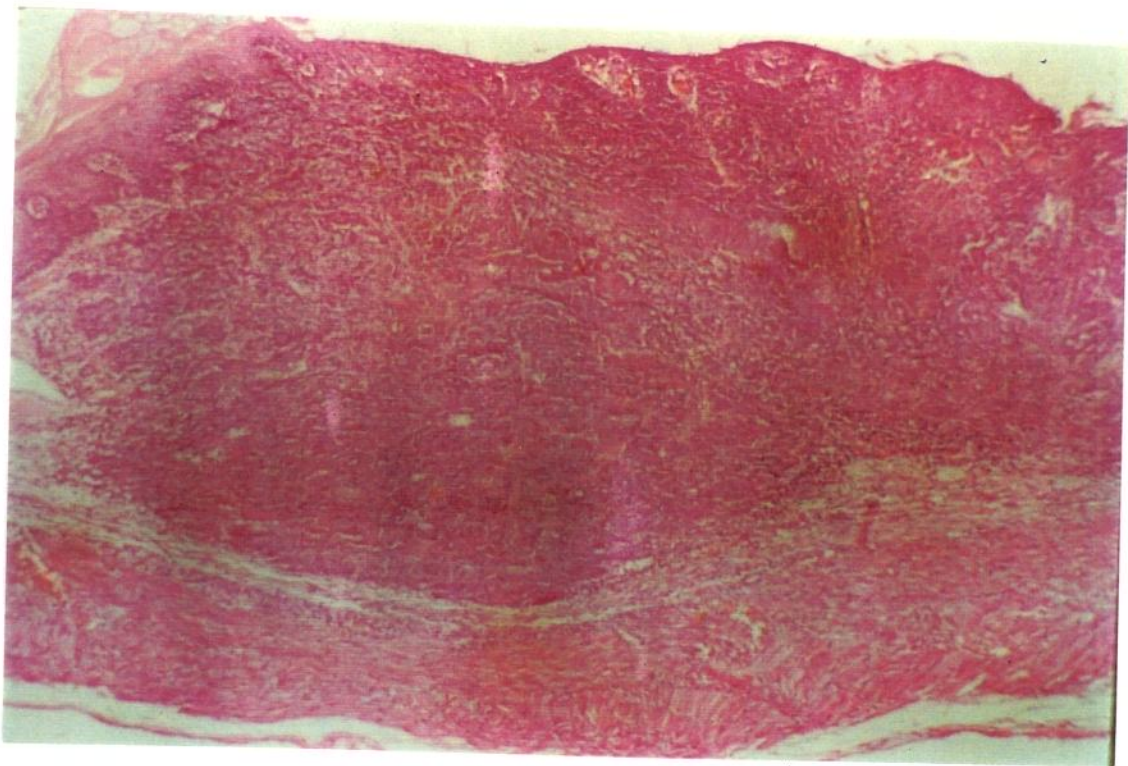


Figura 24: Microfotografia mostrando carcinoma submucoso sm1. Nota-se invasão superficial da submucosa. Aumento de 40 vezes (grupo T200).



**Figura 25:** Microfotografia mostrando carcinoma submucoso sm2. Nota-se invasão mais profunda da submucosa. Aumento de 100 vezes (grupo T200).



**Figura 26:** Microfotografia mostrando carcinoma submucoso sm3. Nota-se invasão evidente de toda a mucosa, rebatendo a muscular própria. Aumento de 100 vezes (grupo T200).



## ***4. Discussão***

#### **4.1. DIFICULDADES NA CARCINOGENESE QUÍMICA EXPERIMENTAL**

A utilização de modelos experimentais para o estudo da carcinogênese esofágica foi consolidada na década de 60 (DRUCKREY, 1961).

Desde então as dificuldades apresentadas para esse estudo foram evidentes. As drogas utilizadas são altamente tóxicas exigindo cuidados adequados para a manipulação das mesmas, com profissionais treinados para esse procedimento. A dose usada é muito pequena em relação a solução padrão, com isso o processo de diluição necessita de materiais de alta precisão.

Os animais utilizados na maioria dos experimentos são ratos ou camundongos que tem uma longevidade pequena. O tempo de observação é prolongado podendo ocorrer a morte desses animais antes do término do experimento. O efeito tóxico do carcinógeno principalmente no fígado, também leva a morte precoce desses animais.

Geralmente a dose da droga é padronizada pelo peso do animal necessitando correção da diluição de acordo com a variação do peso. Isso implica em manipulação maior e com riscos e tempo despendidos inerentes a esse procedimento. Torna-se evidente com isso que a monitorização dessas variantes é fundamental para obter resultados fidedignos na pesquisa. Isso exige um cuidado rigoroso dos pesquisadores e profissionais envolvidos nessa atividade.

Finalmente, a manipulação cirúrgica desses animais é dificultada pelo seu tamanho. Deve-se ter cuidado na retirada do espécime em estudo para não inutilizá-lo, perdendo com isso todo o trabalho despendido durante a realização do experimento.

Na tentativa de obviar essas dificuldades contamos com profissionais treinados na manipulação da droga e nos cálculos exatos da sua concentração corrigidas durante todo o experimento dependendo da variação do peso dos animais. A técnica descrita na metodologia para a retirada do espécime, facilitou a obtenção da mesma sem perda do material em estudo.

A mortalidade devido a toxicidade hepática foi minorizada usando a DEN em dias alternados durante todo o experimento (RUBIO, 1983; KRUEL, 1992).

#### 4.2. COMPOSTOS N-NITROSOS E CARCINOGENESE ESOFÁGICA

Os compostos N-nitrosos começaram a ganhar importância na década de 1930, quando a N-nitrosodimetilamina foi estudada como um solvente industrial, por ser solúvel tanto em hexano como em água, sendo usada por suas propriedades anti-corrosivas (HOTCHKISS, 1987). Entretanto, efeitos tóxicos agudos, observados em seres humanos, incluindo insuficiência hepática aguda, motivaram estudos relativos à sua exposição. Rapidamente, demonstrou-se que a N-nitrosodimetilamina causava necrose hepática em camundongos e cães expostos a seu vapor (FREUND, 1937). Investigações mais detalhadas dos efeitos tóxicos agudos da N-nitrosodimetilamina foi realizada por BARNES & MAGEE em 1954. A toxicidade aguda, em seres humanos, foi confirmada, pelo uso da N-nitrosodimetilamina para cometer suicídio, apresentando como *causa-mortis* insuficiência hepática (FUSSAENGER & DITSCHUNEIT, 1980).

Demonstrou-se que em tecidos humanos *in vitro*, expostos à N-nitrosodimetilamina, houve a alquilação do DNA (HARRIS et al, 1979). Em todos esses estudos porém, o nível de exposição ao composto N-nitroso foi de várias ordens de grandeza, maior do que a presente no ambiente ou na dieta e a principal preocupação consiste na exposição crônica ao composto e não em seus efeitos agudos.

A primeira suspeita de que alimentos poderiam conter ou estarem contaminados com compostos N-nitrosos surgiu na década de 1950, na Noruega. Animais domésticos alimentados com carne de peixe preservada morreram devido a severas alterações hepáticas. A N-nitrosodimetilamina foi posteriormente isolada como fator etiológico das lesões hepáticas e se propôs que a adição de nitrito ao peixe reagiria com as dimetil e trimetilaminas presentes no mesmo, formando o derivado N-nitroso (ENDER et al, 1964). Posteriormente, estudou-se a formação das N-nitrosaminas nos alimentos, demonstrando-se

que: (a) o processamento de carne de peixe a temperaturas mais elevadas, (b) maior tempo de estocagem (provavelmente por aumentar a concentração de aminas livres, durante esse tempo) e (c) maiores quantidades de nitritos adicionados ao alimento, determinavam uma toxicidade maior desses alimentos (ENDER et al, 1967).

O primeiro relato de alimento para seres humanos, contendo composto N-nitroso, foi feito no início da década de 1960, envolvendo cogumelo, sendo identificado o N-nitroso 4 - metilaminobenzaldeído. Vários outros relatos, indicando a presença das N-nitrosaminas em alimentos humanos se seguiram, incluindo peixes e carnes processadas (ENDER & CEH, 1968), trigo, leite e queijo (HEDLER & MARQUARDT, 1968), carnes frescas (MOHLER & MAYROHFER, 1968) e queijo (FREIMUTH & GLASER, 1970). O grande número de estudos conduzidos na década de 60 sobre a presença desses compostos nos alimentos ingeridos pelo homem, levou o IARC - INTERNATIONAL AGENCY for RESEARCH on CANCER em 1978 a sugerir que os compostos N-nitrosos poderiam estar relacionados à etiologia do câncer no homem, especialmente o câncer de esôfago.

O grupo funcional que determina os compostos N-nitrosos é N-N=O e podem ser classificados em dois tipos: as N-nitrosaminas, derivados de aminas secundários e as N-nitrosamidas derivadas de amidas, uréias, carbonatos ou guanidinas (FRIDMAN, 1971; CHALLIS, 1981).

Foi demonstrado que as N-nitrosaminas são compostos bastante estáveis, sobretudo nas condições em que se encontram os alimentos (FAN & TANNENBAUM, 1972), sendo portanto mais comumente encontradas como contaminantes alimentares e ambientais. Por outro lado, as N-nitrosamidas são compostos instáveis em pH, abaixo de dois e acima de sete. Demonstrou-se que as N-nitrosamidas são destruídas pelo processo de cozimento (KAKUDA, 1980).

Os compostos N-nitrosos são gerados segundo uma reação de nitrosação (RIDD, 1961; CHALLIS & BUTLER, 1968; INGOLD, 1969; MIRVISH, 1975), na qual um agente nitrosante (X-N=O), gerado a partir de ácido nitroso e um nucleófilo catalítico reagem com amina não protada ou amida, levando a formação do composto N-nitroso. Aminas secundárias e amidas formam compostos estáveis, porém aminas primárias se decompõem em nitrogênio molecular e íon carbonium.

Mais de 90% dos 300 compostos N-nitrosos pesquisados em animais foram capazes de produzir carcinomas (HOTCHKISS, 1987). Entretanto, as atividades biológicas carcinogênicas das N-nitrosaminas e das N-nitrosamidas possuem diferenças marcantes. As N-nitrosaminas não possuem atividade carcinogênica intrínseca devido à sua instabilidade química, sobretudo em pHs elevados. Dessa maneira, é possível entender que as N-nitrosamidas são substâncias mutagênicas que produzem lesões, preferencialmente, no local de aplicação, em oposição às N-nitrosaminas, que produzem tumor, geralmente, em sítios distantes do local de aplicação.

A ativação metabólica das N-nitrosaminas é feita através da hidroxilação do carbono alfa em relação ao nitrosamino nitrogenado. A alfa-hidroxinitrosamina resultante é quimicamente instável e espontaneamente forma um aldeído e uma monoalquilnitrosamina, que forma um diazohidróxido primário. A perda do íon hidróxido leva a formação de um diazoalcano e portanto a um sal diazenium. Este último se decompõe em nitrogênio molecular. Não se sabe ao certo se o intermediário alquilante, ou seja o carcinógeno final é o diazoalcano (sal diazanium) ou íon carbônio (BROOKES et al, 1966; GOLDSTEIN, 1974; ARCHER, 1982).

Demonstrou-se a importância da alfa hidroxilação *in-vivo*, catalizada por um sistema oxidante, provavelmente o citocromo P450, encontrado na mitocôndria dos hepatócitos e sistema retículo endotelial do fígado e epitélio esofágico (LIJINSKY, 1968).



Um dos aspectos que mais chamaram a atenção na carcinogênese, induzida pelos compostos N-nitrosos, foi que se tratam de carcinógenos capazes de gerar agentes alquilantes que interagem com o DNA de certos órgãos alvo, causando a mutação e a transformação neoplásica e, por fim, o carcinoma. Os primeiros estudos que observaram essa relação ocorreram nas décadas de 50 e 60 (MAGEE & BARNES, 1956 e DUCKREY, 1967). Uma extensa revisão foi feita em 1987, por LIJINSKY, sobre os efeitos carcinogênicos das N-nitrosaminas em ratos e hamsters, observando que, doses contínuas, via oral, diluídas na água de beber, produziram respostas, em geral diferentes de doses do mesmo composto, via gavagem, mesmo com a administração da mesma dose total.

Embora o fígado tenha sido o sítio comum de muitas nitrosaminas, tanto em ratos como em hamsters, houve diferença no padrão de resposta ao tratamento com esses carcinógenos, dependendo do animal utilizado. O esôfago foi o sítio de indução tumoral mais freqüente em ratos, porém não se observou carcinoma de esôfago nos hamsters tratados.

A descoberta dos efeitos organotrópicos das nitrosaminas permitiu o desenvolvimento de modelos de estudo de câncer nos vários sítios dessa doença, observados no homem. Nas linhagens de rato, utilizadas mais freqüentemente, as dialquilnitrosaminas simétricas induzem ao câncer de fígado e, em menor proporção, ao câncer renal, pulmonar e esofágico. Por outro lado, as dialquilnitrosaminas assimétricas levam a maior incidência do câncer de esôfago (DRUCKREY, 1963; HOTCHKISS, 1987). Contudo, vários trabalhos utilizando a dietilnitrosamina (uma dialquilnitrosamina simétrica), mostraram ser ela capaz de provocar a carcinogênese esofágica, contrariamente ao esperado (BAKER, 1974; REUBER, 1975 e 1976; RUBIO, 1982 e 1983).

Esta contradição levou REUBER em 1976 a questionar se as diferentes localizações dos tumores produzidos pelas nitrosaminas, tanto simétricas como assimétricas, poderiam ser quantitativas em vez de qualitativas, isto é a indução de tumor, em determinado órgão alvo, seria dependente mais da dose de nitrosamina administrada do que da estrutura química da referida nitrosamina.

A demonstração de que o tratamento com a dietilnitrosamina causa carcinoma esofágico, além de hepática, levantou, inicialmente, a suspeita de que poderia haver ação carcinogênica direta da droga, na indução do tumor esofágico, ou que o intermediário alquilante poderia ser produzido localmente e não, necessariamente, dependente da metabolização hepática (CLAPP, 1967).

Essa segunda hipótese, mais provável, também é discutida em trabalhos posteriores, nos quais se assumem que o esôfago possuiria potencial bioquímico de produzir o carcinógeno propriamente dito (BAKER, 1974). Esse modelo de ativação enzimática para explicar o efeito carcinogênico da dietilnitrosamina, com formação de intermediário alquilante, é plausível para explicar a tumorigênese hepática induzida por essa nitrosamina, considerando o fígado como grande sítio do metabolismo enzimático. Entretanto, não explica a indução de tumor em outros sítios, como por exemplo, o esôfago.

Posteriormente, estudos realizados na década de 90 demonstraram existir correlação entre a dose e o tempo de exposição à dietilnitrosamina e o sítio de indução tumoral, sendo que a aplicação de doses altas de nitrosaminas produziam mais carcinomas hepáticos e doses baixas e por tempo prolongado induziam mais carcinomas esofágicos (PETO, 1991).

Nesse estudo, foi usado como agente carcinógeno a dietilnitrosamina na dose de 10mg / kg de peso, oferecida na água de beber dos ratos WISTAR, três vezes por semana. Essa metodologia foi aplicada, tentando-se com isso diminuir os efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos da DEN (RUBIO, 1982, 1983; KRUEL, 1992), obtendo-se com isso uma mortalidade menor dos animais de experimentação.

O aparecimento do carcinoma epidermóide no esôfago ocorreu a partir do grupo T120 (120 dias de exposição à droga), de modo que modelo experimental proposto mostrou-se efetivo em produzir carcinoma epidermóide do esôfago. Considerando um total de 30 animais que sobreviveram ao uso da DEN ( T120 = 19 animais, T150 = três animais e T200 = oito animais) e desenvolveram câncer esofágico, foram diagnosticados 183

carcinomas espinocelular do esôfago, com a média de 6.1 carcinomas, por animal examinado.

A DEN mostrou uma especificidade significativa em causar carcinoma esofágico, já que não ocorreu nenhuma lesão gástrica e houve apenas sete hepatocarcinomas, duas metástases hepáticas, um cisto hepático hemorrágico e uma metástase pulmonar nesse grupo de 30 animais.

Os resultados obtidos nesse estudo corroboram a idéia de que a dietilnitrosamina, mesmo sendo uma dialquilnitrosamina simétrica, é muito efetiva em induzir câncer do esôfago, e isto deve-se, provavelmente, ao uso da droga em dose baixa e a um tempo prolongado de exposição do animal de experimentação.

#### 4.3. INCIDÊNCIA DE CÂNCER ESOFÁGICO EM MODELOS EXPERIMENTAIS INDUZIDOS PELA DEN

Vários autores induziram câncer esofágico em ratos e camundongos utilizando a dietilnitrosamina, a tabela 9, abaixo mostra a incidência de câncer esofágico induzido experimentalmente, com compostos N-nitrosos, por vários autores:

Autor / Data	Droga / Dose / Tempo	Animal / Câncer
Clapp, N.K. 1967	dietilnitrosamina 4mg / 100ml ± 6mg/kg/dia 22 semanas	camundongo RF/Um 100% estômago 18% esôfago
Napalkov, N.P. 1969	N-metil N nitrosoamilina 14n 28mg/kg 268.9n 1472.2mg 3 meses n 20 meses	ratos albinos 11:42 - 26.1%
Baker, J.R. 1974	dietilnitrosamina 40 ppar média 145 dias	hamsters chineses 23% estômago 15% esôfago
Reuber, M.D. 1975	dietilnitrosamina 0.0114% 26 semanas	ratos linhagem Buffalo 50%
Mandard, A.M. 1984	DEN 5 à 10mg/kg até 4 meses	Rato WISTAR 2,5% esôfago
Rubio, C. 1987	DEN 0.04ml/1000ml até 7 meses	Camundongo 100% esôfago

Tabela 9: mostra alguns autores que utilizaram a DEN em carcinogênese esofágica experimental.

Pode-se observar que a incidência de carcinoma epidermóide de esôfago induzidos pela DEN é proporcional a dose usada, ao tempo de exposição ao carcinógeno e a espécie de animal usada na pesquisa. Além disso, na literatura consultada apenas MANDARD et al, (1984) utilizaram-se de ratos WISTAR para o estudo de carcinogênese esofágica.

Nesse estudo a droga utilizada foi a DEN, na dose de 10mg/kg de peso, e o animal utilizado foi o rato WISTAR. Sobreviveram trinta animais dos grupos T120, T150 e T200, os quais ao todo apresentaram 183 carcinomas epidermóides do esôfago com uma incidência de 100%. A média de focos de carcinomas por esôfago examinado foi de 6.1.

#### **4.4. USO DO LUGOL NO DIAGNÓSTICO DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DO ESÔFAGO**

A coloração com lugol para o diagnóstico do câncer epidermóide foi padronizada por SCHILLER em 1933, usado no colo uterino. O princípio do método consiste na presença ou não de glicogênio no epitélio escamoso e sabe-se que as áreas de carcinoma não possuem glicogênio portanto não são coradas pelo lugol, determinando uma reação lugol negativo.

A importância do uso do lugol, no diagnóstico precoce do carcinoma epidermóide do esôfago, foi claramente evidenciado por SUGIMACHI et al, (1991). Esse estudo demonstrou que, durante os anos de 1965 a 1969, o lugol não era utilizado e o diagnóstico de carcinoma precoce foi determinado em somente 2,6% dos pacientes examinados, porém, entre os anos de 1985 a 1989, com a utilização do lugol o índice de diagnóstico precoce subiu para 23%.

A avaliação endoscópica associada à coloração com lugol, como método de triagem para o carcinoma esofágico, foi realizada em 5.000 pacientes assintomáticos entre o ano de 1990 e 1993. Foram diagnosticados 17 carcinomas de esôfago, sendo que 60% desses eram precoces (NISHIZAWA et al, 1994).

A coloração com lugol obedece as seguintes preceitos: (a) é uma reação química entre iodo e glicogênio presente no epitélio escamoso, (b) os graus de coloração correlacionam o conteúdo de glicogênio no epitélio, sendo mais intensamente corado onde o conteúdo de glicogênio epitelial é maior, (c ) as áreas não coradas pelo lugol correspondem a lesões como esofagite, hiperqueratose, papiloma, mucosa gástrica ectópica (Esôfago de BARRETT), epitélio atípico e carcinoma de células escamosas (KAWAMURA & KOIKE, 1994).

Baseado nesses preceitos e sabendo que, áreas não coradas pelo lugol, não são necessariamente uma lesão cancerosa, KOUZU et al, (1994), propuseram uma classificação baseada na intensidade da coloração, correlacionando-a com o diagnóstico histológico, a saber:

- Grau I - é uma área fortemente corada e corresponde a acantose glicogênica (100%);
- Grau II - considerado o grau de coloração de lugol padrão da mucosa esofágica normal (100%);
- Grau III - é uma lesão levemente corada, porém, evidentemente, menos intensa que o padrão normal e corresponde a áreas de esofagite, em 88% dos casos;
- Grau IV - a lesão fica amarelada com a solução de lugol, mas não é corada, sendo que o diagnóstico histológico foi de carcinoma em 17,7% e epitélio atípico ou esofagite em 82,3%;
- Grau V- é uma lesão completamente não corada, repelindo a solução de lugol e parece branca. O diagnóstico histológico do carcinoma foi positivo em 80,3% dos casos examinados.

Uma situação crítica para o diagnóstico do carcinoma precoce do esôfago são as lesões planas tipo 0-IIb.

Esse tipo de lesão, dificilmente seria diagnosticado por um exame endoscópico sem coloração com lugol. Geralmente, são carcinomas intra-epiteliais ou microinvasivos (mm1), cujo tratamento pode ser realizado através de mucosectomia endoscópica, valorizando ainda mais a importância do diagnóstico dessas lesões (MACHIMURA et al, 1994; MORIKAWA et al, 1994; ITO et al, 1994; NAKANO et al 1994).

Nesse estudo, consideramos lugol negativo somente as lesões completamente não coradas pelo lugol que correspondem ao grau V de KOUZU et al, (1994).

Provavelmente, deva-se a isso ao fato da sensibilidade de especificidade, de 100% dos 183 carcinomas diagnosticados, serem lugol negativo.

As lesões planas tipo IIb corresponderam a 102 lesões, representando 55,73% dos carcinomas diagnosticados nessa pesquisa. O diagnóstico histológico foi de carcinoma *In situ* (intra-epitelial) em todas as 102 lesões tipo IIb. É importante considerar que a visualização macroscópica dessas lesões, por muitas vezes, só foi possível após a coloração com lugol. A avaliação macroscópica à fresco, permite suspeitar das lesões IIb, em áreas planas na mucosa esofágica com uma coloração mais pálidas, avermelhadas ou amareladas com ou sem microerosões em relação ao epitélio adjacente. A coloração com lugol mostra áreas de epitélio lugol negativo, sugestivo de lesão superficial plana tipo IIb. Porém é necessário esclarecer que nesse estudo as 102 lesões tipo IIb foram diagnosticadas, associando-se os achados da macroscopia à fresco, coloração com lugol e análise microscópica, sendo essa última responsável pelo diagnóstico da maioria das lesões superficiais planas tipo IIb.

#### **4.5. LESÕES CONSIDERADAS PRECURSORAS DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DO ESÔFAGO**

As lesões precursoras são definidas como alterações histológicas associadas ao risco de câncer (CORRÊA, 1982). Os estudos que tentam definir essas lesões baseiam-se em necropsias e peças cirúrgicas de pacientes portadores de câncer (CRESPI, 1979, 1984).

Estudos realizados por POSTLETHWAIT et al em 1974 e MANDARD et al em 1978 e 1981, analisaram as alterações de mucosa próximas ao tumor denominando de displasias e considerando como “pré-cancerosas”. No entanto não descreveram possíveis lesões que precedam a displasia. Uma pesquisa coordenada pelo COORDINATING GROUP FOR THE RESEARCH OF ESOPHAGEAL CARCINOMA, em 1974 e realizada na população chinesa de alto risco demonstrou que 27% das displasias envolvem para câncer.

O uso dos termos “pré-canceroso” ou “pré-maligno” é interpretado como antecedente obrigatório para o carcinoma invasivo (CORRÊA, 1982). Sabe-se no entanto que muitas dessas lesões não evoluem para carcinoma invasivo (KRUEL, 1992). Baseado nisso foi proposto o uso do termo “precursor” por implicar condições que precedem cronologicamente o câncer porém a progressão para a doença invasiva não seria inexorável. (KRUEL, 1992).

As lesões mais frequentemente consideradas como precursoras do carcinoma epidermóide do esôfago segundo KRUEL, 1992 são: (a) Esofagites - essa lesão é prevalente em 96% dos pacientes portadores de carcinoma esofágico na China e Irã e em 58% na África do Sul e Japão (ROSE, 1981), (b) Acantose glicogênica e leucoplaca - é um termo usado para designar áreas de acúmulo de glicogênio na superfície da mucosa esofágica e segundo CRESPI em 1979 é um achado frequente em populações de alto risco. (c) Atrofia supra papilar - é encontrada em 8 a 13% da população do nordeste do Irã, pode estar associada à hiperplasia da camada basal, traduzindo uma alteração na maturação celular (KRUEL, 1992). Em estudo recente relacionando pacientes com esofagite caústica e

o desenvolvimento de carcinoma esofágico, o achado histológico de atrofia supra-papilar foi frequente nos pacientes que desenvolveram carcinoma epidermóide do esôfago (MOURA, 1996). (d) Papilomas - é definido morfológicamente como um crescimento exofítico do epitélio esofágico. A sua presença na população de alto risco é pequena porém mais freqüente em modelos experimentais. (MANDARD, 1984). (e) Displasias - são consideradas como alterações do epitélio esofágico, mudando a sua arquitetura, com proliferação de células atípicas e perda parcial da polaridade, constituindo clones celulares com fenótipo morfológicamente anormal (KRUEL, 1992). São divididas em mínimas, moderadas e acentuadas conforme o grau de comprometimento do epitélio.

No presente estudo tende-se a considerar a esofagite, acantose glicogênica, leucoplasia e papilomas como alterações paraneoplásicas e não pré-neoplásicas.

A atrofia papilar parece ser uma alteração genotípica inicial que pode evoluir para um fenótipo tumoral (MOURA, 1996).

Um dos pontos mais conflitantes no diagnóstico histológico do carcinoma precoce do esôfago é a diferença conceitual entre displasia e neoplasia intra-epitelial (Carcinoma *In situ*).

As displasias foram conceituadas inicialmente como alterações citológicas sugestivas mas não conclusivas de neoplasia no colo uterino (PAPANICOLAOU, 1949).

Em 1961 a Academia Internacional de Citologia, através do seu Comitê de Terminologia aprovou o termo displasia orientando que deveria ser considerado carcinoma *In situ* as lesões que apresentavam células atípicas e ocupavam toda a espessura do epitélio, sendo classificadas como displasias, todas as lesões que apresentavam distúrbios de diferenciação celular e que não ocupavam toda a espessura do epitélio (WIED, G.L, 1962). Entretanto essa classificação histológica permaneceu controversa devido a dificuldade de diferenciar displasia de carcinoma *In situ*.



Em 1985 DRAKE propôs o termo neoplasia intra-epitelial pré-cancerosa como única terminologia para às lesões “precursoras” das neoplasias epiteliais, porém persistiram às divergências. (DRAKE, 1984).

Em 1989 a Sociedade Americana de Citologia propôs os termos lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau e lesão intra-epitelial escamosa de alto grau para designar as alterações citopatológicas do colo uterino, considerando o potencial dessas lesões em desenvolver carcinoma invasor.

Esse modelo de classificação citopatológica do colo uterino foi adotado por KRUEL em 1992 para o estudo citológico do carcinoma epidermóide de esôfago em animais de experimentação.

Em 1989 RUBIO estudou 119 espécimes de esofagectomia com neoplasia intra-epitelial classificando-as como: (a) neoplasia intra-epitelial de baixo grau (incluindo displasias leve e moderada), (b) neoplasia intra-epitelial de alto grau (incluindo displasia severa e carcinoma *In situ*), (c ) carcinoma escamoso micro-invasivo (carcinomas que invadem até a sub-mucosa e não apresentavam metástases para linfonodos regionais).

A Escola Japonesa classifica os carcinomas como: (a) carcinoma *In situ* ou neoplasia intra-epitelial - todas as lesões restritas ao epitélio, independentemente da espessura do epitélio que essas lesões ocupam, (b) Carcinoma micro-invasivo - todas as lesões que invadem a lâmina própria até a musculares mucosae e sub-divide em (mm1,mm2 e mm3), (c ) Carcinoma submucoso - todas as lesões que invadem a submucosa até próximo a muscular própria e sub-divide em (sm1, sm2 e sm3), (d) Carcinoma avançado, quando havia invasão da muscular própria e/ou além dessa. (GUIDE LINES for the CLINICAL and PATHOLOGICAL STUDIES on CARCINOMA of the ESOPHAGUS by JAPANESE SOCIETY for ESOPHAGEAL DISEASES, 1976). Portanto o termo displasia não é usado para designar alterações de maturação do epitélio esofágico.

Objetivando estabelecer possíveis diferenciações histológicas entre displasias e carcinoma precoce do esôfago, OHKURA et al, em 1991, estudaram 205 biópsias obtidas de 40 esôfagos examinados por endoscopia. Foi estabelecido um critério de achados histológicos cujo o escore final permitia o diagnóstico de carcinoma baseado nas biópsias, a saber: (1) aumento do núcleo, (2) contorno e tamanho irregular do núcleo, (3) aumento da relação núcleo citoplasmática (4) arranjo irregular da camada basal, (5) crescimento papilar para baixo do epitélio escamoso atípico, esse sugestivo de carcinoma infiltrativo na mucosa.

Baseando nesses critérios histológicos, o autor concluiu que 70% dos diagnósticos de displasias obtidos pela biópsia ao exame microscópico do espécime cirúrgico ressecado passaram a ser diagnosticados como carcinomas.

Seguindo essa mesma linha de estudo, WATANABE et al, em 1991, compararam amostras cirúrgicas de esofagectomia com diagnóstico anátomo patológico de displasia com carcinoma precoce e avançado. Os critérios histológicos seguidos foram semelhantes ao de OHKURA et al (1991). Os achados histológicos das lesões consideradas neoplasias intra-epiteliais (carcinoma *In situ* e assim chamada displasia) e os carcinomas invasivos foram semelhantes. Portanto não existiu diferenciação histológica entre displasia e carcinoma *In situ*. Entretanto houve uma diferença marcante entre epitélio imaturo reativo (inflamatório) e lesões neoplásicas.

Considerando esses resultados histológicos associados ao índice de marcação por BrdU, o autor conclui que as alterações das células escamosas esofagianas devam ser classificadas em três tipos: (1) epitélio imaturo reativo, que correspondem as lesões benignas como esofagite, erosão, úlcera hiperplasia como o papiloma de células escamosas; (2) carcinoma como atipia de baixo grau; (3) carcinoma com atipia de alto grau, sendo que os itens (2) e (3) foram classificados de acordo com os índices de marcação por BrdU. A proposição final desse autor é que o termo “displasia de células escamosas” seja abandonado.

A principal dificuldade da terminologia consiste em usar duas expressões (displasia e carcinoma *In situ*), para designar o mesmo processo biológico. O problema mais significativo decorrente disso é que dependendo da terminologia usada, pode-se determinar condutas terapêuticas distintas para uma mesma doença, com prejuízos óbvios para o paciente.

Nesse estudo foram diagnosticados 183 carcinomas de esôfago; dos quais 119 carcinomas foram classificados como *In situ* (intra-epitelial), representando 65,02% do total. A análise histológica não mostrou nenhum caso de displasia, pois às alterações anátomo patológicas das lesões intra-epiteliais foram semelhantes descritas por OHKURA et al e WATANABE et al em 1991 e portanto classificadas como carcinomas *In situ*.

Nesse estudo foram evidenciados vários carcinomas em um mesmo esôfago examinado (média 6, 1 focos de carcinoma), os quais apresentavam níveis de invasão da parede esofágica distintos. Ocorreram 119 carcinomas *In situ* (65, 02%), 24 carcinomas micro-invasivos (13,11%), 25 carcinomas submucosos (13,66%) e 15 carcinomas invasivos. Contudo as alterações histológicas foram semelhantes independente do nível de invasão apresentada pela neoplasia. Portanto não parece adequado classificar uma lesão que tem alterações histológicas semelhantes ao carcinoma invasivo como displasia, tendo como único argumento o grau de acometimento epitelial. Esse argumento é corroborado pelo modelo de carcinogênese esofágica experimental usado nesse estudo, sabendo-se da efetividade da dietilnitrosamina em induzir carcinoma epidermóide do esôfago.

É importante considerar que possivelmente o que ocorra é a presença de um genótipo tumoral desde o início da multiplicação celular até atingir uma expressão fenotípica de carcinoma que pode, então, ser reconhecida diretamente.

#### **4.6. CÂNCER DO ESÔFAGO: CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA E CONDUTA TERAPÊUTICA**

Os critérios utilizados para classificar as neoplasias de estômago como câncer precoce, definidos em 1981, foram bem aceitos no contexto mundial (JAPANESE RESEARCH SOCIETY FOR GASTRIC CANCER, 1981). Existem algumas propostas para classificação do câncer do esôfago, porém estas ainda não foram bem aceitas internacionalmente. Isto ocorre, devido a alta incidência de recidivas nos pacientes operados de carcinoma esofágico, pretensamente classificados como precoce (SUGIMACHI, 1991).

Em 1990, KATO et al., estudaram, durante o período de 1968 a 1988, 1006 pacientes portadores de carcinoma “precoce”do esôfago com nível de invasão restritos a mucosa e submucosa. Esse estudo mostrou que os carcinomas restritos à mucosa encontrados em 92 pacientes, ocorreu comprometimento linfonodal em somente um caso (4,1%) e a sobrevida em cinco anos foi de 83,5%. Por outro lado os carcinomas que invadiam a submucosa, ocorreram em 68 pacientes, apresentando comprometimento linfonodal em 24 casos (35,3%), e a sobrevida em cinco anos foi de 54,9%. Esse estudo, deixou claro que câncer de esôfago restrito a mucosa e submucosa são estágios diferentes de uma mesma doença com prognósticos diferentes. Portanto o termo carcinoma “precoce”do esôfago usado para lesões que invadiam a submucosa precisava ser revisto.

Em 1991, SUGIMACHI, et al., estudaram 2130 pacientes, portadores de câncer esofágico durante o período de 1965 a 1989. Foram diagnosticados 243 casos, de carcinoma com níveis de invasão restritos a mucosa e submucosa. Desses 36 pacientes (14,8%), tinham invasão somente da mucosa, com quatro linfonodos comprometidos em três pacientes (1,23%), a sobrevida em cinco anos, desses pacientes foi de 88,4%.

Contudo os 197 pacientes portadores de carcinoma submucoso, apresentaram 118 linfonodos comprometidos em 64 pacientes (23,6%). A sobrevida em cinco anos, destes pacientes somada a dos pacientes portadores de carcinoma, restritos a mucosa foi de 54,5%. Esta queda na sobrevida foi muito significativa. Baseado nisso, os autores propuseram uma nova classificação para o câncer esofágico, considerando precoce somente as neoplasias restritas ao epitélio e a mucosa, sendo que os carcinomas submucosos continuaram a ser considerados superficiais mas não “precoces”.

Em 1993, KITAMURA et al., estudaram 75 pacientes com carcinoma superficial do esôfago submetidos a esofagectomia e desses, 16 casos eram restritos ao epitélio ou a mucosa e não apresentavam metástases linfonodal em nenhum caso. Os carcinomas superficiais submucosos foram diagnosticados em 59 pacientes e apresentavam comprometimento linfonodal, em 22% dos casos, com invasão vascular em 27%. Nos 46 pacientes portadores de carcinomas submucosos sem comprometimento linfonodal, 13 casos (22,1%) apresentaram invasão vascular. A sobrevida em cinco anos dos pacientes portadores de carcinoma submucoso com metástases linfonodal ou invasão vascular, foi de 37,6%, enquanto que os casos onde não havia comprometimento linfonodal ou invasão vascular tiveram 60% de sobrevida em cinco anos. Esse autor constatou em 74 pacientes com carcinomas que invadiam a muscular própria, 47,3%, desses não tinham metástases linfonodais e 36,5% não mostravam invasão vascular. A sobrevida dos pacientes portadores de carcinoma com invasão da muscular própria sem metástases linfonodais ou invasão vascular foi de 32,6%, portanto semelhante aos 37,6% de sobrevida em cinco anos, dos pacientes portadores de carcinoma submucoso com comprometimento linfonodal ou vascular. Baseado nesse estudo o autor concluiu que o carcinoma submucoso do esôfago deve ser classificado como carcinoma avançado.

O termo “precoce” tende a designar uma doença a qual uma vez diagnosticada e classificada como precoce, é passível de ser curada através de medidas terapêuticas adequadas. Portanto o uso desse termo para neoplasias restritas ao epitélio e a mucosa parece adequado, pois o potencial curativo decorrente do tratamento dessas lesões é próximo de 100% dos casos.

O diagnóstico do câncer precoce do esôfago é possível através do reconhecimento macroscópico das lesões superficiais auxiliada pela coloração com lugol (SHIMADA, et al., 1994; OHMORI, et al., 1994; NAGAWA, et al., 1994).

Em 1994, NAGAWA & WATANABE, estudaram 181 lesões superficiais de esôfagos operados, comparando os achados macroscópicos com a classificação histológica dessas lesões, admitindo que o carcinoma *In situ* (intra-epitelial) poderia ser classificado junto com o carcinoma microinvasivo mm1. Foi observado que as lesões elevadas tipo I atingiram a submucosa em 96% dos casos (28/29), e somente uma lesão (3,4%) estava restrita a mucosa. As lesões superficialmente elevadas tipo II a, encontravam-se restritas a mucosa em 73,2% dos casos (30/41) e invadiam a submucosa em 26,8% das vezes (11/41). As lesões deprimidas das tipo II c, atingiam somente a mucosa em 87% dos casos (36/41) e a submucosa em 12,2%.

Nas lesões deprimidas tipo III todas invadiam a submucosa (100%). As lesões planas tipo II b ou áreas de II b combinadas com outras lesões foram classificadas como carcinoma mucoso em 100% dos casos (66/66). Nos carcinomas mucosos mm1 e mm2, não foram encontrados nenhum comprometimento linfonodal ou vascular, e nos mm3 houve comprometimento vascular em um caso (1/13), porém sem metástases linfonodal.

Também em 1994, OHKURA, estudou 108 casos de câncer esofágico restritos a mucosa encontrando invasão linfonodal ou vascular em 3% dos carcinomas mm2, 27% nos carcinomas mm3 e nenhuma invasão linfonodal ou vascular foi diagnosticada nos carcinomas mm1.

Baseando-se no resultado desses estudos acima citados foi proposta a seguinte conduta terapêutica nos carcinomas superficiais do esôfago: todos os carcinomas superficiais do esôfago devem ser submetidos a mucosectomia endoscópica. Após o diagnóstico histológico, os carcinomas mm1 são considerados curados, os mm2 devem ser acompanhados clinicamente e os mm3 com possibilidade de invasão linfática ou vascular devem ser submetidos a resecção cirúrgica radical, ou seja esofagectomia.

Todos os carcinomas submucosos devem ser operados (NAGAWA & WATANABE, 1994). A técnica de mucosectomia deve permitir uma ressecção ampla e profunda da mucosa (MOREIRA, 1995).

Vários estudos demonstraram que as lesões superficiais elevadas tipo I apresentam níveis de invasão mais profundas no esôfago, isso também é válido para as lesões deprimidas tipo III. As lesões superficiais tipo II a e II c, invadem a submucosa com pouca frequência e as lesões superficiais planas tipo II b, de um modo geral, são restritas a mucosa ( NAGAWA & WATANABE, 1994; KATO, 1995; MOMMA, et al.1995; YAMADA, et al., 1995).

Os carcinomas esofágicos provavelmente iniciam-se como lesões planas pouco invasivas, porém quando essas lesões se elevam fazendo saliência na mucosa esofágica, o crescimento e o grau de invasão aumentam rapidamente (NAGAHAMA & NISHIZAWA, 1994; OHMORI, et al., 1995; HAYASHI, 1995; HOSOI, 1995).

No presente estudo pode-se observar que o rato submetido a ingestão de nitrosamina tende a fazer também lesões macroscopicamente elevadas como já foram observados por MANDARD, (1984). Porém, contrariamente a esse autor, podemos observar várias lesões superficiais tipo II a e II b. Dentre o total de 183 carcinomas diagnosticados, foram encontradas 135 lesões superficiais, destas 33 eram tipo II a e 102 tipo II b, representando juntas 73,7% das lesões superficiais .

Foram observados também que as lesões elevadas tipo Ip e Ipl, já apresentavam níveis de invasão além do epitélio e 61,11% delas atingiram a submucosa (11/18).

As lesões tipo II a apresentavam invasão predominantemente de mucosa sendo responsáveis por 70,8% das lesões microinvasivas (17/24). As lesões tipo II b foram todas restritas ao epitélio, representando 85,7% dos carcinomas *In situ* (102/119).

Os resultados desse estudo estão em conformidade com a literatura consultada no sentido de que as lesões elevadas tendem a serem mais invasivas, enquanto que as lesões planas tipo II b e II a são predominantemente restritas ao epitélio e a mucosa.

Portanto, o diagnóstico das lesões realmente precoces do esôfago necessita de um exame endoscópico adequado, no qual a coloração com lugol e um estudo histológico criterioso são indispensáveis. Essa metodização, aplicada principalmente em pacientes de alto risco, permite uma eficácia maior no diagnóstico do câncer epidermóide do esôfago. Tais procedimentos aumentam os índices de sobrevida dos pacientes e possibilitam um tratamento específico para cada caso.





## ***5. Conclusão***

A análise dos resultados do presente estudo permitiram as seguintes conclusões:

- 1) O modelo experimental de carcinogênese esofágica adotado foi efetivo, induzindo 183 carcinomas epidermóide de esôfago em trinta animais sobreviventes nos grupos T120, T150 e T200 com a média de 6.1 focos de carcinoma por animal examinado.
- 2) As alterações macroscópicas encontradas no carcinoma epidermóide precoce do esôfago nos animais, mostraram um predomínio das lesões superficiais, principalmente as lesões tipo II b, responsáveis por 85,7% dos carcinomas *In situ* (102/119) e as lesões tipo II a representando 70,8% dos carcinomas microinvasivos restritos à mucosa (17/24). As lesões elevadas tipo I e Ipl apresentaram predominantemente níveis de invasão submucosos e determinaram 61,11% dos carcinomas submucosos.
- 3) A maioria dos carcinomas precoces do esôfago foram encontrados em lesões superficiais tipo II a e II b, cuja o reconhecimento macroscópico é difícil, e portanto o exame cuidadoso da mucosa associado a coloração com lugol e um estudo histológico criterioso (principalmente nas lesões tipo II b) foram fundamentais para estabelecer esse diagnóstico. A coloração com lugol, nesta pesquisa foi negativa em todas as lesões neoplásicas diagnosticadas.
- 4) Esse modelo experimental permitiu reproduzir de maneira eficiente a classificação histológica, padronizada pela Escola Japonesa, classificando claramente os carcinomas *In situ*, (intraepitelial), microinvasivos (mm1, mm2 e mm3), submucosos (sm1, sm2 e sm3) e os invasivos, ocorrendo correlação significativa com as lesões macroscópicas encontradas. Nesse estudo não foi diagnosticado nenhum caso de displasia, uma vez que as alterações de maturação celular existentes no epitélio esofágico eram semelhantes aos carcinomas microinvasivos, submucosos e invasivos. Portanto todas as alterações de maturação celular intraepitelial, independente do grau de acometimento do epitélio foram classificada como carcinoma *In situ*. Essa pesquisa permitiu obter conhecimentos mais adequados da histologia dos carcinomas superficiais do esôfago.



## ***6. Summary***

## **THE EXPERIMENTAL ESOPHAGEAL CARCINOGENESIS. CONTRIBUTION TO THE STUDY OF THE HISTOGENESIS OF EPIDERMOID CARCINOMA OF THE ESOPHAGUS.**

This research was scheduled to study the histogenesis of the epidermoid carcinoma of the esophagus. For so, the Wistar rats and the diethylnitrosamine carcinogen (DEN), in the dosage of 10 mg/kg of weight, were used as an experimental model. The animals were kept in separated cages, holding 5 in each, according to their sex.

Aiming to recognise the distinct morfological alterations in the lesions, a chronogram of animal sacrificies was established as follows: T0 - control group (ten animals) ; T90 (ten animals) ; T120 (twenty animals) ; T150 (five animals) and T200 (twenty animals). The control group ingested only water during the experiment, while the others ingested DEN solution, and were sacrificed in those determined intervals.

The macroscopic study and the lugol staining for temporary observation were performed, and its classification obeyed the Japanese School. Among the animals that survived in groups T120, T150 and T200, 183 esophageal carcinomas were found, with an average of 6.1% focus of carcinomas per esophagus examined. The macroscopic lesions diagnosed were: type Ip - eleven carcinomas (6.01%) ; type Ipl - eight carcinomas (4.37%) ; type IIa - thirty three carcinomas (18.05%) ; type IIb - one hundred and two carcinomas (55.73%) ; type II - five carcinomas (2.73%) ; mixed type - nine carcinomas (4.92%) ; Borrmann I - three carcinomas (1.64%) ; Borrmann II - five carcinomas (2.73%) and Borrmann III - seven carcinomas (3.82%).

The microscopic classification of these 183 carcinomas also followed the Japanese School parameters. It was diagnosed 119 carcinomas *In situ*, limited to the mucosa (65.02%), and 24 microinvading carcinomas which did invade the muscularis mucosa (13.11%). Among the latest, seven were mm1 (3.82%), fifteen mm2 (8.19%), and two mm3 (1.09%). The submucous carcinomas presented different levels of submucosa invasion. Twenty five carcinomas were diagnosed (13.66%),

from which 12 were sm1 (16.55%), ten sm2 (5,46%), and three sm3 (1.63%). Fifteen (8.19%) invading carcinomas did occur.

The statistical  $X^2$  test showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the levels of carcinoma invasion of groups T120 and T150 *versus* T200, with the latest showing a greater number of invading lesions.

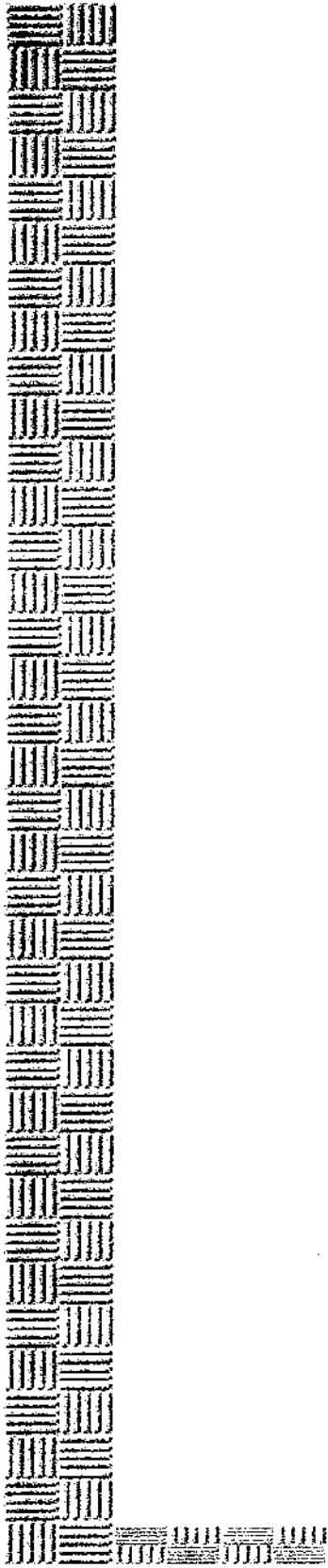
It was observed that the elevated lesions of type Ip and Ipl presented levels of invasion mainly of submucosa (11/18 = 61.11% of the cases). In contrast, the Ila superficial lesions presented levels of invasion limited mainly to the mucosa in 70.8% of the cases (17/24), while the type I Ib superficial lesions were all limited to the epithelium, representing 85.7% (119/162) of the *In situ* carcinomas.

The results of this study are in accordance with the consulted literature. While the elevated lesion tends to be more invasive, the type I Ib and I Ia flat lesions are limited mainly to the epithelium and the mucosa.

One of the objectives of this study was to obtain the possible histological differentiation between dysplasia and *In situ* carcinoma (intraepithelial). The histological analysis did not show any case of dysplasia, and the alterations of celular maturation in the epithelial lesion were similar to the microinvading carcinomas, submucous and invading, so they were classified as *In situ* carcinomas.

It is important to consider that, probably, at the very beginning of the celular multiplication there is already a tumoral genotype which reaches a phenotypical expression of carcinoma that can be recognised at once.

The main difficult in terminology consists in using two expressions (dysplasia and *In situ* carcinoma) to nominate the same biological process. The most significant problem that arises is that, depending on the terminology employed, distinct therapeutic conducts may be dictated to the same illness, with evident detriment to the patient.



## ***7. Referências bibliográficas***

AMERICAN SOCIETY OF CYTOLOGY - The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis. **The Cytotechnologist's Bulletin**, 26 (6), 1989.

ANDREOLLO, N.A. - *Contribuição à etiopatogenia do Câncer do coto gástrico. Estudo experimental*. Campinas, 1994. [Tese de Livre-Docência, UNICAMP].

ARCHER, M.C. - Reactive intermediates from nitrosamines. In "**Biological Reactive Intermediates - II - Chemical Mechanisms and Biological Effects**"(R. Snyder, D.V. Parck, J.J. Kocsis, D.J. Follow, C.Q. Gibson, and C.M. Winter, eds) p. 1027. Plenum, New York., 1982.

BAKER, J. - Induction of tumors of the stomach and esophagus in inbred chinese hamsters by anal diethylnitrosamine. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 146:291-298,1974.

BAKER, R. K. - The carcinogenic activity of dihydroxybenzidine. **Cancer Res.**, 13:137-140, 1953.

BARNES, J.M., & MAGEE, P.N. - Sane toxic propetics of dimethynitrosamine. **Br. J. Ind. Med.** 11: 167, 1954.

BARTSCH, H & MONTESANO, R - Relevance of nitrosamines to human. **Carcinogenesis**, 5:1381-93, 1984.

BENAMOZIG, R.; PIGOT,F.; AMIROGA, G.; NAHIDIRI, P.; CHAUSSADE, S.; CATALAN, F.; COUTURIER,D. - Human papillomavirus infection in esophageal squamous - cell carcinoma in Western Countries. **Int. J. Cancer**, 50:549-552, 1992.

BERENBLUM, I. & HARAN, N. - The influence of the croton oil and of polyethylen e glycol-400 on carcinogenesis in the forestomach on the mouse. **Cancer Res.**, 15:510-516, 1955.

- BLOT, W.J.; LI, J.Y.; TAYLOR, P.R. et al. - Nutrition intervention trials in Linxian, China: Supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. **J. Natl. Cancer Inst.** **85**:1483-1492, 1993.
- BLOT, W.J. - Esophageal cancer trends and risk factors. **Sem. Oncol**, **21**(4):403-410, 1994.
- BROOKES, P. & LAWLEY, P.D. - Alkylating agents. **Brit. Med. Bull** **20**:91-95, 1964.
- BROOKES, P. - Quantitative aspects of the reaction of some carcinogens with nucleic acids and the possible significance of such reactions in the process of carcinogenesis. **Cancer Res.** **26**:1994, 1966
- BULAY, O. & MIRVISH, S. S. - Carcinogenesis in rat esophagus by intraperitoneal injection of different doses of methyl-N-nitrosamine. **Cancer Res.**, **39**: 3644-3646, 1979.
- CHALLIS, B.C. & BUTLER, A.R. - Substitution at an amino nitrogen In “**The Chemistry of the Amino Group**”(S. Patai, et), p. 277 Wiley (Interscience). New York, 1968.
- CHALLIS, B.C. - The chemistry of formation of N-nitroso compounds. In “**Safety Evaluation of Nitrosatable Drugs and Chemicals**” (G.G. Gribsen, and C. Ioannides, eds) pp 16-55. Taylor & Francis - London, 1981.
- CHANG, F.; SYRJÄNEN, S.; SHEN, Q.; HANGXIU, SYRJÄNEN, K. - Human papillomavirus (HPV) DNA in esophageal precancer lesions and squamous cell carcinomas from China. **Int. J. Cancer**, **45**:21-25, 1990.



- CHANG, F.; SYRJÄNEN,S.; SHEN, Q.; WANG, L.; WANG, D.; SYRJÄNEN K. - Human papillomavirus involvement in esophageal precancerous lesions and squamous cell carcinomas as evidenced by microscopy and different DNA techniques **Scand J. Gastroenterol.**, 27:553-563, 1992.
- CHANG, F.; SYRJÄNEN,S.; SHEN, O.; WANG, L.; SYRJÄNEM, K. - Screening for human papillomavirus infections in esophageal squamous cell carcinomas by in situ hybridization. **Cancer**, 72:2525-2530, 1993.
- CHENG, K.K.; DAY, N.E.; DUFFY, S.W. - Pickled vegetables in the a etiology of oesophageal cancer in Hong Kong chinese. **Lancet**. 339:1314-1318, 1992
- CHENG, K.K. - The etiology of Esophageal cancer in chinese. **Seminars in Oncology**. 21 (4):411-415, 1994
- CLAPP, N.K. & CRAIG, A.W. - Carcinogenic effects of diethylnitrosamine in RF mice. **J. Natl. Cancer Inst.**, 39: 903-916, 1967.
- COORDINATING GROUP FOR THE RESEARCH OF ESOPHAGEAL CARCINOMA. - Chinese Academy of Medical Sciences and Henan Province. Studies on the relationship between epithelial dysplasiay and carcinoma of the esophagus. **Chinese Academy of Medical Sciences**, Beijing, 1974.
- CORREA, P. - Precursors of gastric and esophageal cancer. **Cancer**, 50: 2554-2565, 1982.
- CRAIN, R.C. - Spontaneous tumors in the Rochester strain of the Wistar rat. **Am. J. Pathol.**, 34: 311-335, 1958.

- CRESPI, M; MUNOZ, N.; GRASSI, A.; ARAMESH, B.; AMIRI, G.; MOTJABAI, A.; CASALE, V. - Oesophageal lesions in northern Iran: a premalignant condition? **Lancet**, **4**: 217-220, 1979.
- CRESPI, M.; MUNOZ, N.; GRASSI, A; QIONG, S.; JINGI, W.K.; L. J. - Precursor lesions of esophageal cancer in a low-risk population in China: comparison with high-risk populations. **Int. J. Cancer**, **34**:599-602, 1984.
- DE BORGES, R.J.; ACEVEDO, F.; MIRALLES, E.; MIJARES, P. - Squamous papilloma of the esophagus diagnosed by cytology: report of a case with concurrent occult epidermoid carcinoma. **Acta. Cytol.**, **30**,487-490.
- DE JONG, V.W.; BRESLOW, N; GOH, E.H. - A etiological factors in oesophageal cancer in Singapore chinese. **Int J. Cancer** **13**:291-303, 1974
- DRAKE, M. - Nomenclature of precancerous lesions of the uterine cervix. **Acta Cytol.**, **28** (5):527-534,1984.
- DRAKE, M. - **Gastro-Esophageal Cytology**. Basel, Karger, 1985. **268 p.**
- DRUCKREY, H. - Carcinogenese Wirkung von N-Methyl- N-Nitroso-Anilin. **Naturwissenschaften**, **48**:722-723, 1961.
- DUCKREY, H.; PREUSSMAN, R.; BLUM, G.; IVANKOVIC, S.; AFKHAM, J. - Erzeugung van Karzinamen der Speiserohre demch unsummetrische Nitrosamine. **Naturwissenschaften** **50**:100, 1963.
- DUCKREY, H.; PREUSSMANN, R.; SCHMAHL, D.; IVANKOVIC, S. - Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 keischiedenen N-nitroso Verbiadungen an BD-Ratter. **Z. Krebsfarsch** **69**:103-201, 1967.

- DRUCKREY, H. - Organospecific carcinogenesis in the digestive tract. In : NAKAHARA; TAKAYAMA; SUGIMURA (eds.). **Topics in chemical carcinogenesis**. Tokyo, University Park Press, 1972. p.73-103.
- ENDER, F.; HARVE, G.; HELGEBOSTAD, A.; KOPPANG, N.; MADSEN, R.; CHEH, L. - Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herringneal produced from sodium nitrite-preserved herring. **Naturwissenschaften** **51**,637., 1964.
- ENDER, F.; HARVE, G.N.; MADSEN, R.; CHEH, L.; HELGEBOSTAD, A. - Studies an conditions under which N-nitrosodimethylamine is formed in herring meal produced from nitrite-preserved herring. *Z. Tierphysical Tiernaehv. Futtermittelkd* **22**: 181, 1967.
- ENDER, F.; & CEH, L. - Occurrence of nitrosamines in foodstuffs for human and animal consupcion. **Food Cosmet. Toxicol.** **6**: 569, 1968.
- FAN, T.Y. & TANNENBAUM, S.R. - Stability of N-nitrose compounds. **J. Food. Sci.** **37**: 274, 1972.
- FARBER, E. - Cancer development and its natural history - A cancer prevention perspective. **Cancer**, **62**:1676-9,1988.
- FIDALGO, P.; CRAVO, M.; CHAVES, P.; LEITÃO, C.; MIRA, F. - High prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma and matched normal esophageal mucosa. **Cancer**, **76**:1522-1528, 1995.
- FREIMUTH, U., & GLASER, E. - Zum Auftreten van nitrosamine in Lebensmihelr. **Nahrung.** **14**: 357, 1970.

- FREUND, H.A. - Clinical manifestations and studies in parenchymatous hepatitis. **Ann. Intern. Med.** **10**: 1144, 1937.
- FRIDMAN, A.L.; MUKAHAMETSHIN, F.M.; NOVIKOU, S.S. - Advances in the chemistry of aliphatic N-nitrosamines. **Russ. Chem. Rev.** **40**: 34, 1971.
- FUSSAENGER, R.D. & DITSCHUNEIT, H. - Lethal exitus of a patient with N-nitrosodimethylamine poisoning 2.5 years following the first ingestion and signs of intoxication. **Oncology** **37**: 273, 1980.
- GHADIRIAN, P.; THOUÉZ, J.P.; SINARD, A. - La géographie du cancer de l'oesophage. **Soc. Sci. Med.** **27**(9): 971-985, 1988.
- GOLDSMITH, M.F. - Papillomavirus invades esophagus, incidence seems to be increasing. **J. Amer. Med.**, **251**: 2185-2187, 1984.
- GOLDSTEIN, A.; ARONOW, L., KALMAN, S.M. - Chemical Carcinogenesis. In "Principles of Diagnosis Action: **The Basis of Pharmacology**. p. 686. John Wiley & Sons, New York, 1974.
- GUIDE LINES FOR THE CLINICAL AND PATHOLOGIC STUDIES ON CARCINOMA OF THE ESOPHAGUS (BY JAPANESE SOCIETY FOR ESOPHAGEAL DISEASES) - **Jpn. J. Surg.** **6**(2):69-78, 1976.
- HARRIS, C.C.; AUTRUP, H.; STONER, G.D.; TRUMP, B.F.; HILLMAN, E.; SCHAFER, P.W.; JEFFREY, A.M. - Metabolism of benzo [a] pyrene, N-nitrosodimethylamine and N-nitrosopyrrolidine and identification of the major carcinogen - DNA adducts formed in cultured human esophagus. **Cancer Res.**, **39**: 4401, 1979.

- HAYASHI, T. - Superficial esophageal carcinoma (type 0-II c) followed-up endoscopically for eight years and four months, report of a case. **Stomach and Intestine** (Tokyo) **30**(11):1357-1364, 1995.
- HEDLER, L, & MARQUARDT, P. - Occurrence of diethylnitrosamine in same samples of food (Review). **Food Cosmet. Toxicol.** **6**: 341, 1968.
- HERANI, M.L.G. - Normas para a apresentação de dissertações e teses. **Ed. Bireme - Centro Latino-Americano e do Caribe de Informações em Ciências de Saúde.** São Paulo - 1990, pp. 1-32.
- HILLE, J.J.; MARGOLIUS, K.A.; MARKOWITZ, S.; ISAACSON, C. - Human papillomavirus infection related to oesophageal carcinoma in black South Africans. **S. Afr. Med. J.**, **69**:441-445, 1986.
- HOSOI, T. - Retrospective study of superficial esophageal carcinoma, report of two case. **Stomach and Intestine** (Tokyo) **30**(11): 1372-1378, 1995.
- HOTCHKISS, Joseph H. - A review of current literature an N-nitroso compounds in foods. **Adv. Food Res.**, **31**:53-115, 1987.
- IARC - Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some N-nitroso compounds. **Iarc monogr.**, **17**:1-365, 1978.
- INGOLD, C.K. - Substitution at hetero-elements. In “**Structure and Mechanism in Organic Chemistry**” 2nd ed, p. 611. Cornell Univ. Press, Ithaca, New York, 1969.
- ITO, M.; OTA, M.; SAITO, M.; BABA, T.; MATSUBARA, Y. - Minute Esophageal Cancer which disappeared after biopsy, reappeared to be and resected, report of a case. **Stomach and Intestine** (Tokyo) **29** (9):943-946, 1994.

- JAPANESE RESEARCH SOCIETY FOR GASTRIC CANCER. - The general rules for the gastric cancer study in surgery and pathology. **Jpn. J. Surg.**, **11**:127-139, 1981.
- KAKUDA, Y.; GRAY, J.I.; MAN, L.L. - N-nitrosamines and their precursors in food systems - 3. Influence of pH and temperature on stability of N-nitrosamides - **J. Agric. Food Chem.** **28**: 588, 1980.
- KATO, H.; TACHIMORI, Y.; WATANABE, H.; YAMAGUCHI, H.; ISHIKAWA, T.; ITABASTI, M. - Superficial Esophageal Carcinoma surgical treatment and results. **Cancer**, **66**:2319-2323, 1990.
- KATO, H. - Esophageal Cancer of superficial and slightly depressed type rapidly developing into superficial and protruding type, report of a case. **Stomach and Intestine (Tokyo)** **30**(11):1403-1408, 1995.
- KAWAMURA, T.; KOIKE, M. - Histopathological meaning and lugol unstained area of esophageal lesion. **Stomach and Intestine (Tokyo)** **29**(9):875-882, 1994.
- KITAMURA, K.; IKEBE, M.; MORITA, M.; MATSUDA, H.; KUWANO, H.; SUGIMACHI, R. - The evaluation of submucosal carcinoma of the esophagus as more advanced carcinoma. **Hepatol. Gastroenterol.** **40**:236-239, 1993.
- KOUZU, T.; MURAOKA, M.; YAMADA, Y.; AKIMA, M.; HISHIKAWA, E. - Clinical meaning of lugol non-staining lesion from the endoscopic point of view. **Stomach and Intestine (Tokyo)** **29** (9):883-890, 1994.
- KRUEL, C.D.P. - *Classificação citopatológica das lesões precursoras do carcinoma escamoso do esôfago: Modelo experimental em roedores* - São Paulo, 1992 - [Tese de doutorado Escola Paulista de Medicina].

- KULSKI, J.; DEMETER, T.; STERRETT, G.F.; SHILKIN, K.B. - Human papillomavirus DNA in oesophageal carcinoma. **Lancet** **20**:683-684, 1986.
- LESEC, G.; GOGUSEU, FERMANO, H.; GORCE, D.; LEMAITRE, J.P.; VERDIER, A. Présence d'un antigène viral du groupe "Papilloma" dans un condylome oesophagien chez l'homme. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, **9**:166-168, 1985.
- LI, J.Y.; ERSHOW, A.G.; CHEN, Z.J.- A case control study of cancer of the esophagus and gastric cardia in Lixian. **Int. J. Cancer**. **43**:755-761, 1989.
- LIJINSKY, W.; LOO, J.; ROSS, A. - Mechanisms of alkylation of nucleic acids by nitrose dimethylamine. **Nature** (London) **218**: 1174, 1968.
- LIJINSKY, W. - Structure activity relations in carcinogenesis by N-nitroso compounds. **Cancer Met. Rev.** , **6**:301-56, 1987.
- LONG, E.L. & JENNER, P.M.- Esophageal tumors produced in rats by feeding of dihydrosafrole. **Fed. Proc.**, **22**:275, 1963.
- MAGGEE, P.N. & BARNES, J.M. - The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine. **Brit. J. Cancer** **10**:114-122, 1956.
- MAGEE, P.N. & BARNES, J.M. - Carcinogenic nitroso compounds. **Adv. Cancer Res.**, **10**:163-246, 1967.
- MAHBOUBI, E.O. & ARANESH, B. - Epidemiology of esophageal cancer in Iran, with special reference to nutritional and cultural aspects. **Prev. Med.**, **9**:613-621, 1980.

- MACHIMURA, T.; MAKUUCHI, H.; SHIMADA, H.; MIZUTANO, R.; MITOMI, T. - 0-Iib Type Superficial Esophageal carcinoma for the first time reorgnized by chanoendoscopy using iodine staining, report of a case. **Stomach and Intestine (Tokyo)** 29 (9):935-939, 1994.
- MANDARD, A.M. - Cancer of the esophagus and dysplasia. **Eur. J. Cancer**, 1:15-26, 1978.
- MANDARD, A. M.; MARNAY, J.; VILLEDIEU, B.; BIANCO, C.; ROUSSEL, A.; ELIE, H.; VERNHES, J.C. - Autopsy findings in 111 cases of esophageal cancer. **Cancer**, 48: 329-335, 1981.
- MANDARD, A.M.; MARNAY, J.; HERLIN, P.; ELIE, H.; TUYNS, A.J.; LE TALAER, J.Y. - Cancer de l oesophage induit chez le rat Wistar par l éthyl-N-Butyl-Nitrosamine. **Bull. Cancer (Paris)** 71 (5):419-424, 1984.
- MILLER, E.C. & MILLER, J.A. - Mechanisms of chemical carcinogenesis. **Cancer**, 47:1055,64, 1981.
- MIRVISH, S.S. - Formation of N-nitroso compounds: Chemistry, Kinetics and in vivo occurence. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 31: 325-1975.
- MIRVISH, S.S. - The etiology of gastric cancer: intragastric nitrosamine formation and other theories. **J. Nat Cancer Inst.**, 66:1037-52, 1983.
- MOHLER, K., & MAYROHFER, U.L. - Detection and determination of nitrosamines in food. **A. Lebensm. Unters. Farsch.**, 135: 313, 1968.



- MOMMA, K.; YOSHIDA, M.; YAMADA, Y.; HAYSACHI, T.; ARAKAWA, T. - Type 0 - II c Superficial Esophageal Cancer lesions developing into. Type 0 - III, report of two cases. **Stomach and Intestine (Tokyo)** **30**(11): 1397-1402, 1995.
- MOOLGAVKAR, S.H. & KNUNSON Jr., A.G. - Mutation and cancer: animal model for human carcinogenesis. **J. Nat. Cancer Inst.**, **66**:1037-52, 1981.
- MOREIRA, L.F.; KAMIKAWA, Y.; NAOMOTO, Y.; HAISA, M.; ORITA, K. - Endoscopic mucosal resection for superficial carcinoma and high-dysplasia of the esophagus. **Surg. Laparosc. & Endosc.**, **5**:171-175, 1995
- MORIKAWA, H.; TANAKA, M.; UMEGAKI, E.; ETOH, Y.; MIYOSHI, H. - Intrapithelial Carcinoma able to be found only by endoscopic iodine staining method, report of a case. **Stomach and Intestine (Tokyo)**, **21**(9):940-942, 1994.
- MOURA, E.G.H. - *Esofagite por ingestão de hidróxido de sódio e câncer esofágico. Avaliação endoscópica e anatomopatológica para determinação de fatores preditivos*. São Paulo, 1996. [Dissertação de Mestrado apresentada ao IBEPEGE].
- MUNCK-WILKLAND, E.; KUYLESTIERNA, R.; LINDHAOLM, J.; RUBIO, C. - Image cytometric DNA analysis of diethylnitrosamine - induced dysplasias and invasive squamous cell carcinoma of the esophagus in mice. **Act. Otol.** **109**:155-60, 1990.
- NAGAHAMA, R. & NISHIZAWA, M. - Esophageal mucosal cancer followed-up endoscopically for four years and ten months, report of a case. **Stomach and Intestine (Tokyo)**, **29**(9):951-955, 1994.

- NAGAWA, H.; SETO, Y.; MUTO, Y.; KAISAKI, S.; NOMURA, K. - A follow-up case with esophageal area unstained by iodine, report of a case. **Stomach and Intestine (Tokyo)** **29(9)**:947-950, 1994.
- NAKAGAWA, S. & WATANABE, H. - Mucosal carcinomas of the esophagus - Their sub classification and macroscopic features. **Stomach and Intestine (Tokyo)** **29**:273-288, 1994.
- NAKANO, H.; UNO, H.; NAKAMURA, Y.; YAGI, N.; NOMURA, C. - Superficial flat type (0-IIb) Esophageal Carcinoma, report of a case. **Stomach and Intestine (Tokyo)** **29 (9)**: 931-934, 1994.
- NAPALKOV, N.P. & POZHARISSKI, K. M. - Morphogenesis of experimental tumors of the esophagus. **J. Natl. Cancer Inst.**, **42**: 922-940, 1969.
- NISHIZAWA, M.; OHKURA, Y.; YAMAKI, G.; SHIGA, T.; NOMOTO, K.- Lugol staining for detection of early esophageal cancer: Clinical effectiveness of the lugol staining method in Mass-screening examination, especially for detection of mucosal cancer of the esophagus. **Stomach and Intestine (Tokyo)** **29(9)**:891-904, 1994.
- OHKURA, Y.; NAKAMURA, R.; HOSOI, T.; NISHIZAWA, M. - Early Carcinoma and Displasia at the Esophagus: Histogenesis and Histological Diagnostic Criteria Based on Follow-up Biopsy Specimens. **Stomach and Intestine** **26(2)**:141-152, 1991.
- OHKURA, Y. - Esophageal mucosal cancer: classification and the depth of invasion from the pathological point of view. **Stomach and Intestine (Tokyo)** **29**:263-271, 1994.
- OHMORI, T.; MAKUUCHI, H.; KAMAGAI, Y. - Natural course iodine unstained area in the esophagus in mass-screening programs. **Stomach and Intestine (Tokyo)** **29(9)**: 911-920, 1994.

OHMORI, T.; MAKUUCHI, H.; KUMAGAI, Y. - Type 0 - II c Superficial esophageal carcinoma followed-up endoscopically for 26 months, report of a case. **Stomach and Intestine** (Tokyo) **30**(11): 1386-1390, 1995.

PAPANICOLAOU, G.N. - Survey of the actualities and potentialities of exfoliative cytology in cancer diagnosis. **Ann. Intern. Med.**, **31**:661-674,1949.

PETO, R.; GRAY, R.; BRANTOM, P.; GRASSO, P. - Dose and time relationships for tumor induction in the liver and esophagus of 4080 inbred rats by chronic ingestion of N-nitrosodiethylamine on N-nitrosedimethylamine. **Cancer Research** **51**:6452-6469, 1991.

PITOT, H.C & SIRICA, - A.E. The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. **Biochem. Biophys. Acta (Amst.)**, **605**:191-215,1980.

POSTLETHWAIT, R.W. & MUSSER, A. W. - Changes in the esophagus in 1000 autopsy specimens. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, **68** (6): 953-956, 1974.

PROLLA, J.C.; REILLY, R.; KIRSNER, J.; COCKERHAM, L. - Direct-Vision endoscopic cytology and biopsy in the diagnosis of esophageal and gastric tumors: current experience. **Acta Cytol.**, **21** (3): 399-402, 1977.

PROLLA, J.C. - *Mortalidade por neoplasias associadas ao tabagismo no Rio Grande do Sul, 1970-1989*. Porto Alegre, 1992. [Tese Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul]

REFERENCES ON NATURALLY OCURRING NEOPLASMAS IN ANIMALS, Rozof (ed.) Registry of Veterinary Pathology, **American Registry of Pathology**. Washington, Armed Forces Institute of Pathology, 1974.

- REUBER, M.D. - Carcinomas of the esophagus in rats by diethylnitrosamine. **Eur.J. Cancer**, **11**:97-99, 1975.
- REUBER, M.D. - Effect of Age and Sex on lesions of the esophagus in Buffalo Strain Rats ingesting diethylnitrosamine. **Expl. Cell. Biol.**, **44**:65-72, 1976.
- REUBER, M.D. - Histopathology of preneoplastic lesions of the esophagus in BUF rats ingesting diethylnitrosamine. **J. Natl. Cancer Inst.**, **58**: 313-321, 1977.
- RIDD, H.H. - Nitrosation, diazatisation and deamination. **Rev. Chem. Soc. London** **15**: 418, 1961.
- ROSE, E.F. & FELLINGHAM, S.A. - Cancer patterns in Transkei. **S. Afr.J.Sci.**, **72**:555-561, 1981.
- RUBIO, C.A. - Experimental models. In: Pfeiffer, C.J., **Cancer of the esophagus. U.S.A.**, **CRC Press**, 1982. v.III, p.139-168.
- RUBIO, C.A. - Epitelial lesions antedating oesophageal carcinoma. Histologic study in mice. **Pathol.Res.Pract.**, **176**: 269-275, 1983.
- RUBIO, C.A.; LIU, F., CHEJFEC, G; SVEANDER, M. - The induction of esophageal tumors in mice: dose and time dependency. **In Vivo**, **1**:35-38, 1987.
- RUBIO, C. A. - Post-carcinogen interval in carcinogenesis. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.** **24** (3): 499-500, 1988.
- RUBIO, C.A.; LIU, F.S.; ZHAO, H.Z. - Histological clasification of intraepitelial neoplasias and microinvasive squamous carcinoma of the esophagus. **Am.J.Surg.Pathol.**, **13**(8):685-690,1989.

- SHILLER, W. - Early diagnosis of carcinoma of the cervix. **Surg. Gynecol. Obst.**, **56**:210-222, 1993.
- SHIMADA, H.; MAKUUCHI, H.; MACHIMURA, T.; MIZUTANI, K.; KAN-NO, K. - Histopathological study an tiry iodire unstained lesions smalles than 5mm in lenght. **Stomach and Intestine (Tokyo)** **29**(9):921-930, 1994.
- STEMMERMANN, G.; HEFFELFINGER, S.C.; NO FFSINGER, A.; HUI, Y.Z.; MILLER, M.A.; FENOGLIO-PREISER, M., - The molecular biology of esophageal and gastric cancer and their precursors: Oncogenes, tumor suppressor genes, and growth factors. **Hum. Patol.**, **25**(10): 968-981, 1994.
- STINSON, S. F. - Esophageal carcinoma. Animal model: esophageal in the rat induced with methylalkyl-nitrosamines. **Amer. J. Pathol.**, **96**: 871-874, 1979.
- SUGIMACHI, K.; KITAMURA, K.; MATSUDA, H.; MORI, M.; KUWANO, H.; HIROKO, I. - Proposed new criteria for early carcinoma of the esophagus. **Surg. Gyn Obst.**, **173**:303-308, 1991.
- SYRJÄNEN, K.J. - Histological changes identical of condylomations lesions found in esophageal squamous cell carcinomas. **Arch. Geschwulskjorasch**, **52**:283-292, 1982.
- TOH, Y.; KUWANO, H.; TANAKA, S.; BABA, K.; MATSUDA, H.; SUGIMACHI, K.; MORI, R. - Detection of Human papillomavirus DNA in esophageal carcinoma in Japan by polymerase Chain Reachan. **Cancer**, **70**:2234-2238, 1992.
- THURNHAM, D.I.; MUNÓZ, N.; LU, J.B. - Nutritional and hematological status of chinese farmers: The influence at 13.5 months treatment with riboflavin, retinol and zinc. **Eur. J. Clin. Nutrition**, **42**:647-660, 1988

- WANG, Y.P.; HAN, X.Y.; SU, W. - Esophageal cancer in Shanxi province, people's Republic of China: A case - control study in high and moderate risk areas. **Cancer Causes Control**. **3**:107-113, 1992
- WATANABE, H. - Does Esophageal dysplasia really exist? **Stomach and Intestine (Tokyo)** **26**(2):133-140, 1991.
- WIED, G.L. - Editorial: An international agreement on histo-tological terminology for lesions of the uterine cervix. **Acta Cytol.**, **6**:235-236, 1962.
- WINKLER, B.; CAPO, V.; REUMANN, W.; AVERILL, M.A.; LA PORTA, R.; REILLY, S.; GREEN, P.M.R.; RICHART, R.M.; CRUM, C.P. - Human papillomavirus infection of the esophagus: A clinicopathologic study with demonstrations of papillomavirus antigen by the immuno peroxidase technique. **Cancer**, **55**:149-155, 1985.
- YAMADA, Y.; YOSHIDA, M.; MOMMA, K.; HAYSACHI, T.; SAKAKI, N. - Type 0-I Superficial esophageal cancer in which the course of development was observed, report of two cases. **Stomach and Intestine (Tokyo)** **30**(11):1391-1396, 1995.
- ZAR, J. L. - Bioestatistical analysis. **Prentice-Hall International**, 2<sup>o</sup> ed., London, p.1-718, 1984.



## *8. Apêndice*

## Apêndice 1:

40	17	54	119
2	3	19	24
2	1	22	25
5	0	10	15
<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
57	21	105	183

O cálculo do Qui-Quadrado mostra que 33.3% dos valores esperados são menores que 5 e que para o valor de 24,02 e 8 graus de liberdade, encontramos  $p = 0,000401$ . Portanto :  $p < 0,05$ .

Conclusão : existe diferença significativa entre os grupos ao nível de 5%, embora 33,3% dos valores esperados sejam menor que 5.



## Apêndice 2 :

48	17	65
2	3	5
2	1	3
5	0	5
<hr/>	<hr/>	<hr/>
57	21	78

O cálculo do Qui-Quadrado mostra que o resultado foi de 4.70 e que para 3 graus de liberdade o valor de  $p = 0,13473713$ , e que  $p > 0,05$ .

Conclusão : estes resultados mostram que é possível comparar os valores das somas de T120 + T150, com os valores de T200, agrupando os valores de carcinoma *In situ* + microinvasivo *versus* carcinoma submucoso + invasivo.

Apêndice 3 :

50	20	70
7	1	8
<hr/>	<hr/>	<hr/>
57	21	78

Aplicando-se o Teste Exato de Fischer, o valor de  $p = 0,4374781$ , e  $p > 0,05$ .

Conclusão : este resultado mostra que não existe diferença significativa entre os valores de T120 e T150.

#### Apêndice 4 :

65	54	119
5	19	24
3	22	25
5	10	15
<hr/>	<hr/>	<hr/>
78	105	183

O cálculo do Qui-Quadrado mostra que o resultado foi de 21.78 e que para 3 graus de liberdade o valor de  $p = 0,00007248$ , e que  $p < 0,05$ .

Conclusão : estes resultados mostram que existe diferença estatística significativa entre os grupos T120 + T150 *versus* T200.

Portanto, existe associação significativa entre o tempo de administração da DEN e a gravidade da evolução do carcinoma encontrado.

## Apêndice 5:

### COMPOSIÇÃO BÁSICA DA RAÇÃO\*

---

Milho	Farelo de Arroz Cru
Farelo de Trigo	Carbonato de Cálcio
Farelo de Soja	Fosfato Bicálcico
Farinha de Carne	Sal

---

### ENRIQUECIMENTO POR QUILOGRAMA DE PRODUTO

---

Vitamina A - 20.000 UI	Piridoxina - 6 mg
Vitamina D3 - 6.600 UI	Biotina - 0,1 mg
Vitamina E - 30 UI	Ácido Fólico - 0,5 mg
Vitamina K - 6 mg	Manganês - 50 mg
Vitamina B12 - 10 mcg	Iodo - 2 mg
Vitamina b2 - 8mg	Ferro - 65 mg
Pantotenato de Cálcio - 24 mg	Zinco - 35 mg
Niacina - 95 mg	Cobre - 26 mg
Tiamina - 4 mg	Antioxidante - 100 mg
Colina - 2.000 mg	

---

### NÍVEIS DE GARANTIA

---

Umidade - 13% (máximo)
Proteínas - 23% (máximo)
Extrato Etéreo - 2,5% (máximo)
Matéria Fibrosa - 8,0% (máximo)
Matéria Mineral - 8,0% (máximo)
Cálcio - 1,8% (máximo)
Fósforo - 0,8% (mínimo)

---

\* NUTRIMENTOS PURINA LTDA

---