

ALMINO CARDOSO RAMOS

***AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBIDOR DA VITAMINA C NA
CARCINOGENESE ESOFÁGICA EXPERIMENTAL
INDUZIDA PELA DIETILNITROSAMINA***

Campinas

1998

ALMINO CARDOSO RAMOS

***AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBIDOR DA VITAMINA C NA
CARCINOGÊNESE ESOFÁGICA EXPERIMENTAL
INDUZIDA PELA DIETILNITROSAMINA***

*Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em
Cirurgia.*

ORIENTADOR: *Prof. Dr. Nelson Adami Andreollo*

CO-ORIENTADORA: *Profa. Dra. Rachel Lewinsohn*

Campinas

1998

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

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMAS	BC/37737
PROC.	229/99
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	02/06/99
N.º CPD	

CM-00123737-1

R 147a

Ramos, Almino Cardoso

Avaliação do efeito inibidor da vitamina C na carcinogênese esofágica experimental induzida pela dietilnitrosamina / Almino Cardoso Ramos. Campinas, SP : [s.n], 1998.

Orientadores: Nelson Adami Andreollo, Rachel Lewinsohn
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Vitamina C. 2. Esôfago - doenças. 3. Antioxidantes. 4. Compostos nitrosos. I. Nelson Adami Andreollo. II. Rachel Lewinsohn. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADOR: PROF. DR. NELSON ADAMI ANDREOLLO

Nelson Adami Andreolli

MEMBROS:

1. PROF. DR. NELSON ARY BRANDALISE

2. PROF. DR. BRUNO ZILBERSTEIN

3. PROF. DR. OSVALDO MALAFAIA

4. PROF. DR. LUIZ SERGIO LEONARDI

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

DATA: 16.12.98

Dedicatória

*Para minha família,
Erom (in memoriam) e Maria Eda, exemplos de
vida, dedicação e bondade, que só me orientaram
para o caminho do bem,
Marlôva e Max, hoje muito mais do que irmãos,
grandes amigos, parceiros de jornada, e
Gabriel, filho querido, refúgio de paz e
serenidade,
com todo amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nelson Adami Andreollo, pela orientação, amizade, dedicação e apoio irrestritos durante a realização deste estudo;

À Profa. Dra. Rachel Lewinsohn, co-orientadora desta pesquisa, pela acolhida em seu laboratório, pela meticulosidade da revisão e objetividade das sugestões;

Ao Prof. Dr. Bruno Zilberstein, exemplo de cirurgião, mestre e amigo de sempre, pela orientação, incentivo e ajuda constantes, não só na realização deste trabalho, mas no dia-a-dia, em nosso convívio profissional e pessoal;

Ao Prof. Dr. Luiz Sérgio Leonardi, pela consideração, respeito e amizade com que fui recebido no Departamento de Cirurgia da UNICAMP;

Ao Prof. Dr. Nelson Ary Brandalise, pela amizade, apoio e sugestões;

Ao Dr. José Afonso Sallet, grande amigo e companheiro, por ter aberto as portas e apoiado irrestritamente a realização destes trabalho;

À Dra. Cristina Helena Toledo Pelizon, pela realização dos exames histológicos;

Aos Acadêmicos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo:

Fabio Pereira Paganini da Costa, pela colaboração na confecção e montagem das tabelas, figuras e gráficos; e

Daniela Yukie Sakai Tanikawa, pela amizade, colaboração e dedicação na confecção dos desenhos e realização da revisão bibliográfica;

À Marina Rachel Araujo, bióloga do NMCE da UNICAMP, pela ajuda e efetiva colaboração na fase experimental desta pesquisa;

À Maria Madalena de Abreu Rodrigues, técnica de laboratório do NMCE da UNICAMP, pela dedicação no cuidado com os animais;

À Gisele C. F. Turini e Luzia Aparecida M. R. Reis, técnicas do Laboratório de Anatomia Patológica Experimental do NMCE da UNICAMP, que sob orientação do Prof. Dr. Konradin Metze, primorosamente prepararam o material para estudo histológico;

À Profa. Marlôva Ramos de Andrade, pelo auxílio na revisão ortográfica e correção gramatical;

Ao Prof. José Zunno Filho, pelo auxílio na elaboração dos textos em língua inglesa;

À bibliotecária Catarina Rodrigues de Oliveira, pela correção da bibliografia;

À Vera Lúcia Bazzana, pelo apoio e valiosa colaboração no trabalho de digitação e formatação;

À Comissão de Pós-Graduação em Cirurgia da FCM/UNICAMP, coordenada pelo Prof. Dr. Juvenal Ricardo N. Góes e secretariada pela Sra. Marisa Mantovani, pela oportunidade de trabalho e confiança em mim depositada;

Ao Departamento de Estatística da FCM/UNICAMP, em especial as Sras. Cleide Aparecida M. Silva e Eliani Guelli, pela realização da análise estatística;

À Diretoria de Apoio Didático, Científico e Computacional da FCM/UNICAMP, especialmente a Profa. Marília Marcello Braidá, Sr. Emilton Barbosa de Oliveira e Srta. Sílvia Auxiliadora de Lúcio, que com competência, amizade e abnegação colaboraram na revisão, correção e editoração final deste estudo.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro que foi de fundamental importância para a realização deste experimento.

A concretização de um grande sonho pode ser alcançada de forma mais rápida e fácil, quando se consegue associar as vantagens de um trabalho em equipe, resultante da união de todos em torno de um objetivo comum, com a determinação, o talento, a coragem e o valor individual de cada um.

	PÁG.
RESUMO	<i>i</i>
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Conceitos iniciais.....	2
1.2. Carcinogênese.....	4
1.3. Câncer do esôfago, epidemiologia e carcinogênese.....	7
1.4. Compostos N-nitrosos.....	9
1.5. Vitamina C.....	15
1.6. Efeito inibidor da vitamina C na carcinogênese.....	20
1.7. Objetivo.....	24
2. MATERIAL	26
2.1. Animais.....	27
2.2. Acondicionamento.....	27
2.3. Manipulação.....	27
2.4. Drogas utilizadas.....	28
2.5. Materiais utilizados no transcorrer do experimento.....	28
2.6. Materiais utilizados para o sacrifício.....	29
2.7. Materiais utilizados na análise macroscópica.....	30
2.8. Materiais utilizados na análise microscópica.....	30
3. METODOLOGIA	31
3.1. Grupos de animais.....	32

3.2. Preparo da solução.....	33
3.3. Administração das drogas.....	33
3.4. Alimentação.....	33
3.5. Observação dos animais.....	34
3.6. Sacrifício dos animais e necropsia.....	34
3.7. Análise na macroscópica.....	35
3.8. Análise microscópica.....	38
3.9. Análise estatística.....	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1. Evolução do peso dos animais.....	43
4.2. Avaliação da quantidade de água e soluções ingeridas.....	45
4.3. Análise macroscópica.....	48
4.4. Análise microscópica.....	52
4.5. Análise estatística.....	67
4.5.1. Avaliação do ganho de peso.....	67
4.5.2. Avaliação do número de tumores.....	68
4.5.3. Avaliação da ocorrência de acantólise e papiloma.....	70
5. DISCUSSÃO.....	71
5.1. Generalidades.....	72
5.2. Carcinogênese pelas nitrosaminas.....	73
5.3. Carcinogênese e histogênese.....	79
5.4. Vitamina C e carcinogênese.....	82
5.4.1. Inibição da reação de nitrosação.....	83
5.4.2. Atuação no P450 e p53.....	86

5.4.3. Atuação da vitamina C como antioxidante.....	89
5.4.4. Vitamina C e como bloqueadora de carcinógenos.....	90
5.4.5. Vitamina C, colágeno e matriz intercelular.....	91
5.4.6. Imunidade e vitamina C.....	92
5.4.7. Vitamina C e vitamina E.....	92
5.4.8. Glutathione e ácido ascórbico.....	93
5.5. Comentários finais.....	93
6. CONCLUSÃO.....	98
7. SUMMARY.....	100
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
9. APÊNDICES.....	134

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

<i>ad libitum</i>	à vontade
ANOVA	Análise de variância
<i>apud</i>	citado por
CEMIB	Centro de Bioterismo da UNICAMP
cm	centímetro
<i>c-myc</i>	gene relativo ao controle de multiplicação celular
<i>Co</i>	<i>company</i>
DBA	dibutilamina
DDT	difenil dicloro tolueno (herbicida)
DEN	dietilnitrosamina
<i>DNA</i>	ácido desoxirribonucléico
&	e
<i>et al.</i>	e colaboradores
F	teste de Snedecor
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
g	grama
GL	grau de liberdade
g/ml	grama por mililitro
HE	coloração com hematoxilina e eosina
H ₂ O	água

Km	constante para determinação da velocidade de uma reação química
M	média simples da evolução de peso
máx	máximo
mín	mínimo
mg	miligrama
mg/kg	miligrama por quilograma
mg/l	miligrama por litro
ml	mililitro
m ²	metro quadrado
μ	micro
μg	micrograma
μl	microlitro
μmol/l	micromol por litro
nº	número
ng	nanograma
NMCE	Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da UNICAMP
N-N=O	grupo funcional dos compostos nitrosados
NO ₂	dióxido de nitrogênio
NS	nitrito sódico
O ₂	oxigênio
O ₂ ⁻	ânion superóxido
p	nível de significância estatística
PF	peso final

<i>pH</i>	logarítmo do inverso da concentração de íons hidrogênio
PI	peso inicial
ppb	partes por bilhão
ppm	partes por milhão
P450	citocromo
p53	gene supressor de tumor
<i>RNA</i>	ácido ribonucléico
S	somatório da evolução do peso dos animais
<i>SPF</i>	<i>Specific Pathogen Free</i>
SRE	sistema retículo endotelial
T	tempo de observação
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VDA	volume diário por animal
VDG	volume diário por grupo
VMDA	volume médio diário por animal
VMDG	volume médio diário por grupo
10^7	10.000.000
10^{10}	10.000.000.000
53-kD	fosfoproteína p53
Δ	diferença entre PF e PI
°C	graus centígrados

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1: Indução experimental de câncer esofágico.....	14
Tabela 2: Tipos de vitaminas.....	16
Tabela 3: Dose diária recomendada de vitamina C.....	19
Tabela 4: Dosagem de ácido ascórbico em pacientes com câncer.....	21
Tabela 5: Grupos de animais e tempo de observação.....	32
Tabela 6: Grupos de animais e drogas utilizadas.....	32
Tabela 7: Média da evolução dos pesos (Δ =PF-PI) de cada grupo em relação ao tempo de observação.....	43
Tabela 8: Volume de solução ingerida em relação ao tempo de observação.....	45
Tabela 9: Resultados da avaliação macroscópica, com número de lesões encontradas por grupo em T150.....	49
Tabela 10: Resultados da avaliação macroscópica, com o número de lesões encontradas por grupo em T180.....	51
Tabela 11: Resultados da avaliação microscópica com número de lesões encontradas por grupo em T150.....	53
Tabela 12: Resultados da avaliação microscópica com o número de lesões encontradas por grupo em T180.....	56
Tabela 13: Análise de variância para o ganho de peso.....	67
Tabela 14: Níveis de significância do Teste de Kruskal-Wallis para o número de tumores em T180.....	68
Tabela 15: Substâncias químicas que podem alterar a metilação do DNA.....	80

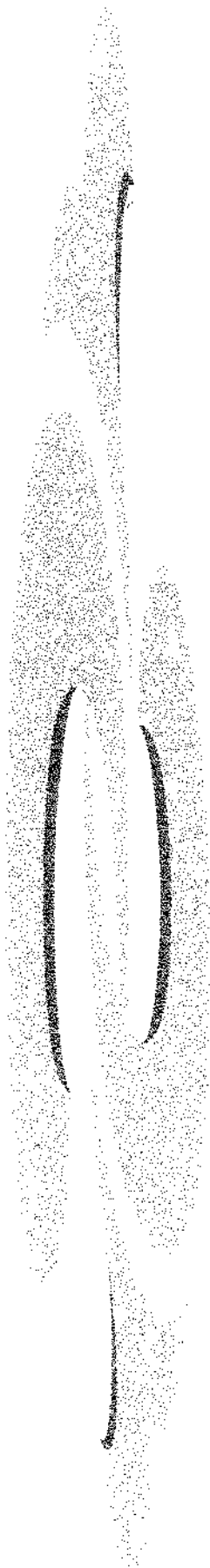
Tabela 16: Número de tumores encontrados por grupo em T150 e T180 e redução em %.....	81
Tabela 17: Relação entre as concentrações de vitamina C no suco gástrico e no plasma em doenças cloridopépticas.....	85
Tabela 18: Relação entre vitamina C e pH do suco gástrico.....	86

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1: Carcinogênese: modelo experimental em três fases.....	5
Figura 2: Fórmula química da vitamina C.....	18
Figura 3: Esquema para classificação macroscópica das lesões superficiais.....	37
Figura 4: Esquema para classificação macroscópica das lesões infiltrativas.....	38
Figura 5: Corte do esôfago em fragmentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6.....	39
Figura 6: Esquema para a avaliação microscópica das lesões, segundo a escola japonesa.....	40
Figura 7: Esôfago normal – avaliação macroscópica – Grupo I T150.....	60
Figura 8: Esôfago normal – avaliação microscópica – grupo I T150.....	60
Figura 9: Avaliação macroscópica de peça do grupo III T180.....	61
Figura 10: Avaliação microscópica – grupo III T180.....	61
Figura 11: Avaliação macroscópica de peça do grupo IV T180.....	62
Figura 12: Avaliação microscópica – grupo IV T180.....	62
Figura 13: Avaliação macroscópica de peça do grupo V T180.....	63
Figura 14: Avaliação microscópica – grupo V T180.....	63
Figura 15: Avaliação macroscópica de peça do grupo VI T180.....	64
Figura 16: Avaliação microscópica – grupo VI T180.....	64
Figura 17: Papiloma – avaliação microscópica.....	65
Figura 18: Acantólise – avaliação microscópica.....	65
Figura 19: Esôfago do grupo III – a fresco.....	66
Figura 20: Esôfago da figura anterior corado com lugol.....	66

LISTA DE GRÁFICOS

	PÁG.
Gráfico 1: Média da evolução de ganho de peso dos animais em cada grupo.....	44
Gráfico 2: VMDA em T0 de cada grupo.....	46
Gráfico 3: VMDA em T120 em cada grupo.....	46
Gráfico 4: VMDA em T150 de cada grupo.....	47
Gráfico 5: VMDA em 180 de cada grupo.....	47
Gráfico 6: Números total de tumores encontrados por grupo – análise macroscópica em T150.....	49
Gráfico 7: Número total de tumores encontrados por grupo – análise macroscópica em T180.....	52
Gráfico 8: Números total de tumores encontrados por grupo – análise microscópica em T150.....	54
Gráfico 9: Número total de tumores encontrados por grupo – análise microscópica em T180.....	57
Gráfico 10: Lesões neoplásicas por animal – avaliação macroscópica em T180 e T150.....	57
Gráfico 11: Lesões neoplásicas por animal – avaliação microscópica em T180 e T150.....	58
Gráfico 12: Número de casos de acantólise por grupo em T150.....	58
Gráfico 13: Número de casos de papiloma e acantólise por grupo em T180.....	59



RESUMO

O câncer é atualmente a segunda causa de morte nos países desenvolvidos. Embora tenham sido obtidos alguns avanços no seu tratamento, o prognóstico da doença ainda está longe de ser satisfatório. Apesar do câncer de esôfago não estar entre os mais frequentes, sendo a quarta neoplasia que mais acomete o aparelho digestivo do homem, seu estudo é muito importante, principalmente por duas razões: atinge as pessoas numa das funções mais importantes para a manutenção da vida, a nutrição; e as taxas de incidência são muito similares às de mortalidade, demonstrando a ineficiência do tratamento. A melhora desta realidade pode ser conseguida de duas maneiras: diagnóstico e tratamento precoce e prevenção. Assim, a procura de substâncias que possam interferir na carcinogênese, impedindo o aparecimento de tumores, parece ser uma idéia atrativa. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da vitamina C na inibição da carcinogênese esofágica experimental induzida pela dietilnitrosamina (DEN).

Foram estudados 240 ratos da raça *Wistar* todos machos, com peso médio de 155g e três meses de idade. Os animais foram acondicionados em gaiolas com cinco ratos cada, recebendo água e alimentação *ad libitum*. As drogas eram colocadas na água, sendo a DEN usada na dosagem de 10mg/kg/dia e a vitamina C, na de 1290mg/kg/dia. Para melhor estudo dos efeitos destas substâncias, os animais foram divididos em grupos segundo a droga ou drogas que receberiam: grupo I, controle, somente água nos sete dias da semana; grupo II, vitamina C nos sete dias da semana; grupo III, DEN três dias por semana e água nos outros quatro dias; grupo IV, DEN três dias por semana e vitamina C nos outros quatro dias; grupo V, DEN e vitamina C juntos no mesmo frasco, por três dias, e água nos outros quatro dias; e grupo VI, DEN e vitamina C juntos no mesmo frasco, por três dias, e vitamina C nos outros quatro dias. Cada grupo foi dividido em subgrupos de 10 animais, segundo o tempo de observação (T), sendo o sacrifício dos animais realizado em quatro diferentes T: 90, 120, 150 e 180 dias. A seguir, o esôfago era removido e avaliado macro e microscopicamente, para a identificação de tumores.

A análise dos resultados mostrou que nos grupos I, II e nos T90 e T120 dos grupos III, IV, V e VI não ocorreu a formação de nenhum tipo de tumor. No T150, na análise macroscópica, foram encontradas 10 lesões no grupo III (1 lesão por animal) e sete lesões no grupo IV (0,7 lesão por animal), não ocorrendo nenhuma lesão nos grupos V e VI.

Na análise microscópica foram identificadas seis lesões no grupo III (0,6 lesão por animal) e cinco no grupo IV (0,5 lesão por animal), não ocorrendo nenhuma lesão nos grupos V e VI. No T180, na análise macroscópica, foram encontradas 48 lesões no grupo III (4,8 lesões por animal); 31 lesões no grupo IV (3,1 lesões por animal); cinco lesões no grupo V (0,5 lesão por animal) e uma lesão no grupo VI (0,1 lesão por animal). Na análise microscópica foram identificadas 23 lesões no grupo III (2,3 lesões por animal); 17 lesões no grupo IV (1,7 lesões por animal); três lesões no grupo V (0,3 lesão por animal) e uma lesão no grupo VI (0,1 lesão por animal).

Houve diferença significativa entre os grupos em relação à formação de tumores, verificando-se no grupo III o maior índice de neoplasias. Nos grupos que receberam vitamina C como inibidor (grupos IV, V e VI) ocorreu menor incidência de tumores, sendo o melhor efeito inibidor observado nos grupos que receberam a vitamina C e o DEN no mesmo frasco (grupo V e VI).

Dessa forma, pode-se concluir que a vitamina C apresentou efeito inibidor do aparecimento de tumores de esôfago induzidos experimentalmente com a DEN, com melhores resultados quando as drogas eram dadas conjuntamente.



1. INTRODUÇÃO

1.1. CONCEITOS INICIAIS

O câncer representa, atualmente, a segunda causa de morte em países desenvolvidos, superado apenas pelas doenças cardiovasculares. As projeções numéricas sugerem que pelo menos um entre quatro indivíduos desenvolverá algum tipo de tumor em algum momento de sua vida (HENNEKENS *et al.*, 1994). Estes dados epidemiológicos demonstram a seriedade com a qual esta doença deve ser encarada, merecendo até mesmo atenção especial em termos de saúde pública. Por outro lado, embora os resultados do tratamento tenham melhorado nos últimos anos, ainda continuam longe de ser satisfatórios. Isto em grande parte se deve ao fato do diagnóstico da doença ser geralmente feito em estágio avançado, quando as possibilidades de cura já são remotas.

Na tentativa de melhorar estes resultados, as pesquisas têm evoluído basicamente em duas frentes. A primeira delas, o diagnóstico precoce, procura, com o tratamento na fase inicial, a melhora do prognóstico; a outra, está orientada para o melhor entendimento da carcinogênese, buscando alternativas para a sua prevenção.

A vida em um ambiente aeróbico propicia muitos benefícios aos organismos, especialmente o alto rendimento energético da reação de fosforilação oxidativa. Porém, isto também pode conduzir ao aparecimento de alguns riscos. Em cada unidade funcional do organismo vivo, a célula, ocorrem reações metabólicas de consumo de oxigênio (O_2), de maneira que este será reduzido para água (H_2O), no final da cadeia respiratória, na mitocôndria, pela transferência de quatro elétrons e dois prótons. Durante estas reações pode haver perda de elétrons isolados, levando a redução parcial de O_2 ao ânion superóxido (O_2^-), formando assim um radical. Radical pode ser conceituado como sendo qualquer estrutura neutra que apresente elétron livre ou não pareado, sendo por esta razão quimicamente muito instável. Estes compostos tendem a ser altamente reativos, pois os elétrons tentarão se ligar a outras substâncias para se estabilizarem (FREI, 1994). Uma vez formados e não inativados, estes radicais livres tendem a reagir com outros compostos e estruturas celulares, particularmente as membranas, levando à lesão e perda da seletividade. Com isso, ocorre perda da capacidade de selecionar as substâncias que entrarão na célula, permitindo a entrada de produtos e partículas nocivas que podem alterar o funcionamento e a manutenção da fisiologia celular normal. Isto origina disfunções e perda da capacidade de realização do

trabalho específico da célula, resultando em doenças e envelhecimento celular precoce. Outro efeito é o de perda do controle da multiplicação celular que, em última instância, pode levar ao aparecimento do câncer. A perda de elétrons, formando radicais livres, ocorre continuamente na cadeia respiratória. Estima-se que 1 a 2% de todos os elétrons desta reação participarão da formação de radicais livres. Cada célula está exposta a 10^{10} moléculas de O_2^- por dia, o que significará, para um indivíduo de 70 kg, a formação de 1,75 kg de radicais livres por ano (BOVERIS *et al.*, 1972; AMES *et al.*, 1993).

O fenômeno da carcinogênese, embora extremamente complexo, já tem algumas etapas bem compreendidas. O passo inicial parece ser a atuação de substâncias carcinogênicas no núcleo celular, sobre o *DNA*. Estas substâncias podem ter origem exógena, como agrotóxicos por exemplo, ou podem ser resultantes do metabolismo celular, como os radicais livres.

A medicina ortomolecular e a biologia molecular, até há alguns anos atrás, com base completamente empírica, começam agora a ser vistas com outros olhos. Isto se deve ao fato de terem abandonado o cunho prático da experiência pessoal, em favor de uma postura mais científica em universidades e laboratórios de pesquisa, contando com profissionais sérios e publicações em revistas renomadas. Assim, pode-se observar a apresentação de resultados fidedignos, obtidos através de metodologia adequada, passíveis de análise por procedimentos estatísticos reconhecidos e validados mundialmente. Nesta linha, como foi sugerido acima, evidências recentes têm demonstrado a possibilidade de que no mecanismo da carcinogênese tenha papel importante a quebra do equilíbrio entre a produção de radicais livres e a atuação de substâncias para sua neutralização, os chamados antioxidantes (DIPLOCK, 1995).

O organismo possui um sistema natural de neutralização dos radicais livres que é conseguido através da atuação dos antioxidantes. Este sistema é constituído principalmente de vitaminas e oligoelementos obtidos na dieta e de um grupo de enzimas que realizam a varredura dos radicais livres. As vitaminas mais importantes para esta finalidade são A, C e E. Os oligoelementos importantes são selênio, zinco, manganês, magnésio, cromo e cobre. Também existem enzimas naturais que atuam na inativação dos radicais livres: glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase.

Em situações ideais, o balanço entre antioxidantes e radicais livres permite que estes sejam eliminados ou neutralizados pelo sistema varredor natural. Porém, as condições atuais de vida, principalmente nos grandes centros metropolitanos com má qualidade de alimentação, etilismo, tabagismo, poluição, radiação e outros, levam ao que é conhecido por *stress oxidativo*, onde ocorre um aumento da produção de radicais livres, sem um correspondente aumento dos antioxidantes. O resultado é um desequilíbrio gerador de doenças, as quais, por sua vez, produzirão mais e mais radicais livres (DOLL & PETO, 1981; PETO *et al.*, 1981; HENNEKENS, 1994).

Numerosos estudos epidemiológicos recentes estão demonstrando que o modo de vida e os fatores ambientais parecem ter grande influência no aparecimento de neoplasias na população geral. A incidência de câncer é mais baixa entre indivíduos com baixo consumo de gordura e grande ingestão de fibras, frutas e vegetais. A dieta parece interferir direta ou indiretamente em 40 a 60% dos casos de tumores (GORI, 1977; JANSEN, 1982; PURTILLO & COHEN, 1985; YAMANAKA, 1987).

Evidências sugerindo os possíveis efeitos dos antioxidantes na prevenção da carcinogênese têm sido baseadas em: pesquisas experimentais demonstrando sua capacidade de neutralizar ou eliminar os radicais livres; estudos epidemiológicos demonstrando que diferenças geográficas da incidência de determinados tumores podem ter relação com o consumo de antioxidantes; e, por último, estudos de grupos individualizados têm sugerido relação inversa entre consumo de antioxidantes e risco de câncer.

1.2. CARCINOGENESE

O desenvolvimento do câncer, fenômeno conhecido por carcinogênese, é na realidade um processo dinâmico de alteração da função do gene, sendo crucial nesta transformação o fator tempo. Durante um período de anos e até mesmo décadas, o conteúdo genético das células é submetido à ação deletéria de diversas substâncias carcinogênicas. O acúmulo de lesão leva à mudança da função genética com expansão clonal de células mutantes (WEINBERG, 1989; HARRIS *et al.*, 1991; SPORN, 1991; RAUTALAHTI & HUTTUNEN, 1993).

O mecanismo envolvido nesta mudança de célula normal para célula neoplásica, ainda não é completamente conhecido. Todavia, para facilitar sua compreensão, foi dividido em três fases distintas: iniciação, promoção e progressão (Figura 1).

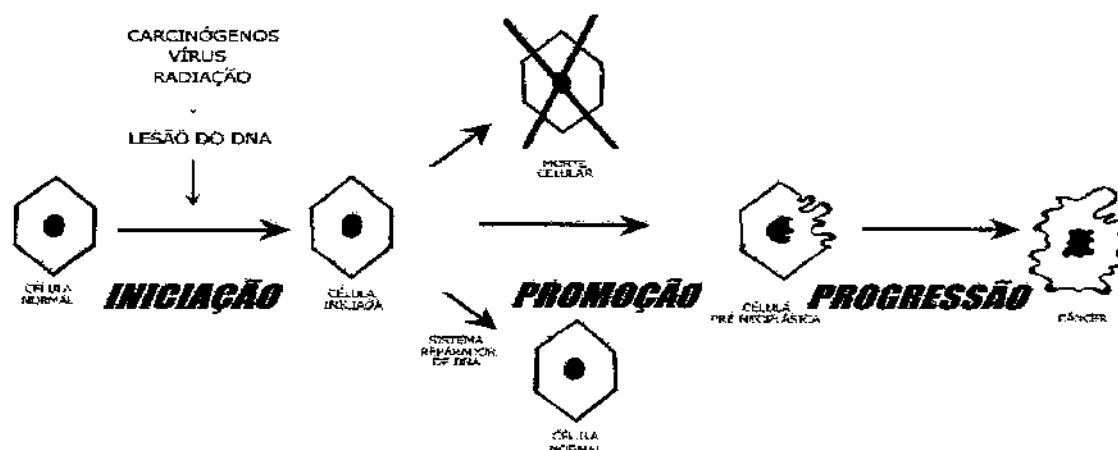


Figura 1: Carcinogênese: modelo experimental em três fases

A iniciação compreende a permanente alteração da informação genética da célula, resultante da ação de carcinógenos sobre o *DNA* com conseqüente dano ao material genético e mutação. Embora ela não leve invariavelmente ao câncer, é indicativa de um risco aumentado para a formação de neoplasia. Agentes iniciadores incluem produtos químicos como certos agrotóxicos, poluição ambiental, radiação ionizante e ultravioleta, e também vírus. Células iniciadas apresentam-se morfologicamente normais, podendo permanecer em estado latente por tempo indeterminado, até que haja a atuação de um agente promotor. A prevenção da iniciação deve envolver eliminação de carcinógenos, inibição da ativação de pré-carcinógenos, bloqueio dos sítios de ligação dos carcinógenos ao *DNA* e estimulação dos mecanismos naturais de reparo do *DNA* lesado. Em diversos destes mecanismos, a neutralização de oxigênio reativo por substâncias antioxidativas, como a vitamina C, parece desempenhar importante papel (SINGH & GABY, 1991; GERSTER, 1995).

A promoção é o processo de transformação de uma célula iniciada em pré-neoplásica. Parece ser um processo muito lento, que pode ocorrer em qualquer fase do período de latência de uma célula ativada. O período de latência para os tumores mais comuns é de 10 a 30 anos. Para o câncer de próstata, por exemplo, poderia ser mais de 40 anos (ROTKIN, 1977). As alterações presentes no processo de promoção consideradas pré-cancerosas são formação de *DNA adducts*, *micronuclei* e trocas na *sister chromatid*. Devido ao fato de ser reversível e necessitar muito tempo para ocorrer, a promoção é uma fase atrativa para a intervenção com substâncias apropriadas para prevenção (SINGH & GABY, 1991; GERSTER, 1995).

A progressão de células pré-cancerosas para cancerosas ocorre devido ao dano adicional do cromossomo e perda da atuação dos fatores de proteção do *DNA*. A divisão celular torna-se descontrolada devido à grande autonomia das células. Essas células neoplásicas podem formar focos em meio ao tecido normal ou pré-canceroso. Logo se transformam em células agressivas que podem invadir o tecido sadio e migrar para órgãos distantes, formando metástases. Nesta fase a intervenção torna-se mais difícil e incerta. Os métodos mais promissores são a melhora da resposta imunológica, por exemplo aumentando a produção de citocinas, a inibição de fatores importantes na perda do controle celular, como a ornitina descarboxilase (AZZI *et al.*, 1992; GERSTER, 1995), e a atuação de substâncias que bloqueiam o suprimento vascular do tumor como a angiostatina e a endostatina (FOLKMAN, 1998).

A carcinogênese, descrita por este mecanismo de três fases, é uma simplificação grosseira do que acontece na realidade, em relação a um mecanismo altamente complexo. Assim, este modelo deve ser utilizado com cuidado. No organismo vivo estas três fases possivelmente coexistem. Alguns agentes, como os radicais livres e outras formas de oxigênio reativo, parecem ter o poder de atuar de modo importante em qualquer uma das três etapas.

1.3. CÂNCER DO ESÔFAGO, EPIDEMIOLOGIA E CARCINOGENÊSE

O câncer de esôfago situa-se entre os 10 tipos mais frequentes de tumores malignos do mundo, representando aproximadamente 1% de todas as lesões. É a quarta neoplasia que mais acomete o aparelho digestivo do homem. Comumente ocorre em regiões subdesenvolvidas, afetando especialmente populações de baixa renda (PARKIN *et al.*, 1993). Sua primeira descrição data do século XII, quando AVICENNA, estudando doenças que causavam disfagia, destacou uma, que se iniciava com dor e moderada dificuldade de deglutição e progredia gradativamente até o seu completo impedimento. (ROSENBERG *et al.*, 1985).

A primeira ressecção bem sucedida de câncer de esôfago foi efetuada em 1913 por TOREK. O tumor foi retirado por toracotomia e o trânsito gastrointestinal foi restabelecido através de um tubo externo de borracha ligando a esofagostomia cervical e a gastrostomia. A paciente, de 67 anos de idade, sobreviveu por 13 anos (TOREK, 1913 *apud* ZILBERSTEIN, 1988).

Apesar dos recentes avanços dos procedimentos diagnósticos, das técnicas cirúrgicas e do tratamento complementar por radioterapia e quimioterapia, o câncer esofágico permanece ainda entre os tumores com prognóstico bastante desfavorável, não tendo apresentado, nas últimas décadas, mudanças significativas nas taxas de sobrevida. Resultado disto é que as taxas de incidência são muito similares às taxas de mortalidade, deixando clara a ineficiência do tratamento, com sobrevida de 5 anos abaixo de 10% (PISANI *et al.*, 1993; BERRINO *et al.*, 1995).

Apresenta uma característica epidemiológica marcante, que é a de possuir zonas endêmicas com altos índices de incidência e mortalidade. A maior experiência com câncer de esôfago vem da China, especialmente de sua região norte, onde a alta incidência pode atingir até 170 casos por 100.000 habitantes por ano em algumas regiões, como Lin-Xian, na província de Henan. Isto permite estudos epidemiológicos e rastreamento com citologia em indivíduos assintomáticos, conseguindo-se desse modo aumentar o número de diagnósticos de lesões precoces, levando a melhores resultados terapêuticos (YANG, 1980; KRUEL, 1992). Outras regiões de alta incidência são o nordeste do Irã, no litoral do mar Cáspio,

Índia e França, na região da Normandia (KMET & MAHBOUBI, 1972; TUYNS, 1979; SIDDIQI *et al.*, 1988).

No mundo ocidental a incidência é bastante variável, sendo a média de 3 a 10 casos para cada 100.000 habitantes por ano. O Brasil apresenta incidência semelhante, com 8/100.000 habitantes para homens e 2/100.000 para mulheres. O Rio Grande do Sul, juntamente com áreas do Uruguai e da Argentina, apresenta a maior incidência das Américas e uma das maiores do ocidente com taxas de até 27 casos/100.000 habitantes para homens e 8 casos/100.000 para mulheres (WATERHOUSE, 1982; BARCELOS & PECCIN, 1983; PROLLA *et al.*, 1993; CALMELS *et al.*, 1996). Neste estado, merecem destaque a região de fronteira com o Uruguai e a Argentina, com população de origem portuguesa, espanhola e nativa, caracterizada por dieta baseada no elevado consumo de churrasco e a região da encosta da Serra Geral, com descendência alemã e hábitos nutricionais ainda muito arraigados a esta cultura (PROLLA *et al.*, 1993). Além do churrasco, caracterizado pelo preparo da carne no espeto com grande quantidade de sal grosso, outro hábito comum nestas regiões é o consumo de chimarrão, uma infusão de erva mate, *Ilex paraguayensis*, em água fervente. Deve-se levar em consideração o fato desta bebida ser normalmente consumida em altas temperaturas, lembrando também o que acontece em regiões de alta incidência da Ásia, onde é comum o consumo de arroz também em temperaturas muito elevadas.

O câncer de esôfago é mais freqüentemente encontrado no sexo masculino, sendo sua ocorrência de duas a cinco vezes maior que no feminino. A faixa etária mais acometida está entre a quinta e a sétima décadas (BLOT, 1994).

Os principais fatores associados ao desenvolvimento do câncer de esôfago nos países ocidentais são o fumo e o álcool. O risco da neoplasia é cinco vezes maior em fumantes que em não fumantes, podendo atingir até dez vezes mais, quando associado ao consumo de álcool, que parece atuar de forma sinérgica. Na Ásia, onde sua incidência é elevada, a associação com fumo e álcool não é tão evidente, sugerindo que outros fatores de risco, como nitrosaminas, fungos e fatores nutricionais, estariam implicados. Dentre os fatores nutricionais, a dieta pobre em beta caroteno, vitamina E e C tem recebido destaque.

A capacidade dos compostos N-nitrosos de provocar câncer de esôfago já é bem conhecida, existindo modelos bem definidos para esta indução em animais de experimentação. Muito se tem pesquisado na tentativa de encontrar uma substância que possa eliminar o efeito nocivo das nitrosaminas, já que o contato com estes compostos é extremamente comum, quer por via exógena, quer endógena. Dessa forma, a vitamina C, por sua já conhecida capacidade de impedir a reação de nitrosação e de interferir na carcinogênese induzida experimentalmente, tem merecido atenção especial.

1.4. COMPOSTOS N-NITROSOS

Os compostos N-nitrosos definem-se quimicamente por apresentar o grupo funcional $N-N=O$ em comum, podendo ser divididos em dois grupos, as nitrosaminas e as nitrosamidas. As nitrosaminas são substâncias estáveis, podendo com frequência, ser encontradas na natureza, principalmente nos alimentos. Por outro lado, as nitrosamidas são compostos extremamente instáveis, dependentes principalmente do *pH*. Sofrem redução em *pH* acima de 2 e praticamente não existem em *pH* acima de 7. Isto explica a dificuldade para encontrá-las na natureza em condições normais (HOTCHKISS, 1987).

Estes compostos receberam pouca atenção até o final da década de 60. A nitrosodimetilamina começou a ser usada na década de 30 como solvente industrial, pois na época apresentava propriedades atraentes, por ser solúvel tanto em hexano quanto em água, além de possuir propriedades anticorrosivas. Logo a sua toxicidade em humanos foi reconhecida. Dois pesquisadores intoxicaram-se com a substância, apresentando sintomas severos de insuficiência hepática. Um deles faleceu por necrose do fígado, sete semanas após a exposição. Baseando-se neste fato, FREUND, em 1937, confirmou a hepatotoxicidade da droga. Utilizando ratos e cães, demonstrou o seu potencial de provocar necrose quando expunha os animais à droga em forma de vapor. Uma investigação mais completa sobre estes efeitos nocivos foi apresentada por BARNES & MAGEE, em 1954. HARRIS *et al.*, em 1979, foram os primeiros a demonstrar a capacidade da nitrosodimetilamina de causar alquilação do *DNA*.

A primeira suspeita de que os alimentos pudessem ser contaminados com compostos N-nitrosos ocorreu a partir de um acidente ocorrido na Noruega, no final da década de 50, quando animais domésticos alimentados com peixe conservado por nitrito morreram de problemas hepáticos (ENDER *et al.*, 1964). Partindo da observação deste acontecimento, ENDER *et al.*, apresentaram estudo, em 1967, comprovando os efeitos deletérios da presença dos compostos N-nitrosos na alimentação, chamando atenção para os riscos de adicioná-los como conservantes. O primeiro relato de substância nitrosada na comida humana foi realizado por HERMAN (1961), demonstrando a presença de nitroso-metilamino-benzaldeído em cogumelos. A partir daí, o número de estudos demonstrando a presença e os efeitos nocivos dos compostos nitrosados na alimentação humana tem sido cada vez maior. Um dos mais importantes foi apresentado em 1967, por DEVIK, comprovando que reações químicas entre carboidratos e aminoácidos induzidas por calor, formando pigmentos marrons, resultariam no aparecimento de compostos N-nitrosos. Isto criou muita apreensão, pois imputava ao processo de cozinhar, uma prática extremamente comum, a capacidade de originar compostos nitrosados. Foram estes fatos, e o aparecimento das primeiras publicações relacionando as nitrosaminas ao câncer, especialmente de esôfago e estômago, que estimularam a *International Agency for Research on Cancer (IARC)* a criar encontros para discussão e padronização de maneiras para a adequada quantificação das nitrosaminas nos alimentos e para o estudo de sua importância na carcinogênese (BOGOVSKI *et al.*, 1972).

Na reação de nitrosação, inicialmente um agente nitrosante precisa ser gerado, para em seguida reagir com um grupo amina ou amida formando o composto N-nitroso derivativo. Esta reação é dependente de *pH*, sendo que quanto mais baixo, mais intensa será a nitrosação (HOTCHKISS, 1987).

Os sais de nitrito e nitrato, tanto sódicos quanto potássicos, têm sido usados por séculos como conservantes para carnes, aves e peixes (BINKERD & KOLARI, 1975). Na verdade, os nitratos são adicionados aos produtos que se quer conservar, como fonte de nitrito, que é a substância ativa. Esta transformação é realizada por enzimas bacterianas. O nitrato pode servir como fonte de nitrito por longos períodos de tempo. Essa substância teria como funções básicas: manter a cor vermelho viva, resultando em aspecto de carne fresca

por muito mais tempo; atuar como antioxidante, evitando a formação do ranço; e inibir o crescimento do *Clostridium botulinum*.

Além daqueles encontrados na alimentação, o homem está exposto aos compostos N-nitrosos de uma grande variedade de fontes. Basicamente elas podem ser divididas em exógenas e endógenas. O primeiro grupo inclui tabaco, cosméticos, drogas, pesticidas, produtos químicos como solventes e tintas, borrachas, plásticos e eletrodomésticos. A contaminação exógena também costuma ocorrer freqüentemente como exposição ocupacional. O aparecimento endógeno das nitrosaminas resulta da reação *in vivo* de agentes nitrosantes e aminas ou amidas ingeridas, ou ainda de seus precursores na reação de nitrosação (PREUSSMANN & EISENBRAND, 1984).

O desenvolvimento de modelos experimentais para carcinogênese é muito importante por permitir o estudo morfodinâmico e etiopatogênico do câncer. Além disso, podem ser facilmente reproduzíveis e apresentam maior número de lesões que podem ser estudadas. 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 agentes carcinogênicos ingeridos com a dieta provavelmente sofrem ação enzimática e convertem-se nos carcinógenos finais, alterando informações em nível de *DNA* e portanto, induzindo mutações celulares, funcionando assim como agentes alquilantes (DRUCKREY, 1972). Esses compostos mostram especificidade orgânica para indução de carcinoma esofágico em particular.

A ocorrência de tumores esofágicos espontâneos em animais de laboratório é pouco freqüente (BAKER, 1953; CRAIN, 1958). A partir da criação de um modelo experimental por DRUCKREY, em 1961, usando metil-nitrosoanilina, administrada por via oral para ratos, foi obtido carcinoma de células escamosas na maioria dos animais. Este modelo consolidou a indução de tumores esofágicos em laboratório.

A indução de carcinomas de células escamosas no esôfago de camundongos pela dietilnitrosamina (DEN), foi conseguida pela primeira vez por CLAPP & CRAIG (1967), seguido por diversos outros autores (NAPALKOV & POZHARISSKI, 1969; REUBER, 1975; REUBER, 1977; BULAY & MIRVISH, 1979; STINSON, 1979).

A carcinogênese esofágica experimental apresenta muitas dificuldades. A droga utilizada é altamente tóxica, exigindo cuidados para sua manipulação. A dose utilizada é muito pequena em relação à solução padrão, o que dificulta o processo de diluição. Os animais utilizados na maioria dos experimentos são ratos ou camundongos que têm pouca longevidade. O tempo de observação é prolongado, o que pode levar à morte desses animais antes do término do experimento, principalmente pelo efeito hepatotóxico do carcinógeno. Finalmente, a manipulação cirúrgica é dificultada pelo tamanho dos animais. Deve-se ter cuidado na retirada da peça para não inutilizá-la, perdendo com isso todo o trabalho despendido durante a realização do experimento.

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 tumores, geralmente em sítios distantes do local de aplicação.

Um dos aspectos que mais chama a atenção na carcinogênese induzida pelos compostos N-nitrosos, é o fato de serem carcinógenos capazes de gerar agentes alquilantes que interagem com o *DNA* de certos órgãos-alvo, causando a mutação, transformação neoplásica e carcinoma.

Embora o fígado tenha sido o sítio comum de ação das 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 em seus vários sítios, de acordo com o que se pretende avaliar no homem. Nas linhagens de rato mais freqüentemente utilizadas, 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 à maior incidência do câncer de esôfago (DRUCKREY *et al.*, 1963; HOTCHKISS, 1987). Contudo, vários trabalhos utilizando a DEN (uma dialquilnitrosamina simétrica), mostraram ser ela capaz de provocar a carcinogênese esofágica, contrariamente ao esperado (BAKER, 1974; REUBER, 1975; REUBER, 1976; RUBIO, 1982; RUBIO, 1983).

A demonstração de que o tratamento com a DEN causa carcinogênese esofágica, além da hepática, inicialmente levantou 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 ser, necessariamente, dependente da metabolização hepática (CLAPP & CRAIG, 1967). Essa segunda hipótese tem sido a mais aceita, pois parece 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 DEN, com formação de intermediário alquilante, é plausível para explicar a tumorigênese hepática induzida por essa nitrosamina, considerando o fígado como o grande sítio do metabolismo enzimático. Entretanto, não explica a indução de tumor em outros sítios como o esôfago, por exemplo.

Vários autores induziram câncer esofágico em roedores utilizando nitrosaminas (Tabela 1).

Tabela 1: Indução experimental de câncer esofágico

AUTOR / DATA	DROGA / DOSE / TEMPO	ANIMAL / CÂNCER
CLAPP & CRAIG 1967	Dietilnitrosamina 6mg/kg/dia 22 semanas	Camundongo 100% estômago 18% esôfago
NAPALKOV & POZHARISSKI 1969	N-metil N nitrosoamilina 28mg/kg/dia 3 meses	ratos albinos 26.1% esôfago
BAKER 1974	Dietilnitrosamina 40 ppm 145 dias	Hamsters chineses 23% estômago 15% esôfago
REUBER 1975	Dietilnitrosamina 0.0114% 26 semanas	ratos Buffalo 50% esôfago
MANDARD <i>et al.</i> 1984	DEN 5 à 10mg/kg/dia até 4 meses	Rato WISTAR 2.5% esôfago
RUBIO 1987	DEN 0.04ml/1000ml até 7 meses	Camundongo 100% esôfago
SALLET 1996	DEN 10mg/kg/dia até 7 meses	Rato WISTAR 100% esôfago

SALLET, em 1996, com a DEN utilizada por 200 dias em ratos *Wistar*, obteve tumores de esôfago em todos eles, sendo a média de 6,1 lesões por animal. Nesse estudo, 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 em um grupo de 30 animais.

Atualmente sabe-se que o organotropismo da DEN está relacionado com o citocromo P450, presente tanto no fígado, na mitocôndria e no sistema retículo endotelial (SRE), bem como no esôfago, no SRE da mucosa (LIJINSKY, 1992). A afinidade de uma enzima pelo substrato é determinada pelo seu K_m , que, em última instância, determina a velocidade de uma reação química (RIBEIRO PINTO, 1994). O P450 esofágico tem um K_m menor; portanto, quando se administra DEN em dose baixa, por um período prolongado, o organotropismo da nitrosamina fica favorável ao P450 esofágico, determinando uma incidência maior de carcinoma esofágico. Por outro lado, o P450 do fígado tem um K_m maior; conseqüentemente, quando se administra a DEN em dose alta e por curto período de tempo, ocorre rápida saturação do P450 esofágico, desviando a rota metabólica da nitrosamina para a ativação do P450 hepático que tem uma velocidade sete vezes maior, determinando uma incidência elevada de carcinoma hepático (RIBEIRO PINTO, 1994).

1.5. VITAMINA C

O beribéri, uma forma de polineuropatia periférica, foi conhecido durante séculos por ocorrer em populações com dieta composta basicamente por arroz beneficiado (sem casca e polido). EIJKMAN, em 1897, demonstrou que aves alimentadas unicamente com este arroz, desenvolviam uma forma similar de polineuropatia que melhorava se a casca fosse novamente acrescentada à dieta. FUNK, em 1911, conseguiu isolar da casca do arroz uma substância capaz de prevenir o beribéri que classificou como uma amina. Considerando-a muito importante para a vida, denominou esta nova substância de vitamina (EIJKMAN, 1897 *apud* KRAUSE & MAHAN, 1991; FUNK, 1911 *apud* KRAUSE & MAHAN, 1991).

Muitas enzimas requerem um cofator não protéico para sua função catalítica, que pode ser uma molécula orgânica, chamada coenzima ou um componente inorgânico, como um íon metálico. Embora esses cofatores enzimáticos ocorram em diminutas quantidades nas células, eles são essenciais para a ação de muitas enzimas, desempenhando papel vital no metabolismo celular. As vitaminas são nutrientes orgânicos necessários em pequenas quantidades na dieta dos seres humanos e de muitos animais para crescimento e função

adequados, sendo precursores essenciais de várias destas coenzimas. São chamadas de micronutrientes, pois, contrariamente aos macronutrientes como carboidratos, proteínas e gorduras, são encontradas na dieta em miligramas ou microgramas, tornando possível numerosas transformações e reações, resultando no que se conhece por metabolismo (LEHNINGER, 1988). Desse modo, vitamina pode ser definida como um grupo de substâncias orgânicas com diversas composições químicas, que devem ser obtidas do meio ambiente em quantidades muito pequenas e que o homem é incapaz de sintetizar e cuja deficiência levará ao aparecimento de doenças.

Com base nestes conceitos, já foram identificadas 14 vitaminas necessárias na dieta humana. Outras estão em fase de identificação (YOUNG & NEWBERNE, 1981).

Embora difiram amplamente em termos de estrutura e função, as vitaminas podem ser divididas em duas grandes classes: hidrossolúveis e lipossolúveis (Tabela 2).

Tabela 2: Tipos de vitaminas

TIPOS DE VITAMINAS	
LIPOSSOLÚVEIS	HIDROSSOLÚVEIS
Vitamina A	Folacina
	Niacina
	Riboflavina (B ₂)
Vitamina D	Tiamina (B ₁)
Vitamina E	Vitamina B ₆
	Vitamina B ₁₂
Vitamina K	Vitamina C
	Ácido Pantenóico
	Biotina
	Colina

A vitamina C ou ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel necessária para muitas importantes funções biológicas, como síntese de hormônios, neurotransmissores, colágeno, carnitina e também para a absorção de ferro e outras substâncias (MAIANI *et al.*,

1993). Atualmente, muita importância tem sido dada à sua atuação como antioxidante e capacidade de inibição da carcinogênese.

O escorbuto é uma doença antiga, conhecida na Europa desde o tempo das cruzadas, ocorrendo especialmente em populações com baixo consumo de frutas e vegetais, durante longos períodos do ano. Sua incidência diminuiu de maneira significativa com a introdução da batata nos hábitos alimentares regulares dos europeus durante o século XVII. Continuou sendo um grande problema para os navegadores, pois era responsável por um grande número de mortes nas tripulações. Logo ficou evidente uma causa dietética para o escorbuto. A partir de 1535, os capitães dos navios aprenderam, em contato com os índios canadenses, que a doença poderia ser curada e prevenida com o simples consumo de frutas cítricas frescas. Assim, a ingestão de suco de limão virou hábito nos navios. Na Marinha Britânica o número de casos de escorbuto caiu de 1457 em 1780, para apenas 2 casos em 1806, sendo que a partir de 1800 o consumo de suco de limão tornou-se obrigatório entre os marinheiros. HOLST & FRÖLICH, em 1907, demonstraram que cobaias desenvolviam lesões escorbúticas quando mantidas apenas com dieta de farelo e aveia. SZENT-GYÖRGYI, em 1928, isolou de vegetais uma substância capaz de prevenir o escorbuto. Porém, somente em 1932, KING & WAUGH foram capazes de isolar a vitamina cristalina do suco de limão. Anteriormente chamada genericamente de vitamina C, agora a nova substância recebia a denominação química de ácido ascórbico (HOLST & FRÖLICH, 1907 *apud* MARCUS & COULSTON, 1992; SZENT-GYÖRGYI, 1928 *apud* MARCUS & COULSTON, 1992; KING & WAUGH, 1932 *apud* MARCUS & COULSTON, 1992).

O ácido ascórbico é um composto de seis carbonos, estruturalmente relacionado à glicose e a outras hexoses. Sofre oxidação reversível no corpo em ácido desidroascórbico, composto que possui a atividade integral da vitamina C (Figura 2).

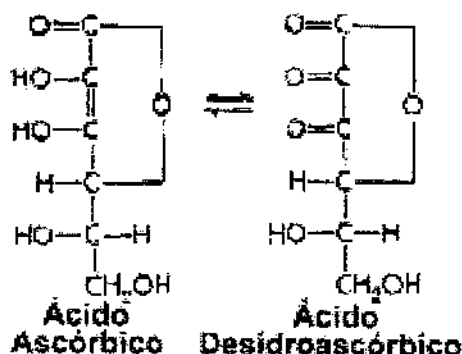


Figura 2: Fórmula química da vitamina C

A vitamina C participa de várias reações bioquímicas, envolvendo principalmente a oxidação, ou seja, transferência de elétrons. Trata-se de um elemento necessário ou facilitador da conversão de certos resíduos prolínicos em hidroxiprolina durante a síntese do colágeno, da oxidação das cadeias laterais lisínicas nas proteínas para fornecer hidroximetilisina para a síntese de carnitina, da síntese de esteróides pelo córtex supra-renal, da conversão do ácido fólico, do metabolismo das drogas nos microsossomas e do metabolismo da tirosina. Por sua ação redutora de íon ferro para o estado ferroso, aumenta a sua absorção no intestino. Além disso, participa tanto da produção quanto do metabolismo de vários hormônios. A nível tecidual sua maior função parece ser relacionada à síntese de colágeno, proteoglicanos e outros componentes orgânicos da matriz intercelular (MARCUS & COULSTON, 1992).

O ácido ascórbico é prontamente absorvido pelo intestino, sendo que esta absorção ocorre de forma praticamente completa. Está presente no citoplasma e distribui-se de maneira onipresente nas células do corpo. A dose diária recomendada pelo *FOOD AND NUTRITION BOARD* (1989) dos Estados Unidos é de 60 mg (Tabela 3), sendo encontrada em doses variáveis nos alimentos (Apêndice 1, Tabela 19).

Tabela 3: Dose diária recomendada de vitamina C.

CATEGORIA	IDADE (ANOS) OU CONDIÇÃO	VITAMINA C
		(mg)
Crianças	0,0 – 0,5	30
	0,5 – 1,0	35
	1 – 3	40
	4 – 6	45
	7 – 10	45
Sexo masculino	11 – 14	50
	15 – 18	60
	19 – 24	60
	25 – 50	60
	51 +	60
Sexo feminino	11 – 14	50
	15 – 18	60
	19 – 24	60
	25 – 50	60
	51 +	60
Gestantes		+ 70
Lactentes	Primeiros 6 meses	+ 95
	6 meses até 12 meses	+ 90

A maioria das espécies têm mecanismos de síntese endógena de vitamina C a partir da glicose. Além do homem, cobaias, peixes e morcegos são incapazes de sintetizá-la, sendo dependentes de fontes exógenas de vitamina C. Isto acontece porque durante o processo evolutivo ocorreu a perda do mecanismo enzimático necessário para a produção endógena de vitamina C, em específico da enzima gulonolactona oxidase, que catalisa a conversão de glicose em ácido ascórbico (NISHIKIMI & UDERFRIEND, 1980).

1.6. EFEITO INIBIDOR DA VITAMINA C NA CARCINOGENESE

Estudos recentes têm demonstrado que a ingestão de vitamina C em frutas e vegetais é inversamente relacionada aos índices de câncer de estômago, esôfago, cavidade oral e pâncreas. Também parece influenciar, ainda que de modo menos marcante, o colo uterino, o reto, a mama e o pulmão (BLOCK, 1991a; 1991b; BLOCK, 1992a; BLOCK *et al.*, 1992). O mecanismo pelo qual a vitamina C pode atuar para desempenhar este papel inibidor sobre a carcinogênese é controverso e várias hipóteses são aventadas.

A correlação entre câncer e ácido ascórbico, embora esteja sendo muito discutida atualmente, não é tema recente. EUFINGER & GAEHTGENS, em 1936, relataram o tratamento com sucesso de leucemia mielóide com vitamina C. Desde então, está vem recebendo cada vez mais atenção como substância capaz de atuar na inibição e na prevenção da carcinogênese. Diversos estudos epidemiológicos foram realizados procurando relacionar câncer e consumo de vitamina C, seja na dieta normal ou como suplementação alimentar. Assim, o *COMMITTEE ON DIET, NUTRITION AND CANCER, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES* apresentou, em 1982, relato de que a vitamina C inibiria a formação de alguns carcinógenos e que o consumo de alimentos ricos em vitamina C estaria associado com a diminuição do risco de câncer de esôfago e estômago.

HAENSZEL & CORREA publicaram estudo em 1975, relacionando o declínio da mortalidade por câncer de estômago com o aumento da ingestão de vegetais e frutas ricos em vitamina C. No Irã, COOK-MAZAFFARI *et al.* (1979), encontraram relação inversa entre câncer de esôfago, consumo de frutas frescas, vegetais e o padrão socioeconômico. As mudanças de incidência e mortalidade do câncer de estômago entre indivíduos do nordeste europeu e Japão, quando comparadas com seus descendentes americanos, sugerem a predominância ambiental sobre a genética na carcinogênese. A incidência do câncer gástrico está positivamente associada ao consumo de arroz, vegetais em conserva e peixe seco e salgado e negativamente associado ao consumo de vitamina C. Isto reforça a teoria da nitrosação como origem do câncer gástrico. METTLIN *et al.* (1981), encontraram associação inversa, estatisticamente significativa, entre consumo de vitamina C e câncer de esôfago. GRAHAM *et al.* (1981), estudando câncer de laringe, demonstraram que a vitamina C atua como fator protetor. WASSERTHEIL-SMOLLER *et al.* (1981), observaram relação

inversa entre câncer de colo uterino e vitamina C. BÖING *et al.* (1985), estudando hábitos dietéticos de pacientes terminais de câncer gástrico na Alemanha, encontraram baixo consumo de vitamina C. MARSHALL *et al.* (1982), observaram que quanto menor o consumo de vitaminas A e C, maior a incidência de câncer da cavidade oral. WINN *et al.* (1984), também estudando câncer da cavidade oral e faringe, demonstraram que o consumo em grande quantidade de frutas e vegetais tem efeito protetor. JAIN *et al.* (1980), não encontraram associação entre câncer de cólon e ingesta de vitamina C. HINDS *et al.* (1984), em estudo no Havaí, não conseguiram encontrar associação significativa entre vitamina C e câncer de pulmão. STAEHELIN *et al.* (1983), em estudo realizado entre 1970 e 1983 com 3.304 trabalhadores de uma indústria química, observaram que a dosagem sérica de vitamina C era mais baixa naqueles indivíduos que tinham morrido por câncer. Outro estudo populacional foi realizado em LIN-XIAN, na província de Henan, China, conhecida pela sua alta incidência de câncer esofágico, com resultados inconclusivos (YANG *et al.*, 1982).

O nível de ácido ascórbico em pacientes com câncer vem sendo estudado há bastante tempo e muitos estudos têm relatado deficiência de vitamina C entre os pacientes portadores de câncer (BODANSKY *et al.*, 1951; WALDO & ZIPF, 1955; BARKHAN & HOWARD, 1958; BASU *et al.*, 1974; KRASNER & DYMOCK, 1974; BARTON & ROATH, 1976; KAKAR & WILSON, 1976; LIEBES *et al.*, 1981; ANTHONY & SCHORAH, 1982) (Tabela 4).

Tabela 4. Dosagem de ácido ascórbico em pacientes com câncer

AUTOR / ANO	TIPO DE CÂNCER	ÁCIDO ASCÓRBICO PACIENTES C/ CÂNCER	ÁCIDO ASCÓRBICO GRUPO CONTROLE
BODANSKY, 1951	Miscelânea	27	36
WALDO, 1955	Leucemia	8,2	35,2
BARKHAN, 1958	Leucemia	6,2	10,8
BASU, 1974	Pulmão	11,1	33,1
KRASNER, 1974	Miscelânea	11	17
BARTON, 1976	Leucemia	8	27
KAKAR, 1976	Pele	25,4	45,2
LIEBES, 1981	Leucemia	17	3
ANTHONY, 1982	Pulmão	15,9	33

ácido ascórbico em mg/ml

O primeiro estudo com grande casuística usando vitamina C para tratamento de câncer foi conduzido por CAMERON & PAULING, em 1976, que estudaram dois grupos de doentes terminais de câncer, utilizando vitamina C para tratamento de um deles. O tempo de sobrevida do grupo que tinha recebido ácido ascórbico foi 4,2 vezes maior. Outro estudo similar foi realizado em seguida, na *Mayo Clinic*, sem encontrar diferenças significativas de sobrevida para os dois grupos (CREAGAN *et al.*, 1979).

O efeito do ácido ascórbico também foi avaliado em pacientes com polipose colônica familiar, sendo que um grupo de pacientes recebeu 3g de vitamina C por dia e o outro placebo. Houve diferença significativa em relação aos resultados, sendo que o grupo que recebeu vitamina C apresentou redução tanto da área quanto do tamanho dos pólipos (BUSSEY *et al.*, 1982). MURATA *et al.* (1982), adotando no Japão um protocolo similar ao de CAMERON & PAULING (1976), relataram um aumento da sobrevida de 5 a 6 vezes no grupo que recebeu mais de 5g de vitamina C por dia. Também observaram um melhor comportamento destes pacientes em relação ao controle da dor. DION *et al.* (1982), estudando mutagenicidade celular nas fezes de indivíduos normais, observaram redução do número de células mutantes nos que tinham recebido suplemento em vitaminas C e E.

A relação entre carcinogênese e vitamina C também tem sido estudada em animais de experimentação através da indução de câncer com o uso de substâncias químicas. A injeção subcutânea de benzopireno em ratos induz a formação de sarcomas. SHAH & BHATTACHARYA (1982), utilizando ácido ascórbico a 2,5 % diluído na água dada para os ratos, observaram a formação de tumor em apenas um dos cinco animais, enquanto no outro grupo, que tinha recebido apenas benzopireno, todos os ratos morreram devido ao rápido crescimento dos tumores. A incidência de tumores de cólon e rim induzidos pela dimetil-hidrazina foi mais baixa nos ratos que receberam ácido ascórbico previamente (REDDY *et al.*, 1982). O número de tumores de pulmão induzidos pela inalação de plutônio em ratos apresenta diminuição quando os animais também recebem vitamina C (SANDERS & MAHAFFEY, 1983).

A cultura de células com câncer tem sido outra maneira de se estudar a ação da vitamina C na carcinogênese. Nestes estudos, vários efeitos têm sido atribuídos ao ácido ascórbico: correção de alterações do núcleo celular (BENEDICT *et al.*, 1982), inibição de

células leucêmicas (PARK *et al.*, 1980), diminuição da capacidade de células tumorais das aves para se replicarem (BISSEL *et al.*, 1980), diminuição da capacidade dos vírus de afetarem as células tumorais (MORIGAKI & ITO, 1982) e facilidade para os tumores tornarem-se mais diferenciados (LEUCHTENBERGER & LEUCHTENBERGER, 1984).

Um importante mecanismo pelo qual a vitamina C parece interferir na carcinogênese é relacionado à sua capacidade de inibir a formação de nitrosamina. SANDER & BUERKLE, em 1969, foram os primeiros a demonstrar que uma reação química *in vivo* entre aminas secundárias da alimentação e nitrito resultaria na formação de nitrosaminas. Os nitritos reagem com aminas secundárias e amidas no estômago para formar as nitrosaminas, em uma reação química chamada de nitrosação. Embora o homem possa entrar em contato com as nitrosaminas por via exógena na alimentação, cosméticos, agrotóxicos e produtos químicos, a maior parte das nitrosaminas às quais se encontra exposto provém da reação de nitrosação que se dá a nível endógeno. As aminas e amidas são abundantes na alimentação, enquanto os nitritos são usados como aditivos e conservantes em alguns alimentos. São também gerados pela ação de bactérias na saliva, estômago, intestino e urina. Uma vez formada, a nitrosamina participa da origem do câncer de esôfago, estômago e cavidade oral (MIRVISH, 1983; MAGEE, 1989; CRADDOCK, 1992; ZENG *et al.*, 1993). MIRVISH *et al.*, em 1972, demonstrou em modelos animais a capacidade do ácido ascórbico de bloquear a formação de nitrosaminas, sendo que esta ação resultaria da reação direta com os nitritos, onde a vitamina C, transformada por reação de oxidação em desidroascorbato, competiria com as aminas e amidas pelo nitrito, com a vantagem de apresentar uma reação mais rápida que o agente nitrosante. A desvantagem é que sendo hidrossolúvel não poderia atuar em meio lipídico. Posteriormente OSHIMA & BARTSCH (1981) demonstraram em voluntários a formação *in vivo* de nitrosoprolina e que o ácido ascórbico poderia inibir esta produção.

A formação de nitrosaminas é ótima em *pH* 3.5. Por outro lado, em pacientes gastrectomizados, vagotomizados e com gastrite crônica atrófica com *pH* elevado 5,5-6,5, também há aumento da formação de nitrosaminas devido ao crescimento da população bacteriana (GLATTHAAR *et al.*, 1986). Duas outras fontes de agentes nitrosantes endógenos, além do nitrato e nitrito da dieta, são o óxido de nitrogênio da atmosfera e o óxido nítrico produzido endogenamente pelas células. O óxido nítrico é muito lábil e

rapidamente reage com o oxigênio, resultando em dióxido de nitrogênio (NO₂). Em seguida, a reação com aminas secundárias resulta na formação de nitrosaminas (TANNENBAUM, 1979; TANNENBAUM & YOUNG, 1980; TANNENBAUM *et al.*, 1991).

Em 1984, REED *et al.* demonstraram pela primeira vez que a vitamina C reduz a formação de nitrosaminas em indivíduos com maior risco de câncer gástrico, concluindo que este tipo de tratamento poderia ser utilizado como proteção para os efeitos nocivos deste tipo de carcinógenos.

No homem, o valor médio de ácido ascórbico é de 50mg/l no suco gástrico e 7mg/l no plasma. Em pacientes com gastrite crônica atrófica, este valor diminui para em torno de 3,4mg/l no suco gástrico (MIRVISH, 1994). A vitamina C também é capaz de reduzir sensivelmente a quantidade de células mutantes nas fezes, possivelmente por seu efeito antioxidante (DION *et al.*, 1982).

Estudos em humanos e animais demonstraram claramente que a nitrosação endógena ocorre com maior intensidade no estômago. Os diversos tipos de células como macrófagos, neutrófilos, células do endotélio e do cérebro, e as bactérias, através da utilização do óxido nítrico, também possuem condições para a reação de nitrosação. Todas essas células utilizam nitrogênio a partir da arginina para a produção de óxido nítrico (TANNENBAUM *et al.*, 1991).

Pela sua capacidade de reagir quimicamente com os agentes nitrosantes, o ácido ascórbico efetivamente inibe a reação de nitrosação.

1.7. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar através de estudos anatomopatológicos, por macro e microscopia, o efeito inibidor da vitamina C na carcinogênese esofágica experimental, induzida pela DEN.

Para isto foram criados grupos distintos de ratos *Wistar*, que em períodos de tempo diferentes receberam:

- a) apenas água;
- b) vitamina C isoladamente;
- c) DEN isoladamente;
- d) vitamina C e DEN, alternadamente;
- e) vitamina C e DEN, conjuntamente.

2. MATERIAL

2.1. ANIMAIS

O experimento foi realizado no Laboratório de Enzimologia e Carcinogênese Experimental do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da UNICAMP (NMCE), sendo utilizados 240 ratos da raça *Wistar (Rattus norvegicus albinus, Rodentia, Mammalia)*, todos machos, com três meses de idade e peso variando de 120 a 200g (peso médio de 155g), fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB).

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

2.2. ACONDICIONAMENTO

Os animais foram divididos em grupos de 10 e subgrupos de cinco, sendo cada um destes acondicionado em gaiola plástica medindo 33cm de largura, 40cm de comprimento e 18cm de altura, forrada com serragem (maravalha) e com tampo de grade metálica. Eram mantidos em temperatura ambiente, com ciclos diurno de luz, sob fluxo de ar contínuo, recebendo alimentação (Apêndice 2) e água *ad libitum*, permanecendo sempre na mesma gaiola até o final do experimento.

2.3. MANIPULAÇÃO

A manipulação das gaiolas foi sempre realizada pelo mesmo técnico de laboratório, treinado especialmente para esta função. Utilizava calçados, avental e luvas próprios e realizava a higienização das gaiolas três vezes por semana.

2.4. DROGAS UTILIZADAS

Dietilnitrosamina

O carcinógeno empregado durante a pesquisa foi a dietilnitrosamina (DEN) (*Sigma Chemicals Co., St.Louis, USA*), com as seguintes características:

N-Nitrosodiethylamine - Sigma Química - 0756

Frasco com 100ml

Densidade: 0,95g/ml

Peso molecular: 102,1

Fórmula química: $C_4H_{10}N_2O$

Vitamina C

Vitamina C - EMS - Indústria Farmacêutica, Campinas, São Paulo

Ampola de 5ml, contendo 500mg

Fórmula química: $C_6H_8O_6$

2.5. MATERIAIS UTILIZADOS NO TRANSCORRER DO EXPERIMENTO

Os animais permaneciam em sala específica, de 6m², do biotério do NMCE, com ventilação e fluxo de ar contínuos, iluminação em ciclo claro/escuro, exaustão e aquecimento. As gaiolas eram colocadas em prateleiras metálicas. Os materiais usados para alimentação, oferecimento das soluções e pesagem dos animais foram:

Bebedouro plástico para roedores com capacidade para 500ml;

Ração específica para roedores (Apêndice 2);

Água potável e filtrada da rede de abastecimento da UNICAMP;

Balança analítica de precisão;

Para preparo e conservação das soluções foram usados:

Capela de exaustão;

Micropipeta, *Finnpipette* (Finlândia) e *Eppendorf* (Alemanha)

Pipetas de vidro;

Microampola (tubos Eppendorf);

Copo de *Becker* graduado;

Balão volumétrico;

Geladeira;

pHmetro;

Papel alumínio;

Para limpeza e conservação do biotério e das gaiolas foram necessários

Hipoclorito de sódio e quaternário de amônia para desinfecção;

Sabão em pó de pH neutro;

Vassoura;

Escova.

2.6. MATERIAIS UTILIZADOS PARA O SACRIFÍCIO

Decorrido o tempo de experiência, os animais foram sacrificados com éter e então colocados em prancha de madeira, sendo nesta etapa necessários os seguintes materiais:

Cuba de vidro;

Éter etílico;

Pinça anatômica com e sem dente;

Pinça de *Kelly*;

Tesoura de *Mayo*;

Tesoura de *Metzemaun* delicada;

Sonda de polietileno n.º 4;

Prancha com fixadores elásticos para colocação dos animais;

Gaze e algodão;

Sacos de lixo.

2.7. MATERIAIS UTILIZADOS NA ANÁLISE MACROSCÓPICA

Os materiais utilizados na análise macroscópica foram:

Luminária de tipo Ramsor com capacidade de aumento real de 10 vezes;

Solução de lugol 2% para coloração;

Madeira compensada para fixação da peça cirúrgica;

Alfinetes para esticar a peça cirúrgica;

Campo azul;

Etiquetas para identificação;

2.8. MATERIAIS UTILIZADOS NA ANÁLISE MICROSCÓPICA

Os materiais utilizados na análise microscópica foram:

Navalha de secção Leica 858, para secção das peças;

Cápsula de plástico para acondicionamento das peças;

Processador automático histotécnico (Autotécnico- Ultra III);

Auto inclusor Leica EG 1160

Blocos de parafina *paraplastic*;

Micrótomo (*American Optical Co.*);

Lâminas e lamínulas;

Material para coloração com hematoxilina e eosina (HE);

Microscópio ótico convencional;

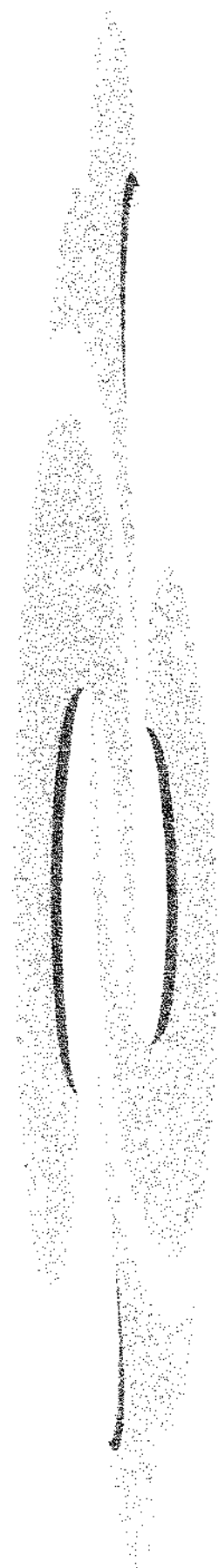
Formol;

Álcool;

Xilol;

Etiquetas para identificação;

Caixas para colocação das lâminas.



3. METODOLOGIA

3.1. GRUPOS DE ANIMAIS

Os animais foram colocados em gaiolas com cinco ratos em cada, sendo divididos em grupos de 10, segundo a droga ou drogas que iriam receber e o tempo de observação (T) (Tabela 5 e 6).

Tabela 5: Grupos de animais e tempo de observação

Tempo de observação (DIAS)	GRUPO					
	I	II	III	IV	V	VI
90	10	10	10	10	10	10
120	10	10	10	10	10	10
150	10	10	10	10	10	10
180	10	10	10	10	10	10
TOTAL DE ANIMAIS	40	40	40	40	40	40
240						

Tabela 6: Grupos de animais e drogas utilizadas

GRUPO	DROGAS
I	Controle, somente água
II	Vitamina C todos os dias da semana
III	DEN 3 dias por semana e água nos outros 4 dias
IV	Vitamina C em 4 dias da semana, alternando com DEN nos outros 3 dias
V	Vitamina C e DEN juntos no mesmo frasco, 3 dias por semana e água nos outros 4 dias da semana
VI	Vitamina C e DEN juntos no mesmo frasco, 3 dias por semana e apenas vitamina C nos outros 4 dias da semana

3.2. PREPARO DA SOLUÇÃO

A solução de DEN era preparada com água potável filtrada da rede de abastecimento da UNICAMP, manipulada em capela própria por bióloga treinada, utilizando luvas, máscara e pipeta automática de alta precisão (*Finnpipette ou Eppendorf*, 0-50µl). Esses cuidados são necessários pois o DEN é um carcinógeno volátil, altamente tóxico, podendo ser absorvido por inalação ou contato direto com a pele.

Para obter a dose desejada de DEN (10mg/kg peso, 40µl de DEN em 1000ml de água) foram considerados o peso médio dos animais de 155g, a densidade da droga (0,95g/ml) e a média diária de ingestão de água pelo animal (30-40ml) (Apêndices 3 e 4). Os 40µl de DEN eram acondicionados em microampolas de vidro, envoltas em papel alumínio, protegidas da luz e colocadas em geladeira a 4°C, evitando desestabilização química do carcinógeno.

A solução de vitamina C era preparada do mesmo modo, usando dose de 1290mg/kg peso/dia ou 200mg/animal/dia (Apêndices 3 e 4).

3.3. ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS

Devido a sua alta toxicidade, a DEN foi administrada três dias por semana (sexta-feira, sábado e domingo), evitando-se desta forma a morte dos animais por seus efeitos tóxicos.

Após diluídas, as drogas eram colocadas à disposição dos animais como única fonte de ingestão hídrica.

3.4. ALIMENTAÇÃO

Todos os animais foram alimentados com ração para roedores usada no biotério do CEMIB (Apêndice 2), *ad libitum*, trocada uma vez por semana.

3.5. OBSERVAÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais eram observados diariamente. O volume de DEN e o de vitamina C ingeridos por gaiola eram medidos todos os dias.

O peso inicial (PI) foi obtido no princípio do ensaio e o peso final (PF), quando o animal era sacrificado. Além disso, eram pesados uma vez por mês.

Os volumes ingeridos de água e soluções, expressos em ml, eram calculados de forma a determinar o volume médio ingerido diariamente por cada animal (VMDA); e o volume médio ingerido diariamente por grupo (VMDG).

3.6. 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, era introduzida uma sonda de polietileno fina, por via oral, até o estômago. Em seguida, procedia-se à ressecção da parede abdominal anterior e do gradeado costal direito e esquerdo até a região mentoniana, com tesoura de *Mayo*, com ampla exposição das cavidades abdominal e torácica e da região cervical, identificando-se no estômago a sonda orogástrica previamente posicionada.

Tracionando-se o estômago, era iniciada sua dissecação, liberando-se a grande curvatura, o ligamento gastroesplênico e a pequena curvatura (ligamento hepatogástrico). O estômago era seccionado em sua transição com o duodeno. Após secção do diafragma e liberação do esôfago do hiato diafragmático, progredia-se cranialmente pelo mediastino posterior. Enquanto isso, a sonda orogástrica facilitava na orientação da dissecação das estruturas vizinhas do esôfago, sem lesar a sua parede. Após a dissecação do esôfago cervical, era realizada a secção do órgão, junto à faringe.

A peça, incluindo esôfago e estômago, era retirada em monobloco e lavada em soro fisiológico. Encontrando-se tumores associados, estes também eram ressecados para posterior estudo histológico.

3.7. ANÁLISE MACROSCÓPICA

Após a obtenção do esôfago e do estômago, realizava-se a abertura do estômago pela grande curvatura, desde o piloro até a cárdia. A sonda era fixada na extremidade proximal do esôfago, com fio de polipropileno 5.0, permitindo então a eversão total do órgão. Com o esôfago evertido, era possível a análise macroscópica inicial, no sentido de identificar eventuais alterações e orientar a abertura do órgão, sem incluir na linha de secção, as alterações macroscopicamente visíveis.

Procedia-se a seguir, a análise macroscópica a fresco das lesões esofágicas, classificando-as conforme os critérios da escola japonesa (*GUIDELINES FOR THE CLINICAL AND PATHOLOGIC STUDIES ON CARCINOMA OF THE ESOPHAGUS BY JAPANESE SOCIETY FOR ESOPHAGEAL DISEASES, 1976*) (Figuras 3 e 4):

A1) 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

A2) 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)



Lesão elevada - Ip



Lesão elevada - Ipl



Lesão elevada - Isep



Lesão levemente elevada - Ila



Lesão plana - Ilb



Lesão levemente deprimida - Ilc



Lesão deprimida - III

Figura 3: Esquema para classificação macroscópica das lesões superficiais

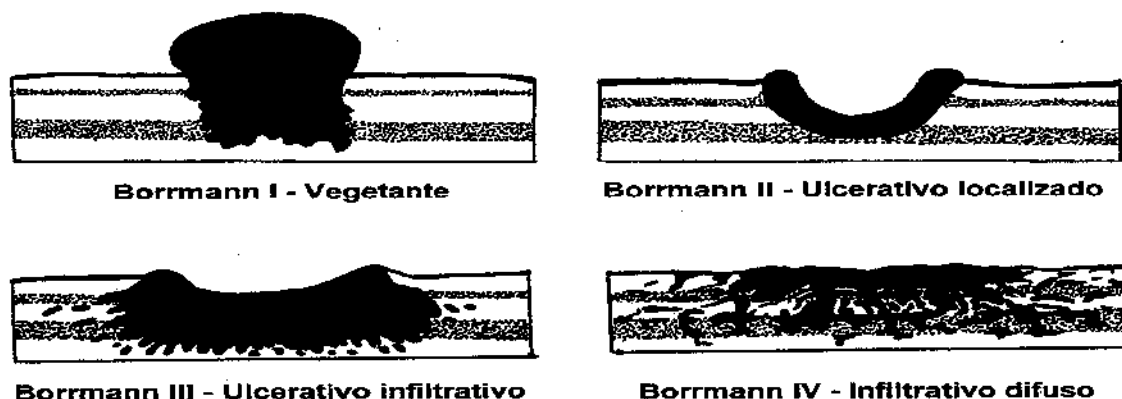


Figura 4 : Esquema para classificação macroscópica das lesões infiltrativas

A seguir, o conjunto esôfago e estômago era submergido em solução de lugol a 2%, por um período de 30 segundos. Após secagem da peça, por um minuto, procedia-se à análise da extensão da mucosa esofágica corada, considerando-se lugol negativo as áreas não coradas. Toda a análise macroscópica a fresco e após coloração com lugol, era descrita separadamente para cada animal, indicando-se a gaiola e o tempo de exposição às drogas.

3.8. ANÁLISE MICROSCÓPICA

Após a coloração com lugol a 2%, as peças eram fixadas com alfinetes, em madeira compensada, de modo a manter o esôfago estirado. O segmento esofagogástrico era imerso inicialmente em formol 10% por 24 horas e, após, em álcool 70% por 72 horas.

A preparação dos cortes a serem enviados para histologia seguiu padronização da escola japonesa (*GUIDELINES FOR THE CLINICAL AND PATHOLOGIC STUDIES ON CARCINOMA OF THE ESOPHAGUS BY JAPANESE SOCIETY FOR ESOPHAGEAL DISEASES, 1976*), realizando-se corte longitudinal, paralelo ao maior eixo esofágico, e dois cortes transversais, dividindo o esôfago em terço superior, terço médio e terço inferior. Com isso, obtinham-se seis fragmentos, numerados de um a seis, a partir do fragmento proximal para o distal (Figura 5).

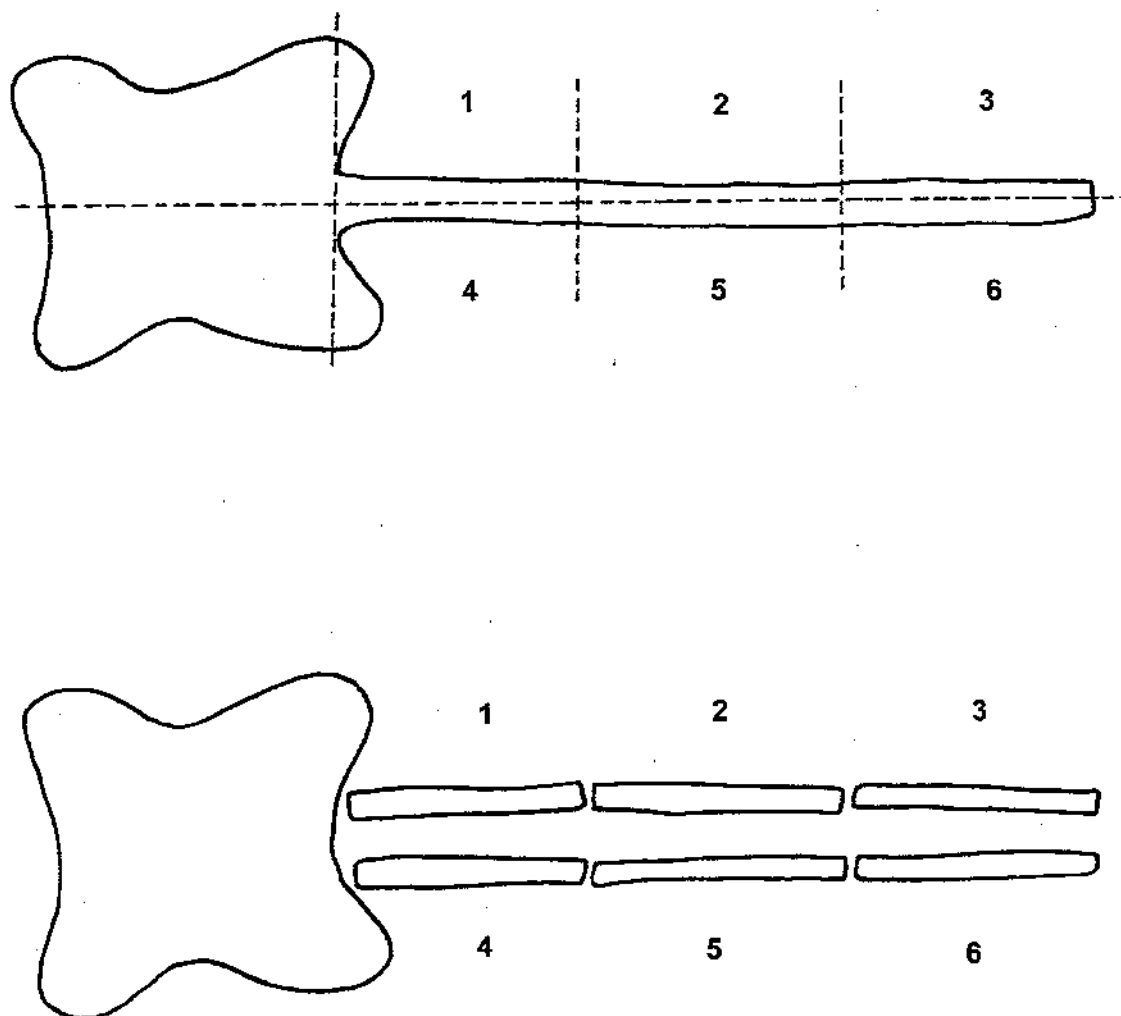


Figura 5: Corte do esôfago em fragmentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6

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

Após a inclusão em blocos de parafina, cada fragmento era cortado aleatoriamente com micrótomo em seis níveis de profundidade, com espessura de 3μ , designados de A,B,C,D,E e F. Os cortes eram fixados em lâminas, desparafinizados em estufa e xilol, desidratados em álcool e corados pela hematoxilina-eosina (HE).

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

O exame microscópico classificou as lesões de acordo com sua natureza. As neoplasias foram classificadas, segundo o nível de invasão das camadas da parede esofágica, conforme a escola japonesa (*GUIDELINES FOR THE CLINICAL AND PATHOLOGIC STUDIES ON CARCINOMA OF THE ESOPHAGUS BY JAPANESE SOCIETY FOR ESOPHAGEAL DISEASES, 1976*) (Figura 6), em:

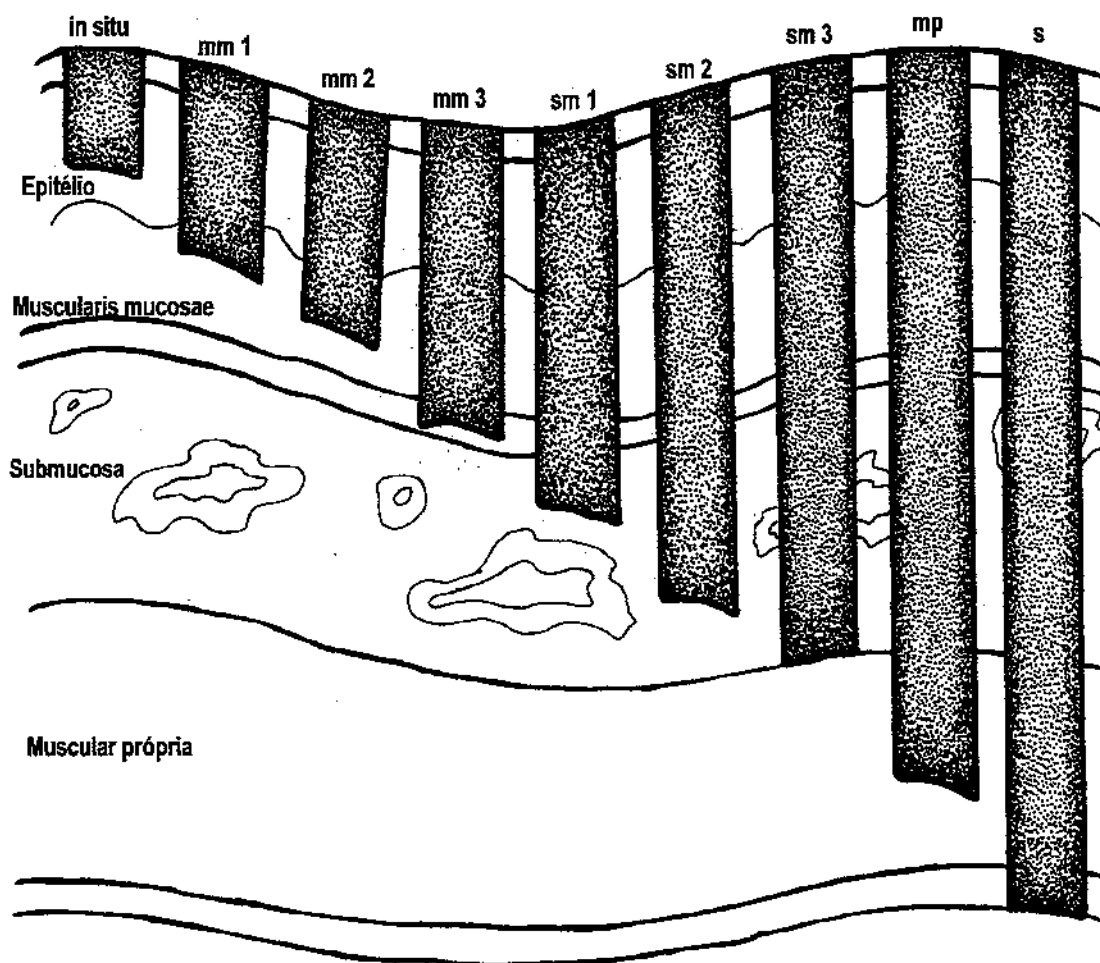


Figura 6 - Esquema para a avaliação microscópica das lesões, segundo a escola japonesa

I - Carcinoma *In situ* - todas as lesões restritas ao epitélio (intra-epiteliais).

II - Carcinoma microinvasivo - todas as lesões que invadiam até a lâmina própria e, por sua vez, subdividas em três outros níveis:

mm1 - junto à membrana basal.

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

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

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

sm1 - superficial.

sm2 - intermediário.

sm3 - quando havia contato com a camada muscular própria.

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

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os objetivos da análise estatística foram: comparar o ganho de peso entre os seis grupos em cada T; no T180 comparar o número de tumores macroscópicos e microscópicos entre os grupos (III, IV, V e VI); e, comparar as proporções de acantólise e papiloma entre os grupos.

Para análise estatística dos resultados foi utilizada a seguinte metodologia, com nível de significância de 0,05:

- a) ANOVA (análise de variância)
- b) Teste de Duncan
- c) Teste de Kruskal-Wallis
- d) Teste de Dunn
- e) Teste Exato de Fisher
- f) *Box-Plot*

4. RESULTADOS

4.1. EVOLUÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS

Para a avaliação da evolução ponderal dos animais foram levados em conta:

PI - peso inicial, verificado no momento em que eram colocados nas gaiolas e iniciava-se a administração das drogas;

PF - peso final, obtido momentos antes do sacrifício;

Δ - diferença entre o peso final e o inicial.

Estes dados foram coletados individualmente para cada animal. Dessa maneira obteve-se PI, PF e Δ , para cada animal, em cada grupo, nos diferentes momentos de sacrifício. Com estes números foram feitas as médias simples dos PI, PF e Δ de cada grupo nos tempos de sacrifício, conforme o que está demonstrado nas Tabelas 21, 22, 23, 24, 25 e 26, no Apêndice 5, na linha correspondente à média.

A partir destes dados foi confeccionada tabela utilizando-se apenas a média geral da evolução de peso ($\Delta = PF - PI$), valor em vermelho nas tabelas 21, 22, 23, 24, 25 e 26 do Apêndice 5, de cada grupo em cada momento diferente de sacrifício (Tabela 7).

Tabela 7: Média da evolução dos pesos ($\Delta=PF-PI$) de cada grupo em relação ao tempo de observação

TEMPO						
GRUPO	90	120	150	180	S	M
I	207	264	323	390	1184	296
II	203	267	326	401	1197	299
III	126	101	110	132	469	118
IV	116	131	147	142	536	134
V	152	166	174	196	688	172
VI	198	205	226	253	882	220

*Peso em gramas

S – Soma total dos Δ

M – Média dos Δ

Assim, foram obtidos $\Delta 90$, $\Delta 120$, $\Delta 150$ e $\Delta 180$ dos grupos I, II, III, IV, V e VI respectivamente. Os valores de $\Delta 90$, $\Delta 120$, $\Delta 150$ e $\Delta 180$ de cada grupo foram somados, resultando em um valor S (somatório da evolução de peso, de cada tempo de sacrifício dos grupos). Por sua vez, cada S foi dividido por quatro, pois eram quatro tempos de sacrifício diferentes, resultando em um valor M, considerado a média de evolução de peso dos animais em cada grupo (Tabela 7). Estes valores foram:

Grupo I: 296 gramas;

Grupo II: 299 gramas;

Grupo III: 118 gramas;

Grupo IV: 134 gramas;

Grupo V: 172 gramas;

Grupo VI: 220 gramas.

No Gráfico 1 pode-se observar a distribuição destes mesmos números.

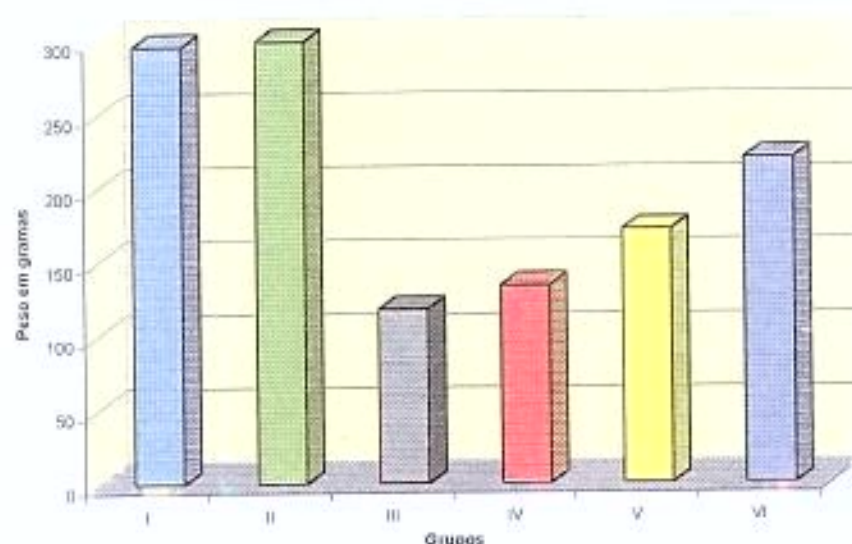


Gráfico 1 - Média da evolução de ganho de peso dos animais em cada grupo

Assim, os dois grupos com maior ganho de peso foram I e II, seguidos pelo VI. Os de menor ganho foram V, IV e III na ordem. Portanto os animais que tomaram apenas água e vitamina C tiveram a melhor evolução ponderal, enquanto o grupo que só recebeu DEN apresentou o menor ganho de peso.

4.2. AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE ÁGUA E SOLUÇÕES INGERIDAS

A água e as soluções com vitamina C, com DEN, ou com ambas, eram colocadas em bebedouros graduados com capacidade para 500ml. Diariamente era aferido o volume ingerido pelo grupo (VDG). Este número era dividido por 10, estabelecendo-se o volume diário ingerido por animal (VDA). Assim, somando-se todos os VDG de cada grupo e dividindo-se pelo número de dias em cada tempo de sacrifício, encontrava-se o volume médio diário ingerido por grupo (VMDG), que dividido por 10, resultava no volume médio diário por animal (VMDA) de cada grupo, em cada momento diferente de sacrifício (Tabela 8).

Tabela 8 - Volume de solução ingerida em relação ao tempo de observação

TEMPO	90		120		150		180	
GRUPO	VMDG	VMDA	VMDG	VMDA	VMDG	VMDA	VMDG	VMDA
I	323	32,3	348	34,8	321	32,1	315	31,5
II	298	29,8	327	32,7	331	33,1	319	31,9
III	282	28,2	274	27,4	280	28,0	144	14,4
IV	298	29,8	300	30,0	292	29,2	298	29,8
V	292	29,2	304	30,4	280	28,0	300	30,0
VI	285	28,5	310	31,0	291	29,1	295	29,5

* em ml

VMDG – Volume médio diário do grupo

VMDA – Volume médio diário por animal

Nos Gráficos 2, 3, 4 e 5 pode-se observar o VMDA de cada grupo, nos diferentes momentos de sacrifício. Em todos os T os grupos com maiores volumes ingeridos, foram os de apenas água ou de solução de vitamina C. O grupo com menor volume ingerido foi o de DEN. Os outros grupos apresentaram valores intermediários.

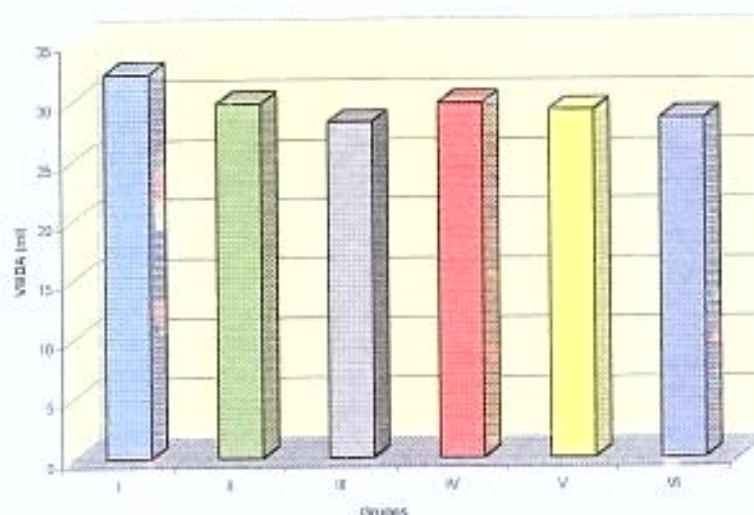


Gráfico 2 - VMDA em T90 de cada grupo

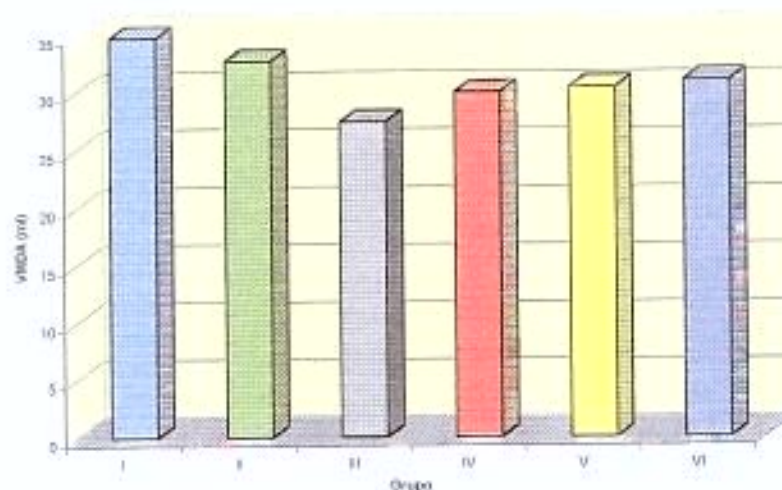


Gráfico 3 - VMDA em T120 de cada grupo

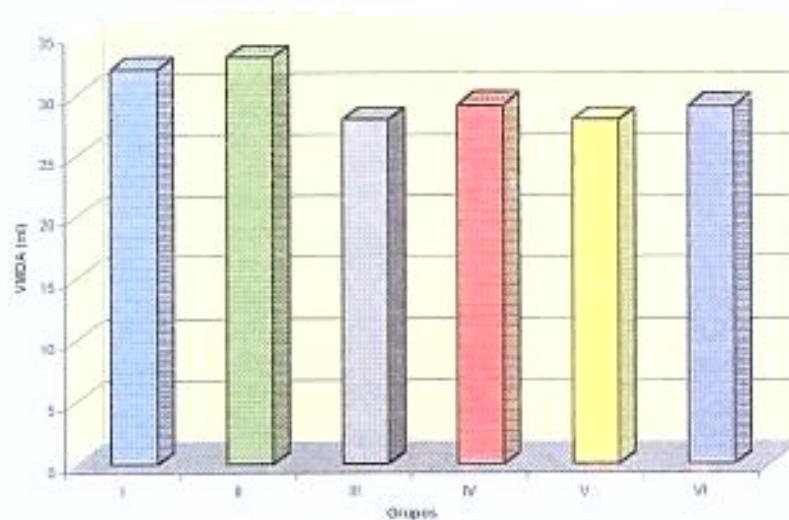


Gráfico 4 - VMDA em T150 de cada grupo

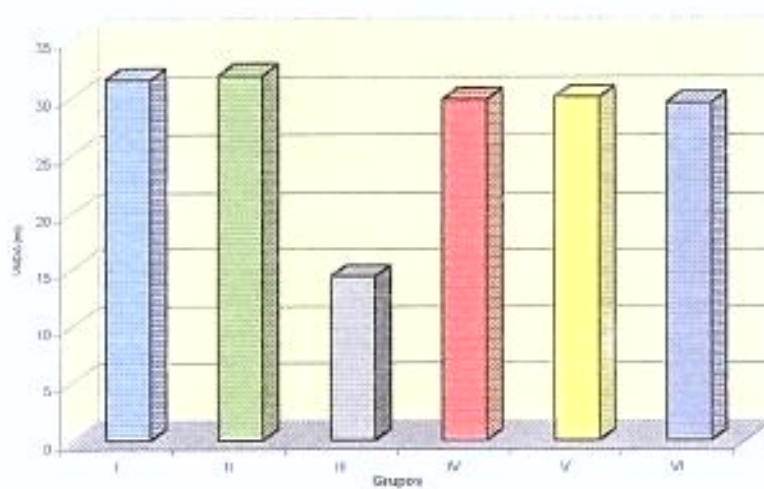


Gráfico 5 - VMDA em 180 de cada grupo

4.3. ANÁLISE MACROSCÓPICA

Nos grupos I e II não foi observada nenhuma lesão neoplásica, sendo o aspecto da mucosa normal em todos os tempos de observação (Figura 7).

Nos grupos III, IV, V e VI, nos T90 e T120, também não foi detectada nenhuma alteração macroscópica. As lesões encontradas, nestes grupos, em T150 e T180, serão descritas separadamente:

Tempo de observação: 150 dias

No grupo III foram observadas 10 lesões (1 lesão por animal), assim classificadas:

- Ip - 3 lesões - 30%;
- Ipl - 1 lesão - 10%;
- Ila - 5 lesões - 50%;
- Ilb - 1 lesão - 10%.

No grupo IV foram identificadas 7 lesões (0,7 lesão por animal), assim classificadas:

- Ip - 2 lesões - 28,5%;
- Ila - 3 lesões - 43%;
- Ilb - 2 lesões - 28,5%.

Nos grupos V e VI não foi diagnosticada nenhuma lesão.

Estes dados podem ser também observados na Tabela 9 e no Gráfico 6.

Tabela 9: Resultados da avaliação macroscópica, com número de lesões encontradas por grupo em T150

	GRUPOS			
	III	IV	V	VI
Lesões Superficiais				
Ip	3	2	0	0
Ipl	1	0	0	0
Isep	0	0	0	0
II a	5	3	0	0
II b	1	2	0	0
II c	0	0	0	0
III	0	0	0	0
Lesões Infiltrativas Borrmann				
I	0	0	0	0
II	0	0	0	0
III	0	0	0	0
IV	0	0	0	0
Total de Lesões	10	7	0	0
Total de Lesões por animal	1,0	0,7	0	0

*Nos grupos I e II não ocorreu nenhuma lesão

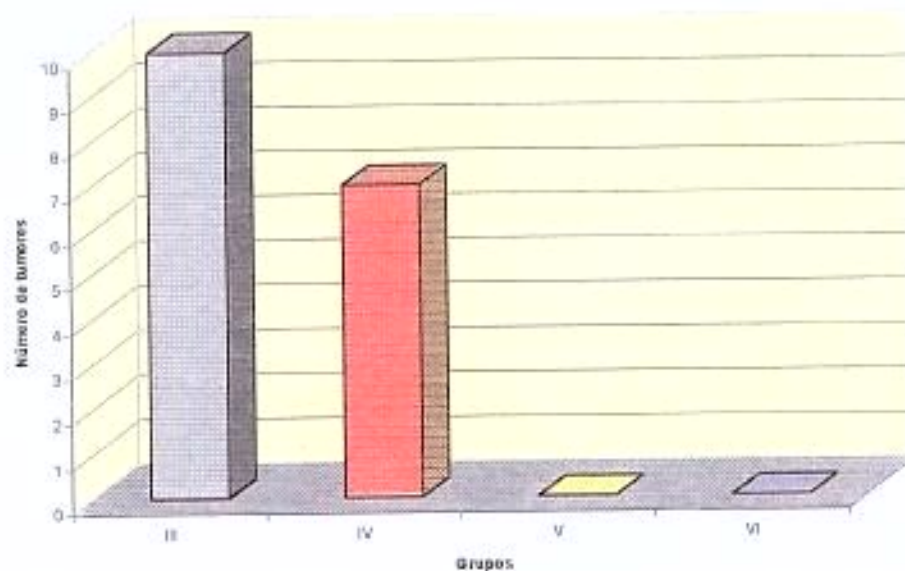


Gráfico 6 - Números Total de Tumores encontrados por grupo - Análise Macroscópica em T150

Tempo de observação: 180 dias

No grupo III foram observadas 48 lesões (4,8 lesões por animal), assim classificadas:

Ip - 14 lesões - 29,2% ;

Ipl - 8 lesões - 16,7%;

Ila - 14 lesões - 29,2%;

Ilb - 7 lesões - 14,6%;

Borrmann I - 4 lesões - 8,3%;

Borrmann II - 1 lesão - 2,1%.

No grupo IV foram encontradas 31 lesões (3,1 lesões por animal), assim classificadas:

Ip - 10 lesões - 32,3%;

Ipl - 4 lesões - 12,9%;

Ila - 10 lesões - 32,3%;

Ilb - 3 lesões - 9,7%;

Ilc - 1 lesão - 3,2%;

Borrmann I - 2 lesões - 6,5%;

Borrmann II - 1 lesão - 3,2%.

No grupo V foram identificadas 5 lesões (0,5 lesão por animal), assim classificadas:

I_p - 2 lesões - 40%;

I_{pl} - 1 lesão - 20%;

II_a - 2 lesões - 40%.

No grupo VI foi encontrada apenas uma lesão (II_b - 100%). Todos os dados podem ser observados na Tabela 10, no Gráfico 7 e nas Figuras 9, 11, 13 e 15.

Tabela 10: Resultados da avaliação macroscópica, com o número de lesões encontradas por grupo em T180

	GRUPOS			
	III	IV	V	VI
Lesões Superficiais				
I _p	14	10	2	0
I _{pl}	8	4	1	0
I _{sep}	0	0	0	0
II _a	14	10	2	0
II _b	7	3	0	1
II _c	0	1	0	0
III	0	0	0	0
Lesões Infiltrativas Borrmann				
I	4	2	0	0
II	1	1	0	0
III	0	0	0	0
IV	0	0	0	0
Total de Lesões	48	31	5	1
Total de Lesões por animal	4,8	3,1	0,5	0,1

*Nos grupos I e II ocorreu nenhuma lesão neoplásica

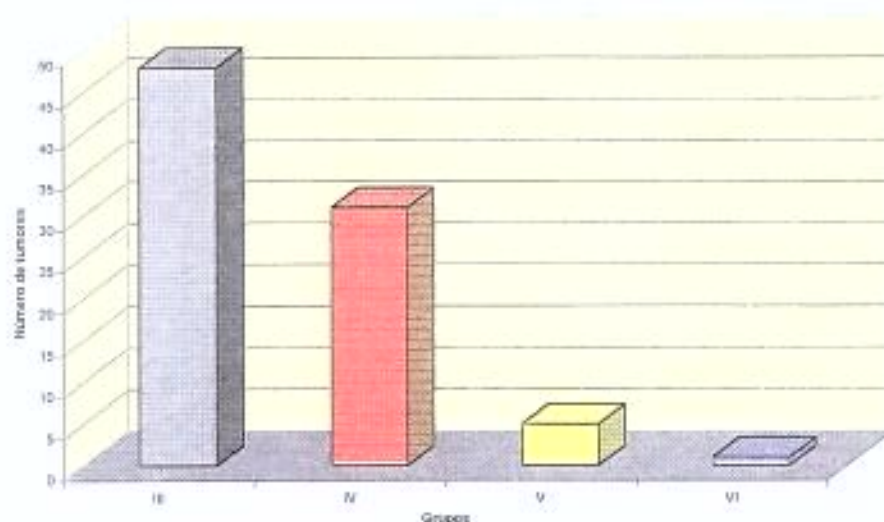


Gráfico 7 - Número Total de Tumores encontrados por grupo - Análise macroscópica em T180

4.4. ANÁLISE MICROSCÓPICA

No grupo I foi encontrada apenas hiperqueratose em dois animais (20%), em cada tempo de observação (Figura 8). No grupo II ocorreu hiperqueratose em dois casos (20%) em T150 e três (30%) em T180. Além disso, foram verificados dois casos de acantólise (20%) em T150 e em T180.

Nos grupos III, IV, V e VI, em T90 e T120, não foram encontradas lesões microscópicas. As lesões encontradas em T150 e T180 serão descritas separadamente.

Tempo de observação: 150 dias

No grupo III foram encontradas seis lesões neoplásicas (0,6 lesão por animal), assim classificadas:

in situ - 3 lesões - 50%;

mmI - 3 lesões - 50%;

outras lesões: acantólise: 5 casos - 50%.

No grupo VI foram identificadas cinco lesões neoplásicas (0,5 lesão por animal), assim classificadas:

in situ - 4 lesões - 80%;

mm1 - 1 lesão - 20%;

outras lesões: acantólise: 3 casos - 30%.

No grupo V ocorreu apenas um caso de acantólise (10%), e no grupo VI nenhuma lesão foi observada. Os resultados deste tempo de observação podem ser examinados na Tabela 11 e no Gráfico 8.

Tabela 11: Resultados da avaliação microscópica com número de lesões encontradas por grupo em T150

	GRUPOS			
	III	IV	V	VI
Carcinoma <i>in situ</i>	3	4	0	0
Carcinoma microinvasivo				
mm1	3	1	0	0
mm2	0	0	0	0
mm3	0	0	0	0
Carcinoma submucoso				
sm1	0	0	0	0
sm2	0	0	0	0
sm3	0	0	0	0
Carcinoma avançado	0	0	0	0
Total de Lesões	6	5	0	0
Total de Lesões por animal	0,6	0,5	0	0

*Nos grupos I e II não ocorreu nenhuma lesão neoplásica

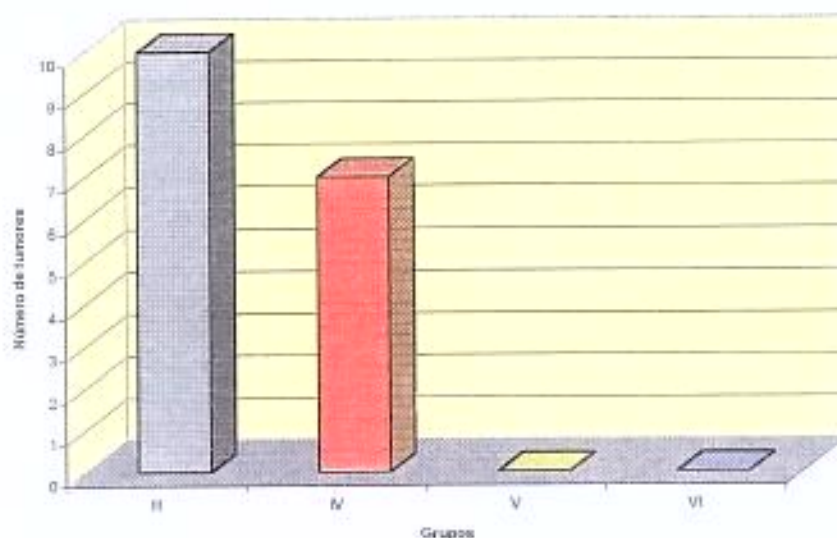


Gráfico 8 - Números Total de Tumores encontrados por grupo - Análise Microscópica em T150

Tempo de observação: 180 dias

No grupo III foram diagnosticadas 23 lesões neoplásicas (2,3 lesões por animal), assim classificadas:

- in situ* - 4 lesões - 17,4%;
- mm1 - 5 lesões - 21,7%;
- mm2 - 5 lesões - 21,7%;
- mm3 - 1 lesão - 4,3%;
- sm1 - 2 lesões - 8,7%;
- sm2 - 2 lesões - 8,7%;
- sm3 - 1 lesão - 4,3%;
- avançado - 3 lesões - 13,2%;
- outras lesões: papiloma - 8 casos (80%);
- acantólise - 6 casos (60%).

No grupo IV foram observadas 17 lesões neoplásicas (1,7 lesões por animal), assim classificadas:

in situ - 3 lesões - 17,6%;

mm1 - 7 lesões - 41,2%;

mm2 - 5 lesões - 29,4%;

sm1 - 1 lesão - 5,9%;

sm2 - 1 lesão - 5,9%;

outras lesões: papiloma - 4 casos (40%) - 0,4 lesão por animal;

acantólise - 4 casos (40%) - 0,4 lesão por animal.

No grupo V foram identificadas três lesões neoplásicas (0,3 lesão por animal), todas mm1 (100%). Outras lesões encontradas foram:

papiloma - 2 casos (20%);

acantólise - 2 casos (20%).

No grupo VI foi verificada apenas uma lesão neoplásica *in situ* (100%) (0,1 lesão por animal). Estes resultados podem ser observados na Tabela 12, no Gráfico 9 e nas Figuras 10, 12, 14 e 16.

Tabela 12: Resultados da avaliação microscópica com o número de lesões encontradas por grupo em T180

	GRUPOS			
	III	IV	V	VI
Carcinoma in situ	4	3	0	1
Carcinoma microinvasivo				
mm1	5	7	3	0
mm2	5	5	0	0
mm3	1	0	0	0
Carcinoma submucoso				
sm1	2	1	0	0
sm2	2	1	0	0
sm3	1	0	0	0
Carcinoma avançado	3	0	0	0
Total de Lesões	23	17	3	1
Total de Lesões por animal	2,3	1,7	0,3	0,1

*Nos grupos I e II não ocorreu nenhuma lesão neoplásica

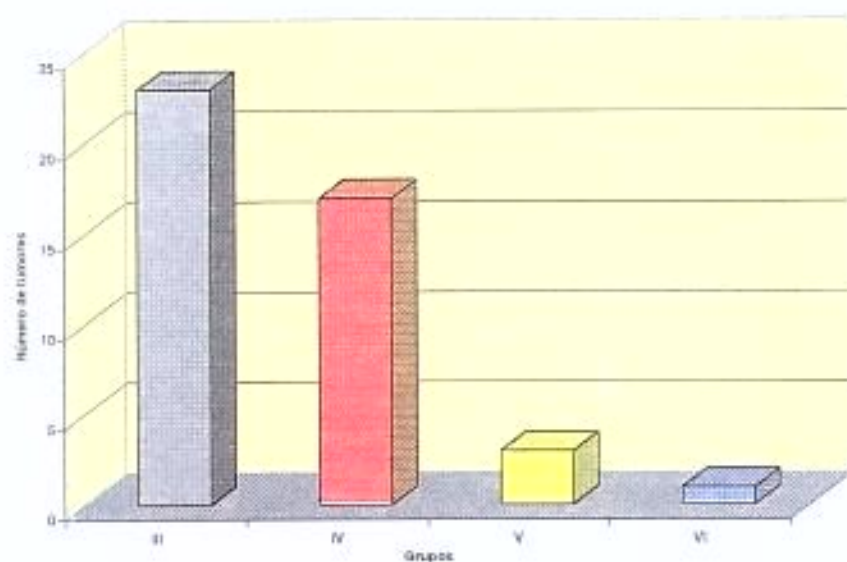


Gráfico 9 - Número Total de Tumores encontrados por grupo - Análise microscópica em T180

Nos gráficos 10, 11, pode ser observado o número de lesões neoplásicas por animal.

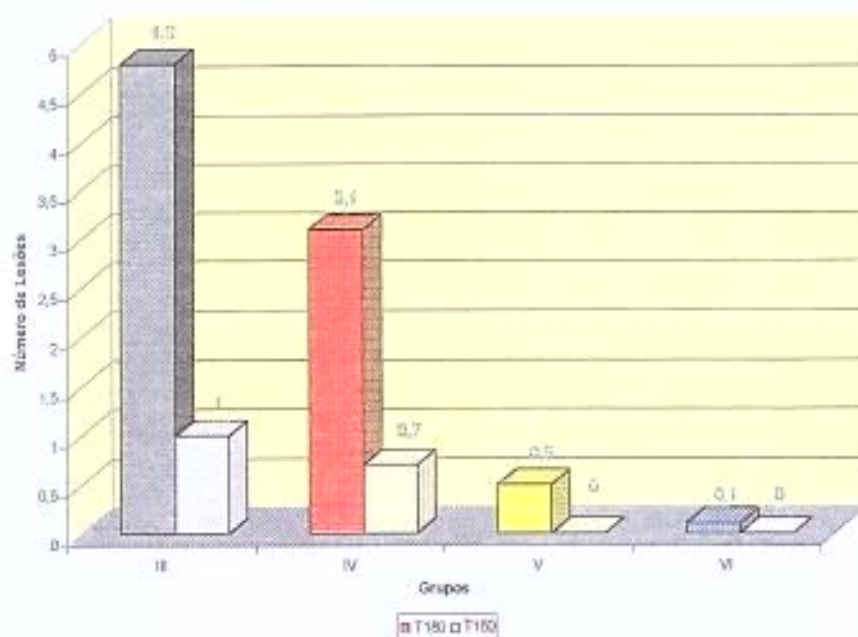


Gráfico 10 - Lesões Neoplásicas por Animal - Avaliação Microscópica em T180 e T150

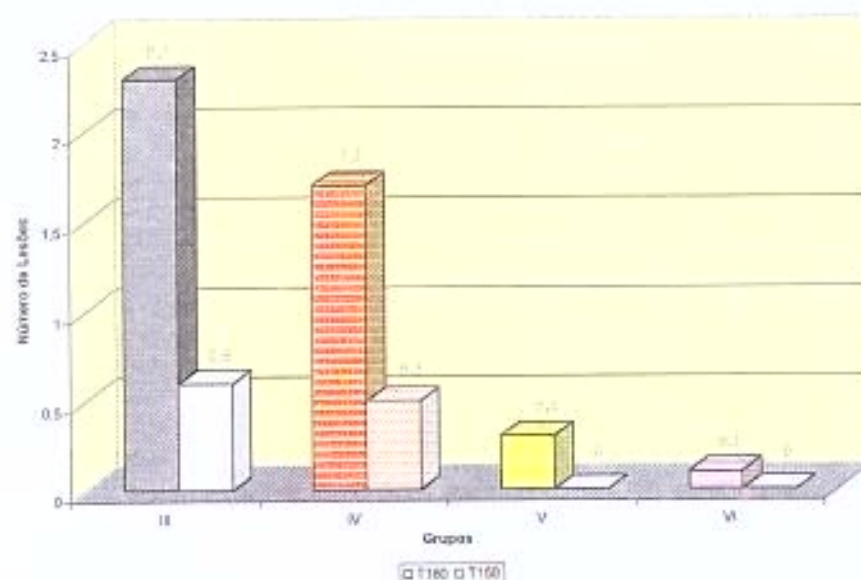


Gráfico 11 - Lesões Neoplásicas por Animal - Avaliação Microscópica em T180 e T150

Nos gráficos 12 e 13 está demonstrado o número e distribuição por grupo das outras lesões encontradas: acantólise e papiloma.

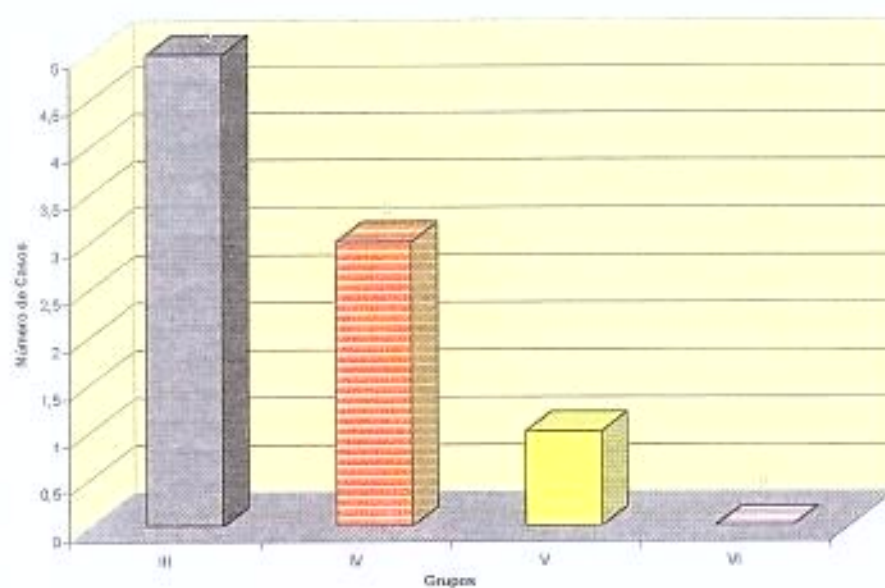


Gráfico 12 - Número de Casos de Acantólise por Grupo em T150

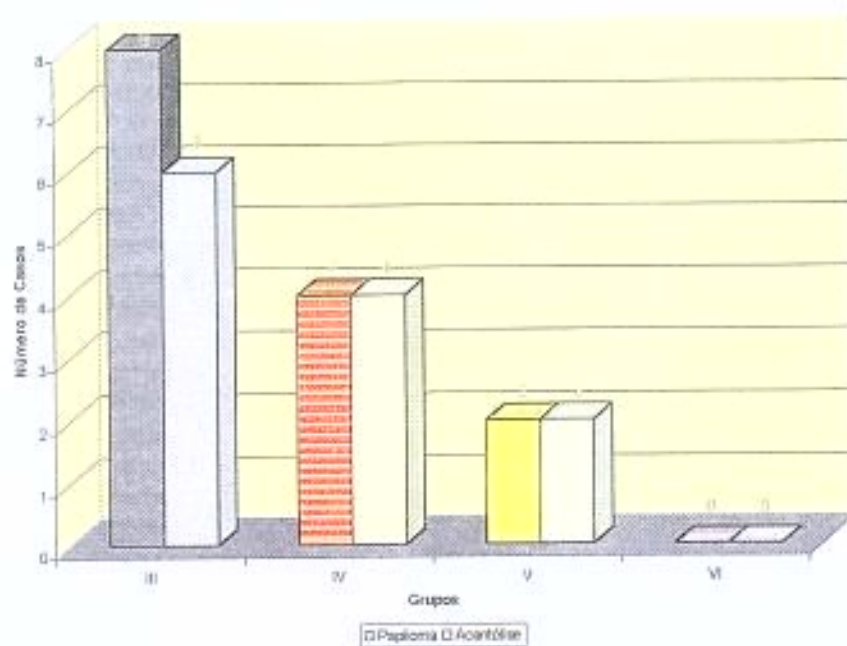


Gráfico 13 - Número de Casos de Papiloma e Acanthosis por Grupo em T180



Figura 7: Esôfago normal - avaliação macroscópica - Grupo I T150

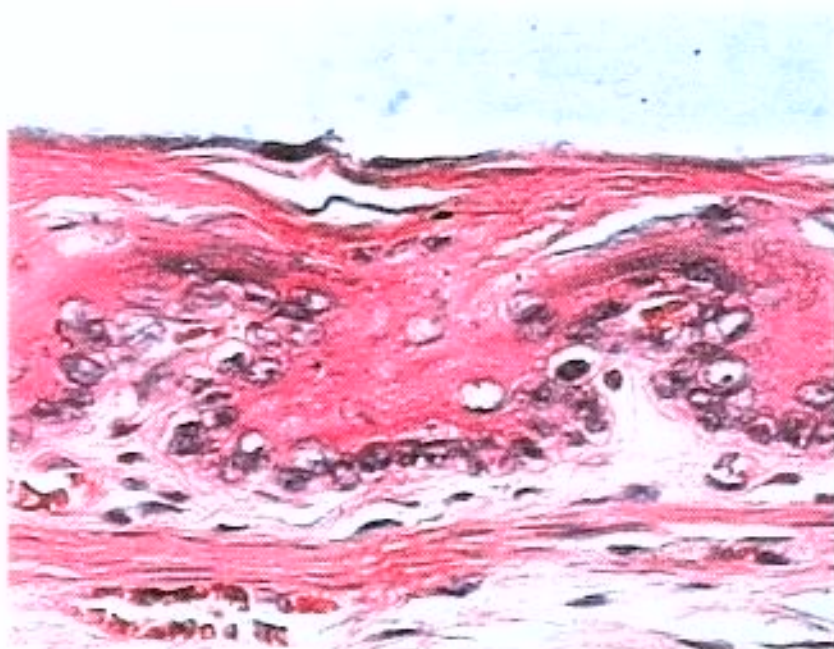


Figura 8: Esôfago normal - avaliação microscópica - grupo I T150



Figura 9: Avaliação macroscópica de peça do grupo III T180

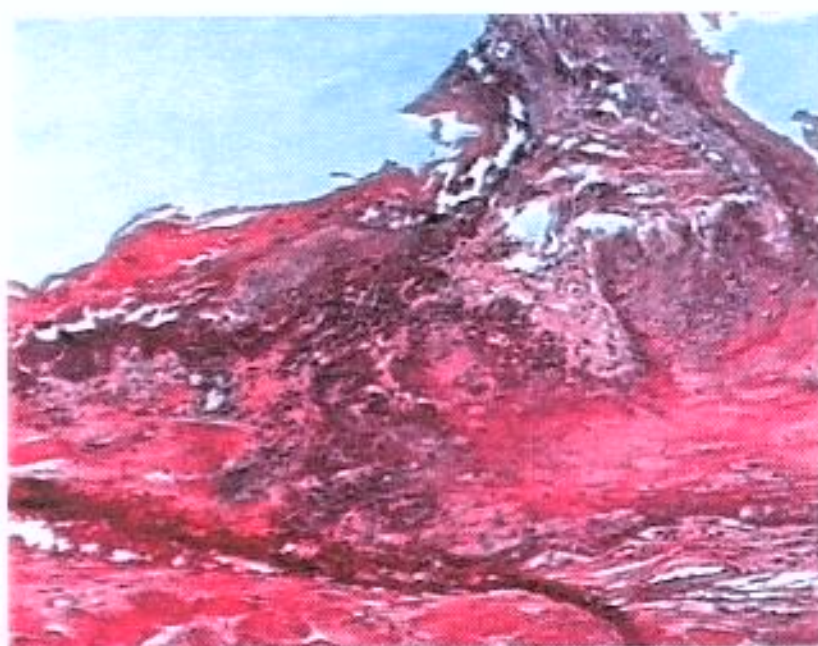


Figura 10: Avaliação microscópica - grupo III T180

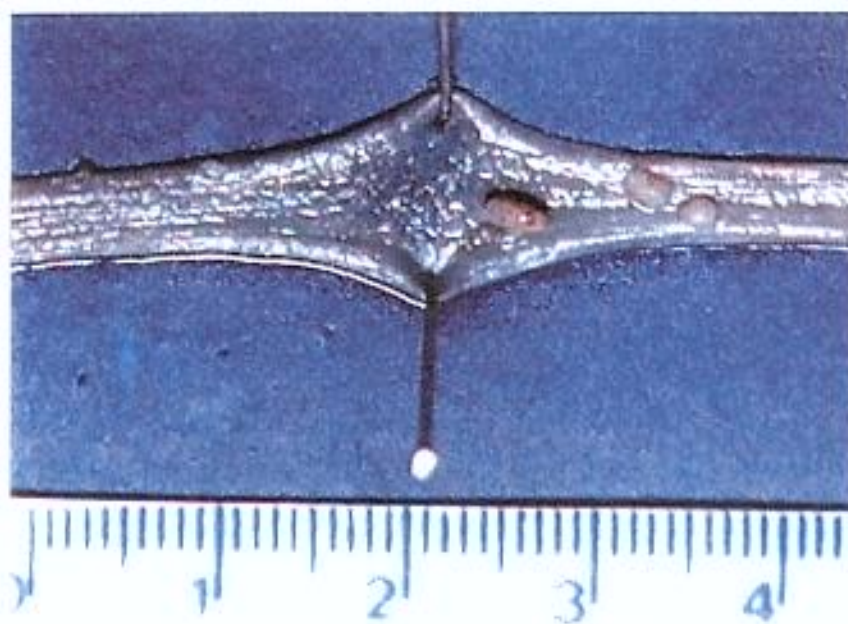


Figura 11: Avaliação macroscópica de peça do grupo IV T180



Figura 12: Avaliação microscópica - grupo IV T180

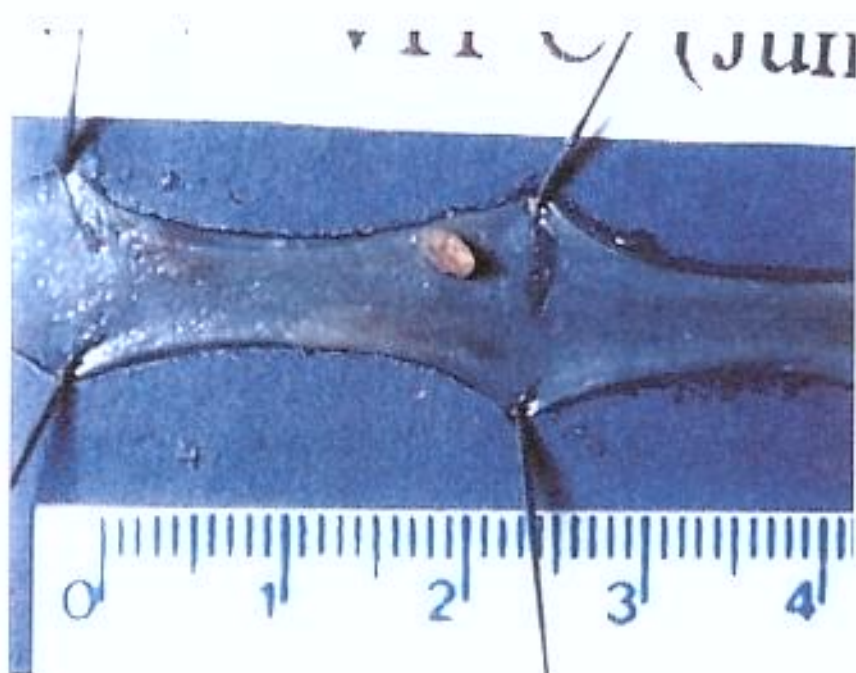


Figura 13: Avaliação macroscópica de peça do grupo V T180

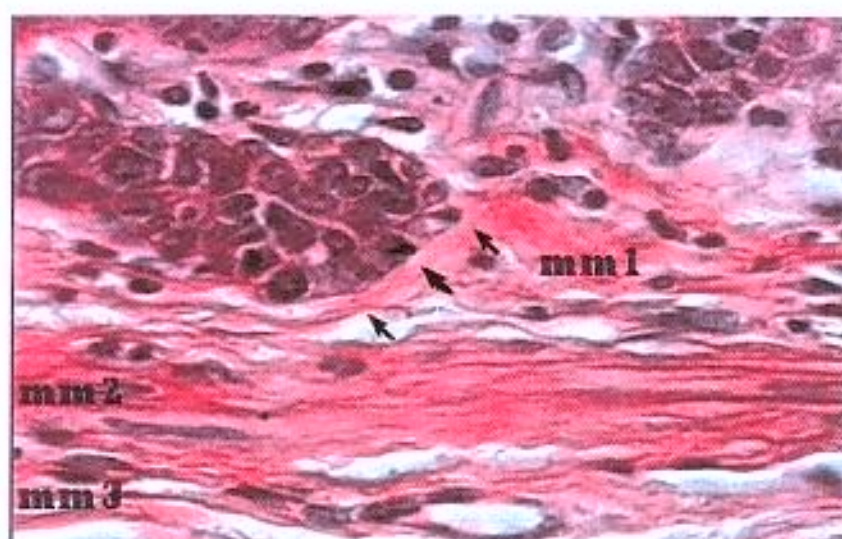


Figura 14: Avaliação microscópica - grupo V T180



Figura 15: Avaliação macroscópica de peça do grupo VI T180

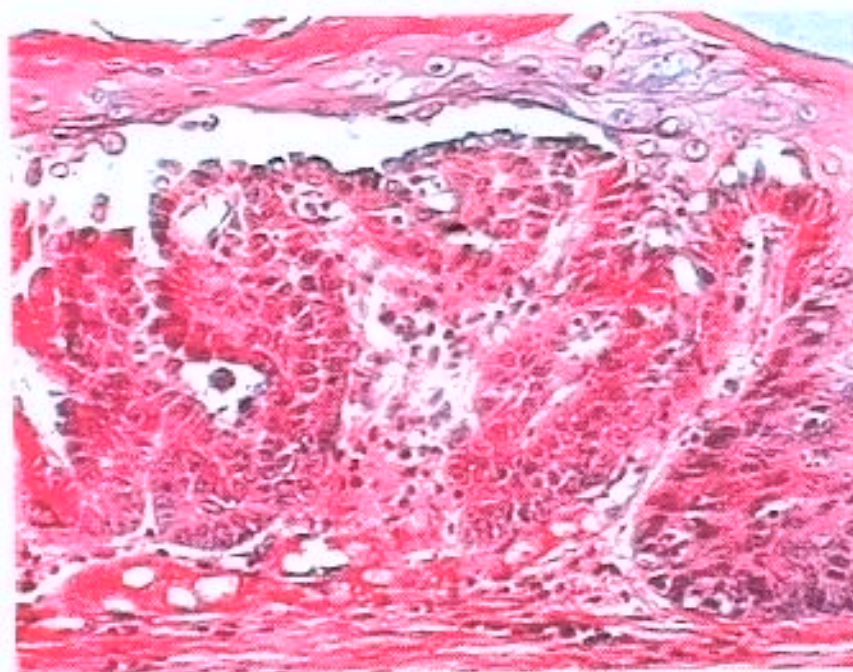


Figura 16: Avaliação microscópica - grupo VI T180

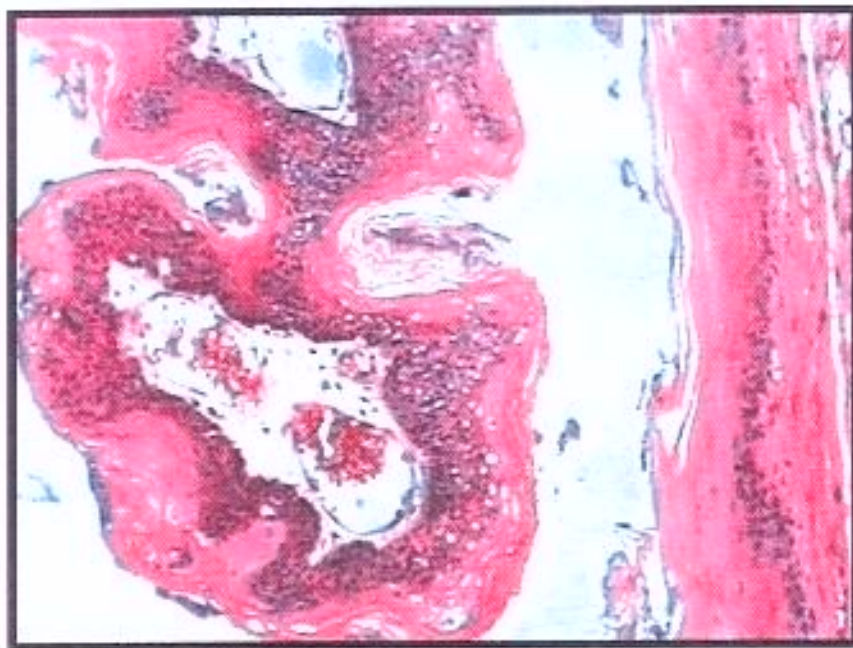


Figura 17: Papiloma - avaliação microscópica

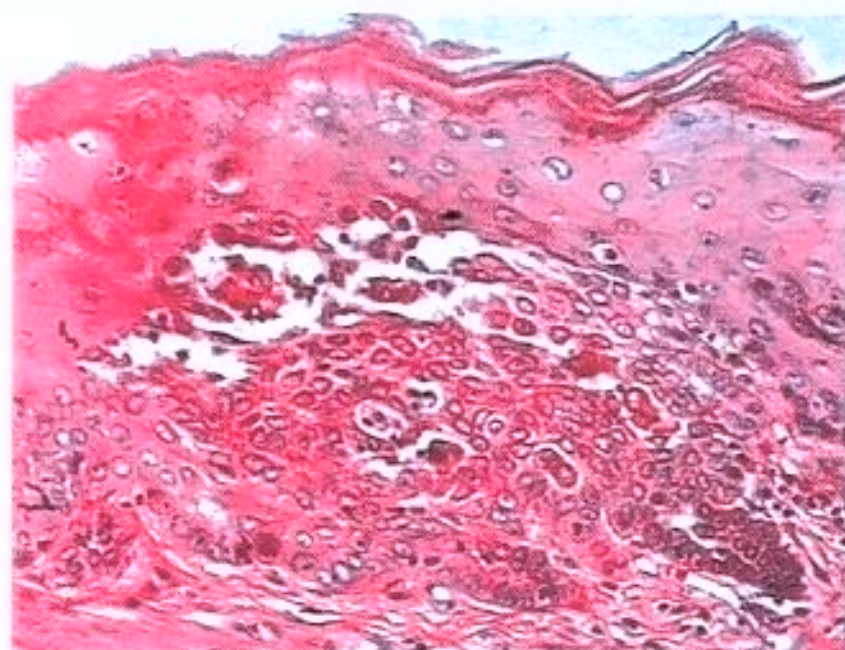


Figura 18: Acanbólise - avaliação microscópica

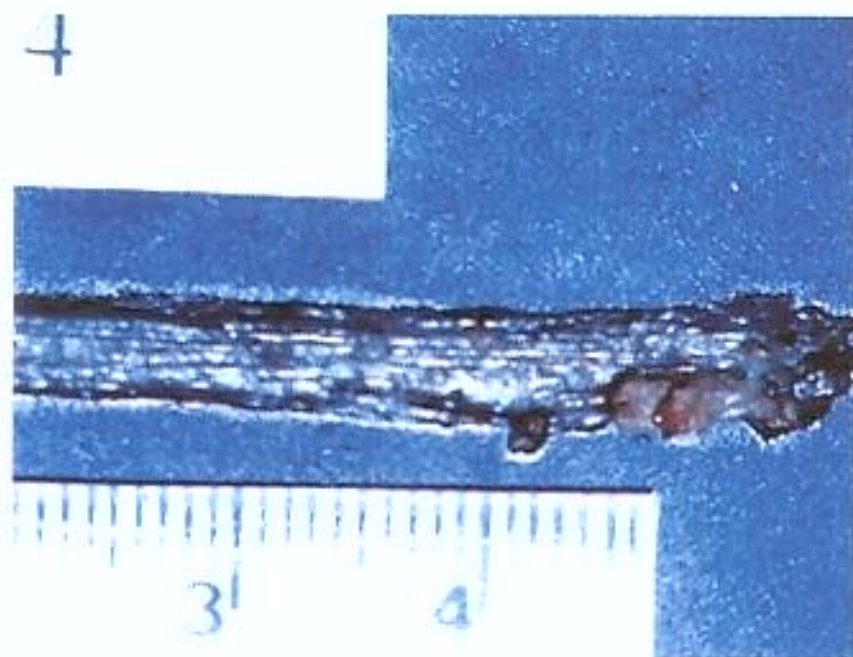


Figura 19: Esôfago do grupo III - a fresco



Figura 20: Esôfago da figura anterior corado com lugol

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.5.1. Avaliação do ganho de peso

Para a comparação do ganho de peso entre os grupos, foi utilizada a ANOVA, seguida de comparações múltiplas pelo teste de Duncan, (Tabela 13).

Tabela 13: Análise de variância para o ganho de peso

Tempo	GL	F	p - valor	Grupos diferentes
90	5	22,64	0,0001	I II VI V III IV
120	5	128,47	0,0001	II I VI V IV III
150	5	172,11	0,0001	II I VI V IV III
180	5	192,18	0,0001	II I VI V IV III

Grupos com mesmas cores não apresentam evidência de diferença

Houve diferença significativa de ganho de peso entre os grupos. O grupo III, em todos os tempos, foi o de menor ganho ponderal, enquanto os grupos I e II tiveram sempre o mesmo e melhor desempenho ponderal. Dos grupos que receberam associação de vitamina C e DEN, o grupo VI foi o que apresentou maior aumento de peso (Gráfico 14).

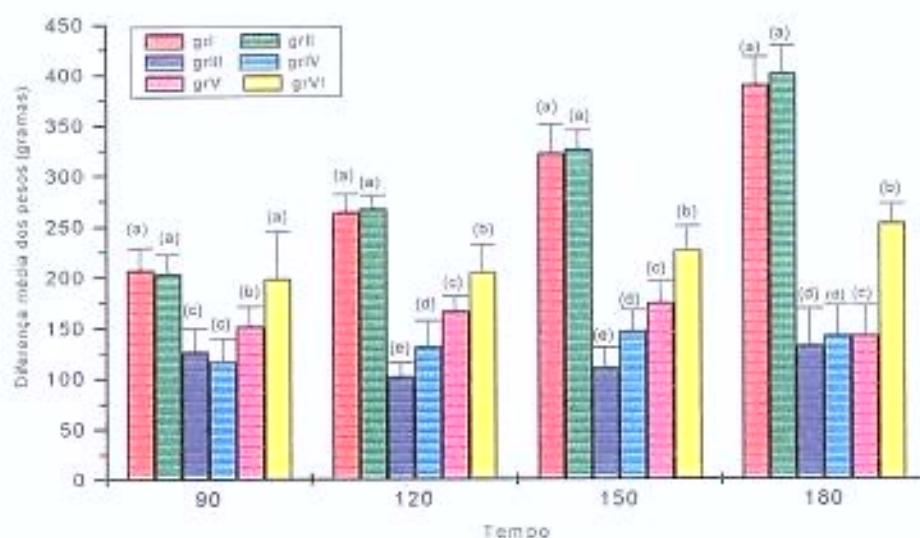


Gráfico 14: Média e desvio-padrão da diferença de peso em cada T. Os grupos com a mesma letra não apresentam evidências de diferença.

4.5.2. Avaliação do número de tumores

O teste de KRUSKAL-WALLIS (Análise de variância não-paramétrica), seguido de comparações múltiplas pelo teste de DUNN, foi aplicado na comparação do número de tumores e o teste exato de FISCHER para comparação das proporções (Tabela 14).

Tabela 14: Níveis de significância do Teste de Kruskal-Wallis para o número de tumores em T180

	p - VALOR	GRUPOS DIFERENTES
Avaliação macroscópica	0,0001	III-V, III-VI, IV-V, IV-VI
Avaliação microscópica	0,0001	III-V, III-VI, IV-VI

Houve diferença significativa, quanto ao número de tumores, entre os grupos, III, V e VI. Entre os grupos III e IV não houve diferença significativa (Gráfico 15 e 16).

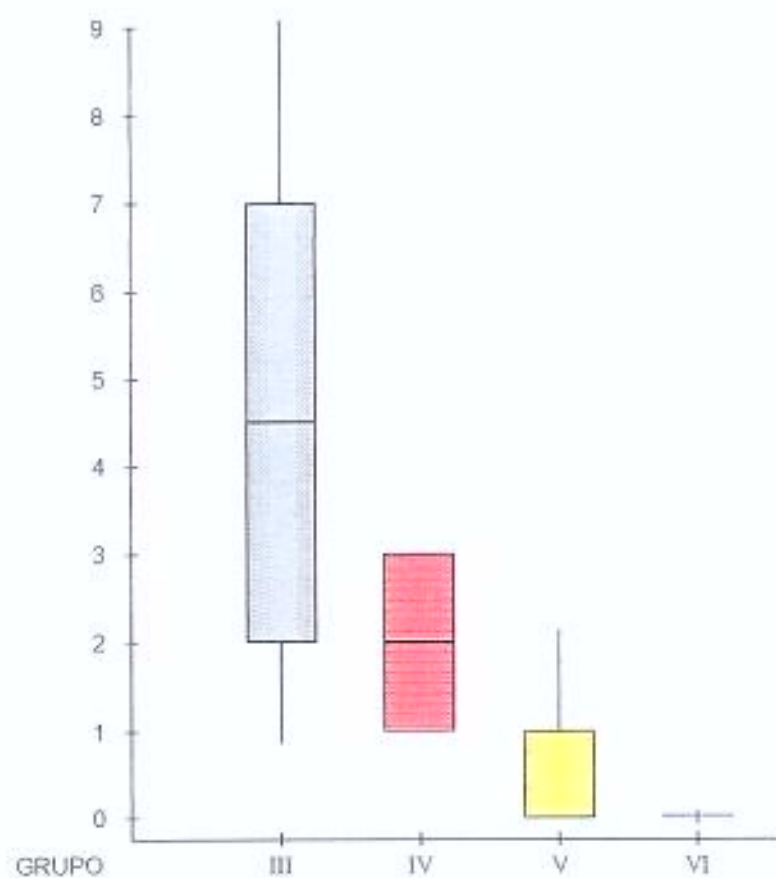


Gráfico 15: Distribuição gráfica por *Box-Plot* para o número de tumores no T180 em cada grupo na avaliação macroscópica

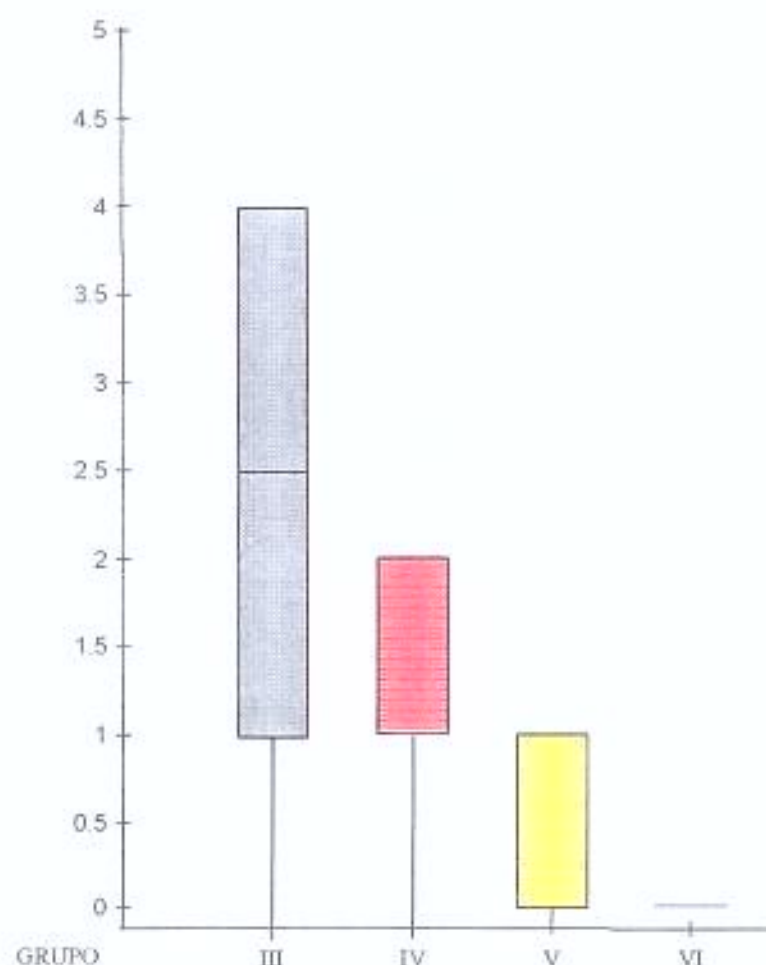


Gráfico 16: Distribuição gráfica por *Box-Plot* para o número de tumores em T180 na avaliação microscópica

4.5.3. Avaliação da ocorrência de acantólise e papiloma

Aplicando o Teste Exato de Fischer (Bicaudal) em T150 e T180, pode-se observar diferença significativa entre os grupos para acantólise ou para papiloma, com ocorrência aumentada no grupo III.

5. DISCUSSÃO

5.1. GENERALIDADES

A vitamina C tem sido utilizada em altas doses, mostrando eficiência no tratamento de uma grande variedade de doenças. Estes efeitos, embora ainda não completamente explicados, físico e farmacologicamente já podem ser melhor entendidos e com certeza vão muito além do esperado para uma simples vitamina. Como antioxidante, a vitamina C doa elétrons com alta concentração energética para neutralizar radicais livres, tornando-se desidroascorbato. Este, por sua vez, novamente recebe mais elétrons, sendo novamente reduzido a vitamina C, para ser reutilizado (CATHCART, 1991). KLENNER (1948; 1949; 1971; 1974) demonstrou que a maioria das doenças virais pode ser curada com o uso de vitamina C por via endovenosa, em doses de até 200g por dia. PAULING (1970) após cuidadosa revisão da literatura, estudou a utilização de vitamina C para tratamento de resfriado e gripe. Mais tarde, da associação de PAULING & CAMERON (CAMERON & PAULING, 1979; CAMERON *et al.*, 1979) resultou a proposta de sua utilização para terapêutica do câncer. CATHCART (1991) observou uma incrível tolerância do intestino delgado ao ácido ascórbico administrado por via oral, quando o indivíduo está doente. Comprovou que doses anteriormente não suportadas sem produzir diarreia, eram adequadamente aceitas, até mesmo em quantidades bem maiores, quando o mesmo indivíduo estava doente. Também demonstrou a rápida melhora de viroses com altas doses de vitamina C (15 a 200g por dia).

A poluição ambiental global tem aumentado muito nos últimos anos, principalmente como resultado do crescimento da atividade industrial e da economia em todo o mundo uma das consequências disso é uma maior poluição do ar e da água, o uso excessivo de pesticidas, a alimentação inadequada e um ritmo de vida em geral não saudável, com sedentarismo e hábitos indesejáveis, como tabagismo e etilismo, por exemplo. Como resultado direto, ocorre o aumento do número de mutações e consequentemente do risco de aparecimento de câncer. Na tentativa de diminuição deste risco, muitos produtos têm sido propostos. Entre eles as vitaminas, e em especial, o ácido ascórbico, têm recebido destaque.

A inibição da mutagenicidade pela vitamina C já é bem conhecida (RAHIMTULA *et al.*, 1977; GUTTENPLAN, 1978; ROSIN & STICH, 1979; KALLISTRATOS & FASSKE, 1980; KHUDOLEY *et al.*, 1981; DION *et al.*, 1982; BHATTACHARYA *et al.*, 1984; NORKUS & KUENZIG, 1985; O'CONNOR *et al.*, 1985; RAINA & GURTOO, 1985; TERWEL & VAN DER HOEVEN, 1985; KURODA, 1986; ALZIEU *et al.*, 1987; KURODA, 1987; FRANCIS *et al.*, 1989; KURODA, 1990). É interessante sugerir que um dos possíveis mecanismos de ação da vitamina C na inibição da mutagenicidade seria relacionada às reações de oxidação e redução, inibindo a atuação de carcinógenos e radicais livres.

Na literatura pode ser observado que as nitrosaminas já foram utilizadas para induzir câncer em diversos órgãos como: fígado, pulmão, estômago, rim, bexiga, sistema nervoso, mama, nasofaringe, cólon, pele e esôfago. Vários estudos avaliaram a eficiência da vitamina C com agente inibidor ou protetor de carcinogênese em diversos órgãos, porém nenhum deles avaliou seu efeito sobre o esôfago, sendo esta pesquisa pioneira nesta área.

5.2. CARCINOGÊNESE PELAS NITROSAMINAS

O entendimento da carcinogênese é fundamental para a criação de mecanismos eficientes que busquem a adequada abordagem do câncer, seu tratamento e sua prevenção.

As nitrosaminas, juntamente com a aflatoxina, são os mais potentes indutores químicos de tumores conhecidos (GRICIUTE, 1978; MEDHAT *et al.*, 1991).

Aproximadamente 300 tipos de nitrosaminas já foram descritas como capazes de induzir câncer em cerca de 30 espécies diferentes de animais. Embora efetivamente a capacidade das nitrosaminas de induzirem câncer também no homem não tenha sido cientificamente comprovada, todos os dados bioquímicos disponíveis de estudos experimentais em mamíferos, indicam que estes compostos também sejam carcinogênicos para este (DRUCKREY *et al.*, 1967; BOGOVSKI & BOGOVSKI, 1981; PREUSSMANN & STEWART, 1981; LIJINSKY, 1987; PETO *et al.*, 1991; LIJINSKY, 1992).

Praticamente todos os órgãos são passíveis de indução de tumores pelas nitrosaminas. No aparelho digestivo, esôfago, estômago e fígado são os mais estudados, não apenas pela facilidade, como também pelo fato de que várias são as drogas capazes de induzir carcinogênese nestes órgãos. O estômago operado também tem sido objeto de inúmeras pesquisas experimentais, no sentido de se demonstrar que pacientes gastrectomizados, a longo prazo, têm maior probabilidade de surgimento de carcinoma no coto gástrico remanescente (BARTSCH *et al.*, 1989; ANDREOLLO, 1994).

Alguns fatores são bem conhecidos em relação à carcinogênese pelas nitrosaminas:

a) existe uma suscetibilidade específica para cada espécie e também seletividade para determinados órgãos, de acordo com a estrutura química da nitrosamina e com a dose e o tempo de administração. Tumores de fígado, esôfago, pulmão, nasofaringe, bexiga e paraestômago são comuns em ratos. Já nos *hamsters*, o esôfago, por exemplo, que é um dos órgãos mais afetados no rato, não desenvolve tumor. Em contraste, o pâncreas do *hamster* é muito mais suscetível que o do rato. Assim, a nitrosometilbenzilamina e a DEN são muito utilizadas na indução de câncer de esôfago em ratos; nitrosobisoxopropilamina para câncer de pâncreas em *Syrian golden hamster*; nitrosobutilhidroxibutilamina para câncer de bexiga em ratos e metilnitrosaminobutano para câncer de pulmão em ratos (DRUCKREY *et al.*, 1967; PREUSSMANN & STEWART, 1981; LIJINSKY, 1987; 1992);

b) independente da via de administração, oral, venosa, subcutânea ou inalatória, os sítios de indução de tumor serão os mesmos (DRUCKREY *et al.*, 1967; PREUSSMANN & STEWART, 1981);

c) as nitrosaminas são substâncias extremamente tóxicas, sendo que algumas são capazes de induzir tumor com doses extremamente baixas. Doses de 1ppm levam à formação de tumor de fígado em cerca de 25% dos animais, enquanto que com 0,1ppm este número cai para 2,5%, mostrando uma relação linear (HECHT, 1997).

As nitrosaminas ocorrem no ambiente e também podem ser formadas endogenamente, necessitando ativação metabólica para apresentarem atuação carcinogénica, causando, então lesão ao *DNA* e consequentemente câncer.

Existem três mecanismos principais para prevenção da carcinogénese pelas nitrosaminas: evitar o contato com nitrosaminas pré-formadas, prevenção da nitrosação endógena e bloqueio bioquímico da atuação das nitrosaminas (HECHT, 1997).

A facilidade com que o homem pode entrar em contato com os compostos nitrosos, quer por via endógena, quer exógena, tem despertado muita preocupação. Assim, o desenvolvimento de métodos analíticos que pudessem quantificar as nitrosaminas tornou-se muito necessário e importante, culminando com o *Thermal Energy Analyzer*. Este método baseia-se na ruptura da ligação N-N=O e consequente análise por cromatografia a gás, e tem sido amplamente utilizado em todo o mundo (FINE & ROUNBEHLER, 1975; OHSHIMA & BARTSCH, 1981).

A exposição exógena a nitrosaminas pré-formadas pode ocorrer de diversas formas:

a) Dietética: o uso de nitrito como conservante e estabilizante dos alimentos é uma prática bastante comum em todo o mundo, sendo usado principalmente em carnes curadas, defumadas e peixes. Com o entendimento e a divulgação dos efeitos nocivos das nitrosaminas como conservantes, têm sido realizadas campanhas em nível mundial para diminuição de seu uso indiscriminado. Em alguns países já existe legislação obrigando ao uso de antioxidantes, como o ácido ascórbico, em produtos com nitrito. Isto levou ao longo dos últimos vinte anos a uma queda substancial do teor de nitrito na alimentação de em torno de 100ppb para 10ppb. As principais nitrosaminas utilizadas atualmente na preservação de alimentos são a nitrosodimetilamina e a nitrosopirrolidina (HOTCHKISS, 1989). Além de carnes, peixes, aves e toucinho (*bacon*) outros tipos de alimentos que usualmente apresentam nitrosaminas são queijo, cerveja, bebidas alcoólicas, leite e derivados. Como resultado das campanhas para redução de uso, o consumo diário de nitrosaminas em países desenvolvidos caiu para aproximadamente 1µg por indivíduo (BARTSCH & SPIEGELHALDER, 1996).

b) Ocupacional: ocorre principalmente relacionada as indústrias de borracha, plástico, couro e metalurgia. As nitrosaminas mais comuns neste tipo de contaminação são a nitrosodimetilamina, a nitrosodietilamina, a nitrosomorfolina, a nitrosopiperidina e a nitrosodietanolamina. Nas empresas a contaminação ocorre principalmente pelo ar (TRICKER *et al.*, 1989; SPIEGELHALDER & WACKER, 1994; BARTSCH & SPIEGELHALDER, 1996; REH & FAJEN, 1996).

c) Tabagismo: no total 23 diferentes tipos de nitrosaminas já foram identificadas e processadas no cigarro, sendo que ele é a maior fonte de contaminação exógena no homem. As nitrosaminas podem ser encontradas no fumo na ordem de 2 a 20 ng/cigarro, e este valor tem aumentado nos últimos anos. A formação das nitrosaminas no cigarro ocorre pela cura e nitrosação da nicotina durante o processamento do tabaco (HOFFMANN & HECHT, 1985; HECHT & HOFFMANN, 1988; HECHT & HOFFMANN, 1989; HOFFMANN *et al.*, 1994).

d) Cosméticos: mais de 8000 tipos de matérias-primas são usadas na preparação de cosméticos e muitas delas têm nitrosaminas como contaminante, conservante ou produto ativo. A nitrosamina mais comum nos cosméticos é a nitrosodietanolamina, podendo ser encontrada em concentrações de até 3000ppb em alguns produtos (HAVERY & CHOU, 1994).

e) Produtos químicos, farmacêuticos e agrotóxicos: embora a presença de compostos nitrosados em remédios seja rara, o maior risco ocorre no consumo de drogas com aminas secundárias ou terciárias, que poderão sofrer nitrosação intragástrica. Um exemplo disto é o analgésico aminopirina. A presença de nitrosaminas em pesticidas e herbicidas normalmente reflete contaminação, quer na preparação dos produtos por uso de material inadequado ou de má qualidade, quer no armazenamento, pois os nitritos são usados para preservação do metal dos contêineres contra ferrugem (TRICKER *et al.*, 1989; BARTSCH & SPIEGELHALDER, 1996).

A formação endógena de nitrosaminas ocorre pela nitrosação de aminas pelo nitrito, em meio ácido ou facilitado por bactérias, ou ainda pela reação com óxido nítrico formado durante inflamação ou infecção (HECHT, 1997). Nitrosaminas podem ser

prontamente formadas no meio ácido do estômago, existindo porém outros mecanismos de origem. A ativação dos macrófagos durante processos inflamatórios irá resultar no aparecimento de óxido nítrico. Este, por sua vez, reage com oxigênio, sendo que esta reação pode resultar em nitrosação de aminas (LEAF *et al.*, 1989; LIU *et al.*, 1991). Bactérias presentes em processos infecciosos também podem catalizar a nitrosação de aminas (BARTSCH & SPIEGELHALDER, 1996). Utilizando-se nitrosoprolina, que não é carcinogênica, vários estudos têm demonstrado a formação endógena de nitrosaminas, a partir da administração de nitrato e prolina. Nesses mesmos estudos foi verificado que o ácido ascórbico pode inibir esta reação (MARLETTA, 1988; MIRVISH *et al.*, 1993; BARTSCH & SPIEGELHALDER, 1996). Utilizando-se o teste da nitrosoprolina, a exposição aumentada aos compostos nitrosos tem sido demonstrada em grupos sujeitos a risco elevado de câncer de estômago, esôfago, cavidade oral, nasofaringe e pulmão (BARTSCH & SPIEGELHALDER, 1996).

Neste estudo, o composto nitrosado utilizado para a indução de câncer esofágico foi a dietilnitrosamina - DEN - *n*-nitrosodiethylamine, peso molecular 102,1, constituída de um radical nitroso ligado a quatro átomos de carbono e dez de hidrogênio. Esta substância é conhecida há mais de 30 anos por sua capacidade de formar tumores (DRUCKREY, 1961), sendo utilizada mundialmente com este objetivo. É uma dialquilnitrosamina simétrica, considerada um carcinógeno completo, capaz de produzir neoplasias em vários órgãos de diversos animais, com predileção para o sistema respiratório, digestivo alto, fígado e rins, dependendo de dose e tempo de administração. O uso da DEN, na produção de carcinoma esofágico de camundongos, foi primeiramente realizado por CLAPP & CRAIG, em 1967, obtendo 18% de tumores em um período de seis meses de exposição à droga. SCHMÄHL & HAMPERL (1961) determinaram a dose letal de administração de DEN em ratos: 210mg/kg. Os animais morriam três a 14 dias após receberem a droga, devido a necrose e hemorragia de fígado e pulmão.

A demonstração de que o tratamento com a DEN causa carcinoma esofágico e hepático, levou a suspeita inicial de ação carcinogênica direta da droga, no caso dos tumores esofágicos, ou que um intermediário alquilante poderia ser produzido localmente e não ser necessariamente resultante de metabolização hepática (CLAPP & CRAIG, 1967).

Esta segunda hipótese tem sido melhor aceita, parecendo que o esôfago possui capacidade bioquímica de produzir o carcinógeno propriamente dito (BAKER, 1974). Assim, tanto o esôfago quanto o fígado, poderiam atuar metabolicamente sobre a DEN, para formar o carcinógeno ativo. Estudos posteriores demonstraram correlação entre dose e tempo de administração da DEN e sítio de indução do tumor. Doses altas, em curto período de tempo, levariam à formação de tumor de fígado, enquanto doses baixas, por tempo prolongado, originariam tumor de esôfago (PETO *et al.*, 1991).

Quando se analisa o volume de soluções ingerido durante o experimento, observa-se que inicialmente em T90, este é muito semelhante em todos os grupos. Porém, à medida que o tempo vai transcorrendo, formam-se, de acordo com a quantidade ingerida, três grupamentos diferentes, que vão se tornando cada vez mais distintos, conforme aumenta o T. Assim, o maior volume ingerido ocorre nos grupos I e II, enquanto o menor, acontece no grupo III. Os grupos IV, V e VI aparecem com valores intermediários.

Duas explicações podem ser aventadas para isto. A primeira, é relacionada ao sabor da solução. Desde o início do experimento fica claro que o rato não tolera bem o sabor da solução com DEN, e que a vitamina C de alguma forma poderia melhorar este sabor, fazendo com que os animais aceitassem melhor a solução com DEN e vitamina C no mesmo frasco. Porém, conforme aumenta o T, os ratos vão tomando cada vez menos a solução de DEN, podendo aqui ter influência também, o aparecimento dos tumores, levando o animal à apresentar disfagia.

A análise do ganho de peso também tem aspectos interessantes. Os grupos I e II sempre foram semelhantes, com o maior aumento ponderal durante a pesquisa. O grupo III teve o pior desempenho, com valor semelhante ao do grupo IV. Os grupos V e VI apresentaram valores intermediários. Para entender o baixo ganho de peso dos animais que tomaram a solução de DEN, as explicações mais plausíveis parecem ser os efeitos tóxicos da droga e a disfagia provocada pelo crescimento dos tumores, levando o animal a ter dificuldade para engolir. Outro fator poderia ser o efeito consuptivo dos tumores. Novamente aqui, a vitamina C atuou de maneira favorável.

A dose escolhida de DEN para este estudo foi de 10mg/kg, seguindo padronização (RUBIO, 1982; KRUEL, 1992; SALLET, 1996). Assim evitam-se os efeitos tóxicos principalmente no fígado, pulmão e rim, procurando-se menor mortalidade dos animais, durante o experimento.

As nitrosaminas necessitam ativação metabólica para causar lesão no *DNA*, iniciando o processo de carcinogênese. Esta ativação ocorre por catálise a partir do grupo enzimático do citocromo P450, no retículo endoplasmático da mucosa esofageana, em reação de alfa-hidroxilação. O resultado será a formação de agentes alquilantes, sendo o mais importante o diazônio, que irão atuar no *DNA* e *RNA* em diferentes sítios, provocando mutação e início da carcinogênese (MOCHIZUKI *et al.*, 1980; YANG *et al.* 1990; MIRVISH *et al.*, 1993).

5.3. CARCINOGENESE E HISTOGENESE

Embora ainda se esteja longe do entendimento por completo do fenômeno da carcinogênese, este certamente está relacionado a alterações do *DNA*. Estas alterações podem ocorrer devido a ação lesiva de uma série de agentes, que podem provir tanto de fontes exógenas quanto endógenas. Modificações do *DNA* são normais e ocorrem com frequência, porém são corrigidas pelos sistemas reparadores de *DNA*. Quando esta correção não é efetivada, iniciam-se mutações genéticas que resultam no aparecimento de proteínas com propriedades e funções alteradas. Além destas alterações genéticas adquiridas, existem também aquelas herdadas, que já nascem com o indivíduo (WACHSMAN, 1997). O mecanismo mais comum de lesão do *DNA* parece estar relacionado a reações de metilação, quer por hipermetilação de genes supressores de tumor, quer por hipometilação de oncogenes (COUNTS & GOODMAN, 1995).

A alquilação e as lesões oxidativas levam a hipometilação e ativação de mecanismos que resultam na formação de fendas no *DNA* (WILSON & JONES, 1983). Estas lesões podem ser reparadas por enzimas como a metiltransferase. Substâncias como o óxido nítrico, por exemplo, resultam em alquilação e inibição da atividade desta enzima. O resultado é a formação de mutações (XIAO & SAMSON, 1993; LAVAL & WINK, 1994).

A metilação é um evento constante e normal na manutenção da estrutura do *DNA*. O problema surge quando esta reação é alterada para mais ou para menos. Diversas substâncias podem interferir nesta reação (WACHSMAN, 1997) (Tabela 15).

Tabela 15: Substâncias químicas que podem alterar a metilação do DNA

HIPOMETILAÇÃO	HIPERMETILAÇÃO
Nitrosuréia	Fluorouracil
Ciclofosfamida	Metotrexate
Chumbo	Citosina arabinosídio
Novobiocina	Etoposídio
Ácido nalidíxico	Cisplatina
Procainamida	Vincristina
Hidralazina	Vimblastina
Benzopireno	Colchicina
Antraceno	Propionato
Aflatoxina	
Dietilnitrosamina	

Nesta tabela pode-se observar que os carcinógenos, especialmente a DEN, substância utilizada neste experimento, atuam por hipometilação, que em última análise significa diminuição ou inibição da síntese do *DNA*. KAUTIAINEN & JONES, em 1986, foram os primeiros a demonstrar relação entre metilação do *DNA* e carcinogênese. Esta conclusão resultou da observação de que células neoplásicas apresentavam níveis quatro a 3000 vezes superior de atividade de metiltransferase que as não neoplásicas.

Neste experimento foi avaliada a capacidade da vitamina C de atuar na inibição da carcinogênese esofágica induzida por uma nitrosamina, a DEN. Os resultados foram significativamente favoráveis e em todos os grupos em que ela foi utilizada ocorreu redução do número de tumores na avaliação macro e microscópica, nos dois momentos de sacrifício em que houve aparecimento de neoplasias, T150 e T180.

Considerando-se a avaliação macroscópica no **T150**: ocorreu redução de 10 lesões no grupo III para 7 no grupo IV (redução de 30%); e nenhuma lesão foi encontrada nos grupos V e VI (redução de 100%); no **T180**: ocorreu redução de 48 lesões no grupo III para 31 no grupo IV (redução de 35%); para 5 lesões no grupo V (redução de 89%); e para 1 lesão no grupo VI (redução de 98%) (Tabela 16).

Da mesma forma, considerando-se a avaliação microscópica no **T150**: ocorreu redução de 6 lesões no grupo III para 5 no grupo IV (redução de 16%); e nenhuma lesão foi encontrada nos grupos V e VI (redução de 100%); no **T180**: ocorreu redução de 23 lesões no grupo III para 17 no grupo IV (redução de 26%); para 3 lesões no grupo V (redução de 87%); e para 1 lesão no grupo VI (redução de 95%) (Tabela 16).

Tabela 16: Número de tumores encontrados por grupo em T150 e T180 e redução em %

Tempo	Número de tumores por grupo			
	III	IV	V	VI
180 Macroscopia	48	31 (35%)	5 (89%)	1 (98%)
Microscopia	23	17 (26%)	3 (87%)	1 (95%)
150 Macroscopia	10	7 (30%)	0 (100%)	0 (100%)
Microscopia	6	5 (16%)	0 (100%)	0 (100%)

% redução em ()

Se for realizada a correlação entre os dados observados em todos os grupos, incluindo análise macro e microscópica e redução percentual dos tumores, pode-se concluir que a redução do aparecimento de tumores foi significativa e diretamente proporcional ao uso de vitamina C. Assim, no grupo que recebeu ácido ascórbico alternadamente com DEN (grupo IV) foi de 30%, 35%, 16% e 26%. Este grupo foi criado para avaliar o efeito das drogas independentemente uma da outra, pois aqui os animais recebiam as mesmas, em bebedouros separados, o que impediria a reação *in vitro* entre as duas substâncias. Embora exista referência na literatura de que não existiria reação de decomposição *in vitro* entre DEN e vitamina C (FAN & TANNENBAUM, 1972), preferiu-se tomar este cuidado. Com referência a este tema, as duas situações que provocam alteração e decomposição das

nitrosaminas são envelhecimento do produto, mesmo assim, desde que adequadamente armazenadas, são estáveis por anos; e *pH*, sendo completamente estáveis em *pH* até 6,0, entrando em decomposição em *pH* acima de 7 (FAN & TANNENBAUM, 1972). O *pH* das soluções utilizadas neste estudo encontra-se na Tabela 20, no Apêndice 4.

Os grupos V e VI receberam solução com DEN e vitamina C da mesma forma, ou seja, juntos no mesmo frasco três dias por semana. A diferença foi que o grupo V recebia somente água nos outros quatro dias, enquanto o grupo VI continuava recebendo vitamina C nestes dias. Nos dois, a redução de formação de tumores macro e microscopicamente foi extremamente significativa, chegando mesmo a 100% em T150 e 98% em T180, demonstrando que a vitamina C teve um papel efetivo.

O aparecimento de lesões associadas, papiloma e acantólise, ocorreu apenas nos grupos que tomavam DEN, ou associação de DEN e vitamina C. Estas lesões não ocorreram nos grupos I, II e VI. A incidência maior foi sempre no grupo III. Desta forma, também fica claro o papel protetor da vitamina C no desenvolvimento destas lesões.

5.4. VITAMINA C E CARCINOGENESE

MOKHTAR *et al.* (1988) realizaram estudo em camundongos sobre o efeito protetor da vitamina C e do soja sobre a carcinogênese induzida por dois compostos nitrosados, a dibutilamina (DBA) e o nitrito sódico (NS). Após 12 meses de observação demonstraram aparecimento de hepatoma em 27% dos animais e de papiloma de bexiga em 40% nos grupos que tinham recebido DBA+NS. Nos outros dois grupos que haviam ingerido estas mesmas drogas juntamente com ácido ascórbico e soja, não ocorreu desenvolvimento de nenhum tumor.

KESSLER *et al.* (1992), no único relato similar a este na literatura, porém estudando a capacidade da vitamina C de inibir a formação de tumor de fígado, utilizando DEN na dose de 6,4 mg/kg/animal/dia e vitamina C na dose de 43 mg/animal/dia por 135 dias, em ratos Wistar, também no mesmo protocolo, drogas três dias por semana e vitamina C conjuntamente e alternadamente, encontraram os seguintes resultados: no grupo que

recebeu somente DEN, ocorreu formação de carcinoma de fígado em 89,7% dos casos; no grupo que recebeu DEN e vitamina C alternados, ocorreu formação de tumores de fígado em 67,9% dos animais; e no grupo que recebeu DEN e vitamina C conjuntamente, ocorreu formação de tumores em 55,2% dos casos.

Se a exposição a carcinógenos, especialmente as nitrosaminas, não pode ser evitada, a prevenção da atividade fisiológica destas drogas precisa ser considerada. Parece que a melhor alternativa em termos de prevenção é atuar em seu metabolismo, impedindo a atuação no órgão alvo. Assim, qualquer composto que possa bloquear a ativação metabólica, neutralizar os derivados ativos ou favorecer a excreção poderá ser considerado um agente quimio-preventivo. Diversos compostos já foram estudados de modo a impedir os efeitos carcinogênicos das nitrosaminas: isotiocianatos, dialilsulfidas, dissulfiram, tiocarbamatos, ácido elágico, e até mesmo substâncias comuns como os chás verde e preto e o soja (IRVING *et al.*, 1983; WATTENBERG, 1987; MANDAL *et al.*, 1988; WARGOVICH *et al.*, 1988; WATTENBERG *et al.*, 1989; FRANK *et al.*, 1990; ISHIZAKI *et al.*, 1990; MANDAL & STORNER, 1990; BRADY *et al.*, 1991; BRADY *et al.* 1991a; HONG *et al.*, 1991; WANG *et al.*, 1992; NISHIKAWA *et al.*, 1995; WILKINSON *et al.*, 1995). Com a evolução dos estudos demonstrando a importância dos radicais livres, quer diretamente na carcinogênese, quer na facilitação do processo, substâncias de potencial redutor, como a vitamina C, passaram a ser muito estudadas.

Embora poucas coisas já tenham sido cientificamente comprovadas, várias hipóteses têm sido aventadas para explicar o mecanismo pelo qual a vitamina C possa interferir no processo da carcinogênese. Cada uma delas será discutida separadamente:

5.4.1. Inibição da reação de nitrosação

Um dos principais mecanismos pelos quais o ácido ascórbico parece interferir na carcinogênese está relacionado à sua habilidade de reduzir ácido nitroso, prevenindo a formação de compostos nitrosados no estômago. Este fato, embora já tenha sido imaginado há muito tempo, só recentemente encontrou embasamento teórico, com as medidas do ácido ascórbico no suco gástrico. MIRVISH (1972) foi o primeiro a levantar a hipótese de que a vitamina C poderia inibir a nitrosação intragástrica.

Está bem demonstrado que indivíduos normais apresentam valores elevados de ácido ascórbico no suco gástrico, em comparação ao plasma, indicando assim, secreção ativa no estômago. Entretanto, em indivíduos com distúrbios gastroduodenais, a concentração de ácido ascórbico no suco gástrico diminui, chegando até mesmo a ser menor que a plasmática, indicando a perda do mecanismo de secreção ativa (SINGH & GODBOLE, 1968; RATHBONE *et al.*, 1986; O'CONNOR *et al.*, 1989).

SCHORAH *et al.*, em 1991, estudando a concentração de ácido ascórbico no suco gástrico e no plasma de 133 indivíduos, confirmaram estes achados. Nos normais a concentração de ácido ascórbico no suco gástrico era maior que a plasmática. Pacientes com doenças cloridopépticas, especialmente gastrite crônica, tinham uma redução significativa, chegando até mesmo a níveis menores que os plasmáticos (Tabela 17). Foi também avaliada a concentração de ácido ascórbico e sua relação com ao *pH*, sendo observado que a hipocloridria (*pH*>4) era associada a uma queda significativa muitas vezes inferior aos níveis plasmáticos de ácido ascórbico (Tabela 18).

A análise destes dados em conjunto demonstra que o ácido ascórbico é secretado no suco gástrico em concentração bem mais alta, em relação a plasmática. Através de biópsias, pode-se comprovar que esta produção ativa se dá no corpo e antro através de mecanismo ainda não conhecido. A gastrite crônica interfere neste mecanismo, deixando a concentração de vitamina C no suco gástrico dependente dos níveis plasmáticos. Se o *pH* eleva-se acima de quatro ocorre quase que a parada completa de secreção da vitamina C no suco gástrico.

A nitrosação ocorre pela reação de aminas ou amidas com uma grande variedade de agentes nitrosantes, como o nitrito. Este pode ser formado a partir do nitrato, por redução bacteriana ou pela ativação de macrófagos e lesão de células endoteliais. SANDER & BUERKLE, em 1969, foram os primeiros a demonstrar que uma reação entre aminas ingeridas e nitrito, *in vivo*, resultaria na formação de nitrosaminas .

Estima-se que para que haja uma considerável redução da nitrosação intra-gástrica é necessária uma concentração de ácido ascórbico de pelo menos o dobro da de nitrito. A concentração de nitrito gástrico é normalmente baixa, em torno de

10micromol/l. Indivíduos com doenças gástricas como gastrite, normalmente têm secreção de vitamina C de pelo menos três vezes este valor. Mesmo na gastrite crônica a concentração de ácido ascórbico costuma ser superior a isto. Isto não ocorre na hipocloridria com *pH* acima de 4, quando a secreção de ácido ascórbico tende a zero, enquanto, dependendo da alimentação, a concentração de nitrito pode chegar a 300 micromol/l. Assim, o paciente de risco para câncer seria aquele com hipocloridria. Sabe-se que a reação de nitrosação também é dependente de *pH*, e que quanto menor o *pH* mais eficiente é a reação. Porém com *pH* elevado a nitrosação acontecerá às custas não de reação química, e sim bacteriana. Embora a vitamina C seja mais efetiva entre *pH* 3 e 7, também é capaz de inibir a reação de nitrosação por bactérias, em *pH* neutro (SCHORAH *et al.*, 1991).

Foi demonstrado que a concentração ideal de ácido ascórbico para inibir a reação de nitrosação é de 300 micromol/l. Em humanos, estima-se que esta concentração seja alcançada com uma dose oral diária de 200mg de vitamina C (SCHORAH *et al.*, 1991).

Tabela 17: Relação entre as concentrações de vitamina C no suco gástrico e no plasma em doenças cloridopépticas

Condição clínica	Vitamina C no suco gástrico	Vitamina C no plasma
	mg	mg
Normal	154	39
Gastrite crônica	16	39
Úlcera	29	56
Úlcera + gastrite	30	48
Gastrite alcalina	111	72

Fonte: SCHORAH *et al.*, 1991

Tabela 18: Relação entre vitamina C e pH do suco gástrico

pH no suco gástrico	Vitamina C no suco Gástrico mg	Vitamina C no plasma mg
Menor que 4	37	45
Maior que 4	2	22

Fonte: SCHORAH *et al.*, 1991

Embora a inibição da reação de nitrosação seja uma propriedade muito importante e já comprovada *in vitro*, em animais de experimentação e em humanos, ela não deve ter influenciado significativamente a atuação do composto nitrosado neste trabalho. Isto porque a DEN é uma nitrosamina já formada e pronta para atuar, não necessitando portanto, de nitrosação gástrica ou bacteriana.

5.4.2. Atuação no P450 e p53

A ativação metabólica das nitrosaminas é resultante da alfa-hidroxilação catalisada por citocromos P450. A partir desta reação os produtos formados são instáveis e incapazes de cair na circulação sistêmica novamente. O produto final será um íon alquildiazônio, que irá alquilar bases específicas de oncogenes e genes supressores de tumor, levando a mutações e a conseqüente perda de crescimento e/ou diferenciação celular. Portanto, somente o tecido que possui um P450 capaz de metabolizar nitrosaminas, é susceptível a tumores produzidos pela mesma.

O esôfago do rato é particularmente susceptível a tumores induzidos por nitrosaminas pois contém P450 expressos exclusivamente neste tecido e com uma alta afinidade para metabolizar um número variado de nitrosaminas. Estes P450 não foram ainda completamente caracterizados (RIBEIRO PINTO, 1994).

Semelhante à situação com o rato, os citocromos P450 presentes no esôfago humano ainda não foram caracterizados. Vários estudos têm demonstrado ocorrer um polimorfismo genético na expressão de diversos citocromos P450 em humanos, bem como

a tentativa de associação deste polimorfismo com alguns tipos de câncer, particularmente o de pulmão. Este fato facilita a compreensão do fenômeno da susceptibilidade individual quanto ao risco do desenvolvimento de certos tumores, já que a grande maioria dos tipos de câncer tem origem química, e que muitos compostos que são iniciadores de tumores necessitam de ativação metabólica, como no caso das nitrosaminas pelos citocromos P450 (GUENGERICH, 1996).

Compostos associados com uma alta incidência de câncer de esôfago em diferentes partes do mundo, como o álcool e o ópio diminuem o metabolismo de nitrosaminas no fígado de ratos, mas não no esôfago (uma vez que os respectivos P450 responsáveis pelo metabolismo das nitrosaminas nestes dois órgãos são diferentes), provocando um aumento maior da exposição do esôfago a estes carcinógenos. Isto explica a potencialização da indução de tumores, de até 300%, quando as nitrosaminas são dadas diluídas em etanol, em vez de água (BARTSCH, *et al.*, 1989; ANDERSON, *et al.*, 1992; 1994).

A nível molecular, diferentes lesões de genes têm sido identificadas, quer seja em oncogenes, em genes supressores de tumor ou ainda em lesões provocadas diretamente por vírus (PURDIE *et al.*, 1991; BENNET *et al.*, 1992; FURIHATA *et al.*, 1993).

A mutação do gene supressor de tumor p53 é a alteração genética mais comum no câncer humano (HOLLSTEIN *et al.*, 1991). O gene supressor de tumor p53, que se localiza no cromossomo 17, contém a fosfoproteína 53-kD envolvida no controle da proliferação e morte celular (YIN *et al.*, 1992; REID *et al.*, 1993). A perda da função da proteína p53 ocorre normalmente seguindo lesão dos éxons 5, 6, 7 e 8, resultando em mutação (TAMURA *et al.*, 1992). Em tecidos normais esta proteína é sintetizada continuamente. Por ter meia-vida muito curta (2 a 15 minutos) não se acumula em níveis significativos, tornando sua detecção por métodos imuno-histoquímicos praticamente impossível. No entanto, quando as células são expostas a agentes que danificam o DNA, a proteína se torna estável, provocando alterações em diversos genes que são seus alvos, como os genes que controlam o ciclo de crescimento e diferenciação celular, e os genes efetores da apoptose. A existência de mutações leva a formação de um aumento da instabilidade do genoma de células potencialmente cancerosas, levando estas células a

acumular alterações genéticas múltiplas (MONTESANO, *et al.*, 1996). Assim, a proteína p53 com mutação é mais estável e de mais fácil detecção, sendo utilizada com método de identificação da lesão genética (BATTIFORA, 1994).

Cada vez mais a alteração da proteína p53 tem sido considerada importante no aparecimento e desenvolvimento de tumores malignos, sendo que a perda do controle do crescimento tumoral também tem sido relacionada ao prognóstico da doença (FLEJOU *et al.*, 1993; SHIMAYA *et al.*, 1993; YOUNES *et al.*, 1993; SHIAO *et al.*, 1994). WANG *et al.* (1993), encontraram reação nuclear positiva para p53 em 50% dos esôfagos normais, em 100% das displasias e em 82% dos carcinomas. PARENTI *et al.* (1995), identificaram-na em 32% dos esôfagos normais, em 75% das displasias e em 74% dos carcinomas.

Embora a carcinogênese esofágica tenha múltiplas etapas, a mutação da proteína p53 parece acontecer precocemente, precedendo a alteração fenotípica, podendo futuramente ser usada como forma de identificar indivíduos ou populações de maior risco (WANG *et al.*, 1993; SARBIA *et al.*, 1994).

A mutação parece iniciar-se junto à lâmina basal (PIETENPOL e VOGELSTEIN, 1993). A seguir, as células com mutação disseminam-se através da mucosa, acompanhando o grau de displasia.

Além disso, níveis aumentados de proteína p53 podem ser encontrados em até 80% dos tumores malignos e raramente ocorrem em neoplasias benignas ou em tecidos normais. Como consequência, por sua especificidade e frequência, este acúmulo de p53 tem sido muito estudado, como um possível marcador para diagnóstico precoce do tumor de esôfago (HALL *et al.*, 1991; HEYDERMAN & DAGG, 1991; RONEN *et al.*, 1991).

A análise do acúmulo de p53 em células normais, pré-neoplásicas e cancerosas leva a conclusões interessantes quanto ao câncer de esôfago. O acúmulo de p53 tem sido observado em células normais do esôfago, não displásicas, e, em particular, no núcleo de células proliferativas da camada basal da mucosa. Este aumento pode ocorrer também em células do epitélio escamoso do esôfago aparentemente normais. Esta expressão aumenta progressivamente em hiperplasia da célula basal, lesão pré-neoplásica, displásica e

carcinoma de célula escamosa. Ainda não se sabe se a superexpressão de p53 na mucosa esofágica normal e pré-neoplásica está funcionalmente ativa, no entanto pode-se suspeitar que exista uma alteração a nível da regulação de p53 e que este seria um evento precoce na carcinogênese do esôfago (MONTESANO, 1996).

GRDISA *et al.* (1995), avaliando a atuação *in vitro* do ácido ascórbico sobre células normais (fibroblastos) e tumorais de pâncreas, laringe e colo uterino, demonstraram ser esta droga capaz de induzir apoptose, ou seja, morte celular programada das células neoplásicas. Este efeito da vitamina C parece ser dependente diretamente de sua concentração. Inicialmente as células tumorais param de crescer e de se multiplicar, para após, entrarem em uma sequência de fenômenos que resulta na morte celular. Uma das hipóteses para este acontecimento, seria a atuação da vitamina C sobre *c-myc* e p53. As alterações observadas nas células tumorais tratadas foram: arredondamento, tornaram-se menores, cromatina condensada, *nuclei* fragmentado e ruptura do *DNA*. Todas estas mudanças são características de apoptose, fenômeno muito relacionado a *c-myc* e p53.

Outro mecanismo de ação da vitamina C poderia ser relacionado ao bloqueio e/ou competição com os carcinógenos por enzimas do citocromo P450, impedindo sua ativação metabólica.

5.4.3. Atuação da vitamina C como antioxidante

Radicais são moléculas que perderam um elétron. Quando saem de sua localização normal são chamados radicais livres. Estes se caracterizam por sua alta capacidade de reagir quimicamente, seqüestrando elétrons de moléculas adjacentes. Células lesadas por radicais livres irão colocar mais radicais livres em circulação, perpetuando o processo. O organismo dispõe de sistemas para impedir estas reações nocivas, que são os antioxidantes naturais, como as enzimas glutationala, catalase e superóxido dismutase. Existem também outros antioxidantes naturais, não enzimáticos. Porém, os radicais livres que escaparem deste controle endógeno irão causar lesão. A reação de neutralização dos radicais livres não ocorre por atuação direta da substância antioxidante, e sim do elétron energético que ela carrega.

Os radicais livres podem atuar de duas formas na carcinogênese, causando lesão direta da célula ou então rompendo a parede celular para que carcinógenos, como as nitrosaminas, possam entrar na célula e danificarem o *DNA*.

A lesão oxidativa do *DNA*, isoladamente ou facilitando a atuação de carcinógenos, parece ter papel importante no desenvolvimento de tumores (CARNEY *et al.*, 1991; FRAGA *et al.*, 1991). Estudos da excreção urinária de *DNA adducts* demonstraram que cada célula sofre 100.000 tentativas de lesão oxidativa do *DNA* por dia (CATHCART *et al.*, 1984). Estas lesões podem ser efetivamente corrigidas pelos sistemas reparadores de *DNA*, porém pode haver deficiência nesta reparação, resultando em lesão genética. FRAGA *et al.* (1990), demonstraram em ratos, que com o processo de envelhecimento estes danos celulares ao *DNA* se duplicam de intensidade. A lesão oxidativa ao *DNA* pode também ser quantificada por estudos de esperma, onde já foi comprovada a capacidade da vitamina C de proteger o *DNA* de lesão oxidativa (FRAGA *et al.*, 1991).

As evidências de que os radicais livres possam estar envolvidos na carcinogênese são muito consistentes, provocando lesão de lipídios, proteínas, membranas e do próprio *DNA*. Estes podem resultar de fontes externas, como hidrocarbonetos aromáticos, poluição do ar, tabagismo, aminas heterocíclicas da comida e do cigarro, radiação, etc..., ou de fontes internas, como a ativação de neutrófilos, atuação de prostaglandinas, redução de quinonas, etc... Sem uma contínua atividade dos sistemas varredores e reparadores do *DNA*, a sobrevivência seria impossível (KINSLER & TAFTE, 1986; PRYOR, 1987). A vitamina C como antioxidante atuaria fornecendo elétrons para neutralização dos radicais livres.

5.4.4. Vitamina C como bloqueadora de carcinógenos

A atuação direta de vários carcinógenos também pode ser bloqueada pela vitamina C. WARREN (1943) demonstrou que o benzopireno e o antraceno poderiam ser convertidos em substâncias menos tóxicas pela presença de ácido ascórbico. A inativação de pesticidas organoclorados, como DDT, dieldrin e lindano, pela vitamina C também foi

demonstrada (STREET & CHADWICK, 1975). GIAMALVA *et al.* (1986) demonstraram que a lesão oxidativa do ozônio e do óxido de hidrogênio pode ser prevenida pelas vitaminas C e E.

5.4.5. Vitamina C, colágeno e matriz intercelular

O ácido ascórbico desempenha um papel fundamental na produção e manutenção da matriz intercelular, cuja integridade é extremamente importante para impedir a infiltração, proliferação e disseminação metastática dos tumores. Este efeito pode ser conseguido de várias maneiras, porém as mais prováveis são: fortalecimento de barreiras naturais de colágeno, evitando a infiltração e a erosão que levariam a proliferação tecidual do tumor; encapsulamento de lesões tumorais pelo colágeno, auxiliando a atuação do sistema imunológico na destruição destes tecidos; e controle da quantidade de vascularização para o tumor (PANUSH & LA FUENTE, 1979; ANDERSON *et al.*, 1980; KESSLER *et al.*, 1992).

O colágeno é uma proteína extracelular sintetizada como tropocolágeno pelos fibroblastos, a partir de aminoácidos como prolina, glicina e lisina. A vitamina C exerce um importante papel na síntese do colágeno, favorecendo a hidroxilação de prolina para hidroxiprolina (PADH, 1990). Outros mecanismos de interferência da vitamina C na síntese de colágeno têm sido relatados: peroxidação lipídica e aumento da transcrição de genes *RNA*, envolvidos na manutenção dos níveis de colágeno (BRENNER & CHOJKIER, 1987; CHOJKIER *et al.*, 1989).

Até agora, sete tipos de colágeno já foram identificados. O tipo VII está presente junto à membrana basal, sendo responsável pela formação de uma rede que a ancora através de fibrilas. Este tipo de estruturação solidifica e fortalece a membrana basal, tornando-a mais resistente, formando uma barreira que impede a invasão tumoral (LUPULESCU, 1992).

5.4.6. Imunidade e vitamina C

Embora sendo tema de domínio popular, o mecanismo da atividade imunomoduladora da vitamina C ainda é assunto controverso e de difícil comprovação científica. Entretanto, alguns tópicos já foram bem demonstrados. O ácido ascórbico é um componente essencial dos linfócitos e atua ativamente no sistema imunológico, principalmente favorecendo a síntese de imunoglobulinas e estimulando a fagocitose (KESSLER *et al.*, 1992).

A concentração de vitamina C nos leucócitos é cerca de 80 vezes superior à plasmática, e nestes costuma ser maior nos linfócitos (MOSER, 1987). Nos leucócitos a vitamina C parece desempenhar pelo menos duas funções: melhora da quimiotaxia pelos neutrófilos (HEMILÄ, 1992) e favorecimento da fagocitose (NATH & GALLIN, 1987). Outras atividades são relacionadas à ação anti-histamínica, atuação na cascata do complemento e ação local como bactericida e viruscida (JONHSON *et al.*, 1979; PADH & ALEO, 1987; JONHSTON & HUANG, 1991; GERSHOFF, 1993).

Qualquer agressão leva a um distúrbio da homeostasia, desencadeando reações de defesa no hospedeiro com consequente ativação da imunidade celular e humoral, resultando em processo inflamatório agudo e formação aumentada de radicais livres. Assim outra atividade do ácido ascórbico nesse mecanismo é reduzindo os radicais livres formados, impedindo seus efeitos nocivos.

5.4.7. Vitamina C e vitamina E

Vitamina E é o nome dado a um grupo de substâncias lipossolúveis, o tocoferol e o tocotrienol, encontradas em certas plantas oleosas, vegetais e cereais. Como a vitamina C, a vitamina E apresenta as características que a definem como uma vitamina e também possui uma grande propriedade redutora. A diferença é que a vitamina E é lipossolúvel, sendo portanto muito importante nas membranas. Em termos de importância, seu papel é tão grande quanto o da vitamina C, tendo basicamente as mesmas funções: antioxidante, reconstrução celular, melhora da imunidade, enfim, várias funções relacionadas ao meio

lipídico. A presença da vitamina C é essencial para a atuação da vitamina E, pois além de ambas atuarem sinergisticamente (BURTON *et al.*, 1990), o ácido ascórbico participa da reciclagem para o reaproveitamento da vitamina E (HALLIWELL, 1991; BUETTNER, 1993).

5.4.8. Glutathione e ácido ascórbico

Se no líquido extracelular a mais importante substância antioxidante em meio aquoso é a vitamina C e no meio lipídico é a vitamina E, dentro da célula o maior responsável pelo controle e inativação dos radicais livres é um tripeptídeo de ácido glutâmico, cisteína e glicina, chamado glutathione. Quando a deficiência de glutathione é induzida em animais como ratos ou cobaias, estes morrem em poucos dias (três a cinco) devido a falência orgânica generalizada, necrose de fígado, lesão tubular renal, hemorragia e necrose pulmonar, necrose cerebral e catarata. Estas lesões podem ser prevenidas pela administração de ácido ascórbico (MEISTER, 1994).

A Vitamina C e a glutathione têm ações em comum, atuando em determinadas situações de modo sinérgico. Outro efeito da vitamina C é favorecer a síntese e também a economia e o reaproveitamento da glutathione, colaborando desta forma na manutenção de níveis aceitáveis de radicais livres no espaço intracelular (TANIGUCHI *et al.*, 1993).

5.5. COMENTÁRIOS FINAIS

Apesar dos recentes avanços das técnicas cirúrgicas, como a operação em três campos com ressecção linfonodal ampliada, o câncer de esôfago continua ainda com um dos piores prognósticos entre as doenças malignas (SUGIMACHI *et al.*, 1988; KOTO *et al.*, 1993; BABA *et al.*, 1994).

O número de diagnósticos de câncer esofágico precoce, limitado à mucosa e à submucosa sem acometimento linfonodal, está aumentando sensivelmente no Japão e em todos os centros do mundo que têm adotado a filosofia japonesa de abordagem diagnóstica

da doença. A sobrevida de cinco anos para câncer esofágico precoce atingiu 57%, sem mortalidade operatória (SUGIMACHI *et al.*, 1993), o que sem dúvida representa um avanço extraordinário, se comparado com os resultados do tratamento da doença em estágios avançados. Estes dados mostram que a abordagem precoce é uma boa maneira de melhorar o prognóstico do tratamento cirúrgico da doença. Outro modo para se atingirem melhores resultados seria através do conhecimento da carcinogênese e da histogênese do tumor, procurando atuar em sua prevenção e inibição. Alguns fatores de risco já são bem conhecidos, como fumo, álcool, alimentos defumados e muito condimentados e deficiências de vitaminas e minerais.

Lesões displásicas são frequentemente encontradas no esôfago com câncer e diversos autores têm discutido sua importância e significância como doenças pré-malignas (MANDARD *et al.*, 1984; MANDARD *et al.*, 1991; NAGAMATSU *et al.*, 1992). A partir deste conceito, pode-se inferir que sendo a displasia tão estreitamente relacionada ao câncer, na realidade ela deveria ser considerada um câncer precoce em fase inicial, e que se os pacientes pudessem ser tratados nesta fase, os resultados seriam ainda melhores.

SUGIMACHI *et al.* (1995) encontraram displasia em 32 (20,5%) de 156 pacientes com câncer de esôfago. Dividindo-se estes pacientes com displasia em quatro níveis, de acordo com a profundidade de invasão do câncer, pode-se observar correlação entre câncer e displasia em até 58,3%, quando o câncer era restrito à mucosa. Quanto mais avançada a lesão principal, menor a incidência de displasia. Continuidade entre displasia e a lesão principal ocorreu em 48% dos casos, e quanto mais severa a displasia maior era a continuidade entre as duas formas de lesão. Foi avaliada também a atividade proliferativa das células através de coloração com prata. Podendo ser observado que a atividade proliferativa da displasia e do câncer intraepitelial (*in situ*) foi muito semelhante, inferindo-se com isto que a agressividade biológica e a capacidade proliferativa de ambas as lesões são muito parecidas.

O uso do lugol como corante para diagnóstico precoce de câncer epidermóide foi proposto por SCHILLER em 1933, para colo uterino. O método baseia-se na reação química entre a solução iodada e o glicogênio, que resulta em cor escura, marrom esverdeada. As áreas não coradas serão classificadas como iodo-claras ou iodo-negativas.

VOEGUELI (1966) e BRODMERKEL (1971) foram os primeiros a utilizar, no esôfago, a metodologia descrita por SCHILLER (1933), para pesquisa de câncer precoce.

A intensidade da coloração será diretamente proporcional a quantidade de glicogênio do tecido. Células epiteliais escamosas normais contêm grandes quantidades de glicogênio, portanto serão iodo-positivas. As lesões iodo-claras poderão ser: esofagite, mucosa ectópica, úlcera, papiloma, hiperqueratose, displasia e câncer. Áreas pouco coradas poderão corresponder a erosão, edema, atrofia e inflamação. Regiões fortemente coradas poderão ser acantose glicogênica e hiperplasia (MISUMI *et al.*, 1990; KAWAMURA & KOIKE, 1994).

SUGIMACHI *et al.* (1991) chamaram atenção para a importância do uso do lugol no diagnóstico precoce do carcinoma epidermóide de esôfago. Demonstraram que entre 1965 e 1969, quando o lugol não era utilizado, o diagnóstico de carcinoma precoce foi de somente 2,6%; já entre 1985 e 1989, com a utilização de lugol, este número aumentou para 23%.

Neste estudo, o uso do lugol como método auxiliar na avaliação macroscópica, foi sem dúvida, extremamente importante, bastando para isso observar as Figuras 19 e 20.

Nestas figuras, fica claro, pela análise do mesmo esôfago de rato, antes e após coloração por lugol, o valor deste procedimento, pois as lesões tornam-se muito mais evidentes e até mesmo lesões não visualizadas, passam a ser observadas sem dificuldades após a coloração. Este fato já havia sido demonstrado por SALLET (1996), onde 100% das lesões neoplásicas encontradas eram iodo-negativas.

O consumo médio de ácido ascórbico entre os americanos é de 73mg/dia para os homens e 66mg/dia para as mulheres, embora se saiba que 25% da população consuma menos de 39mg/dia. A dosagem recomendada pelo FOOD AND NUTRITION BOARD (1989) é de 60mg/dia e pelo FDA é de 110mg/dia (LACHANCE, 1988; MURPHY *et al.*, 1990).

Para uma adequada inibição da nitrosação intragástrica há necessidade da ingestão diária de pelo menos 200mg de ácido ascórbico (SCHORAH *et al.*, 1991). Já, para melhora da imunidade, os pesquisadores têm proposto valores em torno de 2,3 até 12g/dia, porém um funcionamento ótimo do sistema imunológico, capaz de levar à saturação máxima dos linfócitos pela vitamina C, parece necessitar de doses médias de 10g/dia (CAMERON & PAULING, 1979; LEEMING, 1994).

Mesmo com um consumo constante e em alta quantidade de vitamina C, o corpo humano mantém reservas de aproximadamente 20mg/kg (1400mg para indivíduo de 70kg) (KALLNER *et al.*, 1979). HANCK (1982) demonstrou em estudos experimentais, que a intoxicação com ácido ascórbico, aguda ou crônica, é extremamente baixa e bem tolerada, sem o aparecimento de efeitos colaterais significativos. Sem dúvida, o efeito colateral mais freqüente, e mesmo assim, dependente de sensibilidade individual, é a diarreia. KALLNER *et al.* (1979) demonstraram ser a formação de cálculos renais de oxalato, efeito já de há muito tempo atribuído ao ácido ascórbico, sem fundamento, pois a ingestão de grandes dosagens não leva ao aumento da excreção urinária de oxalato nem tampouco de urato.

Os dados obtidos no presente estudo apoiam fortemente a tese da atuação da vitamina C como substância inibidora da carcinogênese (Gráfico 10). No grupo VI, que recebeu vitamina C e DEN no mesmo frasco, por três dias da semana e vitamina C nos outros quatro dias, tendo portanto, o efeito protetor da vitamina C todos os dias, a incidência de tumor, em T180, foi 48 vezes menor que a do grupo III.

Estes resultados, apesar de consistentes e muito animadores, precisam ser examinados com cuidado, devendo-se levar em consideração vários aspectos. Em primeiro lugar são relacionados ao efeito do ácido ascórbico na carcinogênese esofágica induzida pela DEN em ratos. Qualquer extrapolação para carcinogênese em geral e em humanos, deve ser feita com cautela. Em segundo lugar, a dose de vitamina C que os animais receberam, corresponderia a cerca de 90g/dia para um indivíduo de 70kg, tornando difícil seu emprego em larga escala.

O que parece inquestionável é que se abre uma nova porta para a pesquisa da carcinogênese pelas nitrosaminas e do efeito inibidor da vitamina C. Com certeza novas pesquisas precisam ser realizadas, inclusive com a avaliação conjunta da vitamina C com outras substâncias, como a vitamina E por exemplo, substâncias que parecem apresentar um grande efeito sinérgico.

6. CONCLUSÃO

A análise dos dados desta pesquisa permite a obtenção das seguintes conclusões:

1. Nos animais dos grupos controle, que receberam apenas água (grupo I) ou apenas vitamina C (grupo II), não foram encontrados tumores nos 180 dias de observação;
2. A DEN administrada de modo isolado (grupo III) efetivamente induziu ao aparecimento da maior quantidade de tumores, em comparação aos outros grupos.
3. Na administração de vitamina C e DEN em períodos alternados (grupo IV), apesar da menor ocorrência de tumores, não houve diferença estatisticamente significativa em comparação ao III.
4. A vitamina C apresentou efeito inibidor, estatisticamente significativo, do aparecimento de tumores de esôfago induzidos experimentalmente pela DEN, quando estas drogas foram administradas conjuntamente.

7. SUMMARY

EVALUATION OF THE INHIBITING EFFECT OF VITAMIN C IN THE EXPERIMENTAL ESOPHAGEAL CARCINOGENESIS INDUCED BY DIETHYLNITROSAMINE (NDEA)

Cancer is today the second death cause in developed countries. In spite of the fact that certain advances have been obtained in the course of its treatment, the prognosis of this disease is still far from being satisfactory.

Although esophageal cancer is not among the most frequent kinds of cancer - actually it is the fourth neoplasia to affect man's digestive system - its studies are very important, basically for two reasons: first, this type of cancer affects people in their most natural life proceeding: nutrition; second, its occurrence rates are quite similar to those of mortality, clearly demonstrating the inefficiency of the treatment. However, two procedures may change this terrifying picture: early diagnosis and prevention. So, the search for substances that may interfere with the carcinogenesis keeping away the possibilities of new tumors looks like a very attractive idea.

The aim of this report was to evaluate the inhibiting effect of vitamin C in the experimental esophageal carcinogenesis induced by diethylnitrosamine (NDEA).

Were employed 240 male Wistar rats, all of them with approximately 155 gr. of weight and three months old. The animals were kept in cages with five rats each and fed with food and water ad libitum. Drugs were dissolved in water. Dosages were: NDEA: 10mg. / kg. / day and vitamin C: 1,290 mg. / kg. / day.

The animals were divided into different groups according to the drug/drugs they would be given, for a better study of the drug effects

Group I, control, only water, seven days a week;

Group II, only vitamin C, seven days a week;

Group III, NDEA, three days a week and water, the other four days;

Group IV, NDEA, three days a week and vitamin C, the other four days;

Group V, NDEA and vitamin C together in the same bottle, three days a week and only water, the other four days;

Group VI, NDEA and vitamin C together in the same bottle, three days and vitamin C, the other four days.

Every group was subdivided into other smaller groups of ten animals each, according to the observation time (T). The animals were sacrificed in four different times, 90, 120, 150 and 180 days. After the elapsed time, each animal was sacrificed and its esophagus was macro/microscopically evaluated to identify any tumors.

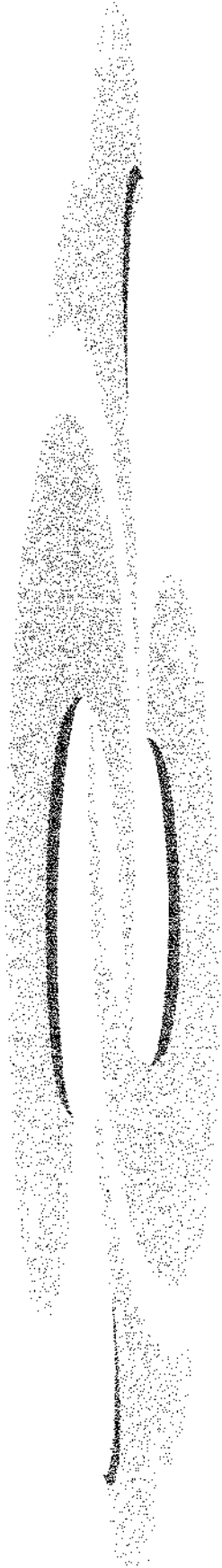
As final results, in the groups I and II and in T90 and T120 of groups III, IV, V and VI there was no occurrence of any kind of tumor.

The macroscopic studies in T150 showed ten lesions in the group III (1 lesion per animal) and seven lesions in the group IV (0.7 lesion per animal), and no lesion the in the groups V and VI. The microscopic studies showed six lesions in the group III (0.6 lesion per animal) and five lesions in the group IV (0.4 lesion per animal), and no lesion in the groups V and VI.

The macroscopic studies in T180 showed 48 lesions in the group III (4.8 lesions per animal), 31 lesions in the group IV (3.1 lesions per animal), 5 lesions in the group V (0.5 lesion per animal) and only one lesion in the group VI (0.1 lesion per animal). The microscopic studies identified 23 lesions in the group III (2.3 lesions per animal), 17 lesions in the group IV (1.7 lesions per animal), 3 lesions in the group V (0.3 lesion per animal) and only one lesion in the group VI (0.1 lesion per animal).

The analysis of such results shows that there were significant differences among the groups towards the occurrence of tumors. On the other hand, group III was the one that showed the highest rate of neoplasias.

Therefore, the analysis of the results demonstrated that vitamin C administered together with diethylnitrosamine (NDEA) showed an inhibiting effect over the occurrence of tumors in animals.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALZIEU , P. , CASSAND , P. , COLIN , C. et al. Effect of vitamins A, C and glutathione on the mutagenicity of benzo[a]pyrene mediated by 9 from vitamin A-deficient rats. **Mutat. Res.** , v. 192, p. 227-31, 1987.
- AMES , B. N. , SHIGENAGA , M. K. , HAGEN , T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** , v. 90, p. 7915-22, 1993.
- ANDERSON , L. M. , CARTER , J. P. , LOGSDON , D. *et al.* Characterization of ethanol's enhancement of tumorigenesis by N-nitrosodimety in mice **Carcinogen** , v. 13, n. 11, p. 2107-11, 1992.
- ANDERSON , L. M. , KOSENIAUSKAS , R. , BURAK , E. S. *et al.* Supression of in vivo clearance of N-nitroso dimethylamine in mice by cotreatment with ethanol. **Drug. Metab. and Disp.** , v. 22, p. 43-9, 1994.
- ANDERSON , R. , OASTHUIZEN , R. , MARITZ , R. *et al.* The effects of increasing weekly doses of ascorbate on certain cellular a humoral functions in normal volunteers. **Am. J. Chem. Nutr.** , v. 33, p. 71-6, 1980.
- ANDREOLLO , N. A. **Contribuição à etiopatogenia do câncer do coto gástrico.** São Paulo, 1994. 173p. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Campinas.
- ANTHONY , H. M. , SCHORAH , C. J. Severe hypovitaminosis C in lung cancer patients: the utilization of vitamin C in surgical repair and lymphocyte-related host resistance. **Br. J. Cancer** , v. 46, p. 354-67, 1982.
- AZZI , A. , BOSCOBOINIK , D. , HENSEY , C. The protein kynase-C family. **Eur. J. Biochem.** , v. 208, p. 547-57, 1992.
- BABA , M. , AIKOU , T. , YOSHINAKA , H. *et al.* Long-term results of subtotal esophagectomy with three-field lymphadenectomy for carcinoma of the thoracic esophagus. **Ann. Surg.** , v. 219, p. 310-6, 1994.

- BAKER , J. Induction of tumors of the stomach and esophagus in inbred chinese hamsters by anal diethylnitrosamine. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** , v. 146, p. 291-8, 1994.
- BAKER , R .K. The carcinogenic activity of dihydroxybenzidine. **Cancer Res.** , v. 13, p. 137-40, 1953.
- BARCELOS , L. B. , PECCIN , D. A. Incidência e mortalidade por câncer no Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Saúde Pública** , v. 17, n.5, p. 367-76, 1983.
- BARKHAN , P. , HOWARD , A. N. Distribution of ascorbic acid in normal and leukemic human blood. **Biochem. J.** , v. 70, p. 163-6, 1958.
- BARNES, J.M., MAGEE, P. N. Some toxic properties of dimethylnitrosamine. **Br. J. Ind. Med.** , v. 11, p. 167-74, 1954.
- BARTON, G. .M., ROATH, O. S. Leucocyte ascorbic acid in abnormal leucocyte states. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.** , v. 46, p. 271-4, 1976. BARTSCH , H. , OHSHIMA , H. , PIGNATELLI , B. *et al.* Human exposure endogenous N-nitroso compounds: quantitative estimates in subjects at high risk for cancer of the oral cavity, esophagus, stomach and urinary bladder. **Cancer Surv.** , v. 8, n. 2, p. 335-62, 1989.
- BARTSCH , H., SPIEGELHALDER, B. Environmental exposure to N- nitroso compounds (NNOC) and precursors: an overview. **Eur. J. Cancer Prev.** , v. 5, n. 1, p. 11-8, 1996.
- BASU , T. K. , RAVEN , R .W., DICKERSON , J. W. T. Leucocyte ascorbic acid and urinary hydroxyproline levels in patients bearing breast cancer with skeletal metastasis. **Eur. J. Cancer** , v. 10, p. 507-11, 1974.
- BATTIFORA , H. p53 immunohistochemistry: a word of caution. **Hum. Pathol.** , v. 25, p. 435-7, 1994.
- BENEDICT, W.F. , WHEATLEY, W.L. , JONES, P.A. Differences in anchorage-dependent growth and tumorigenicities between transformed C3H/10T1/2 cells with morphologies that are or are not reverted to a normal phenotype by ascorbic acid. **Cancer Res.** , v.42 , p. 1041-5, 1982.

- BENNET , W. P., HOLLSTEIN , M. C. , METCALF , R. A. *et al.* p53 mutation and protein accumulation during multistage human esophageal carcinogenesis. **Cancer Res.** , v. 52, p .6092-7, 1992.
- BERRINO , F., ESTEVE , J., COLEMAN , M. .D. Survival of cancer patients in Europe - The eurocare study. In: Basic issues in estimating and comparing the survival of cancer patients. **IARC Sci. Publ.**, v. 132, p .1-14, 1995.
- BHATTACHARYA, R. K., FIROZI , P . F. ABOOBAKER , V. S. Factors modulating the formation of DNA adduct by aflatoxin B₁ in vitro. **Carcinogen.** , v. .5, p. 1359-62, 19 84.
- BINKERD , E. F. ,D. E. The history and use of nitrate and nitrite in curing of meat. **Food Cosmet. Toxicol.** , v. 13, p. 655, 1975.
- BISSEL , M. J. , HATIE , C. , FARSON , D. A. *et al.* Ascorbic acid inhibits replication and infectivity of avian RNA tumor virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** , v. 77, p. 2711-5, 1980.
- BLOCK , G. Epidemiological evidence regarding vitamin C and cancer. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 54, p. 1310s-4s, 1991a.
- BLOCK , G. Vitamin C and cancer prevention: the epidemiological evidence. **Am. J. Clin. Nutr.** , v. 53, p .270s-82s, 1991b.
- BLOCK , G. The data support a role for antioxidants in reducing cancer risk. **Nutr. Rev.** , v. 50, n. 7, p. 207-13, 1992.
- BLOCK , G. , PATTERSON , B. , SUBAR , A. Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. **Nutr. Cancer** , v.18, n. 1, p. 1-29, 1992.
- BLOT , W. J. Esophageal cancer trends and risk factors. **Semin. Oncol.** , v. 21, n. 4, p. 403-10, 1994.

- BODANSKY , O. , WROBLEWSKI, F. , MARKARDT , B. Concentrations of ascorbic acid in plasma and white blood cells of patients with cancer and cancerous chronic disease. **Cancer Res.** , v. 11, p. 238-42, 1951.
- BOGOVSKI , P. , PREUSSMANN , R. , WALKER , E. A. **N-nitroso compounds - analysis and formation.** Lyon : International Agency for Research on Cancer, n. 3, 1972. 120p.
- BOGOVSKI , P. , BOGOVSKI , S. Animal species in which N-nitroso compounds induce cancer. **Int. J. Cancer** , v. 27, p. 471-4, 1981.
- BOING , H. , MARTINEZ , L. , FRENTZEL-BEYME , R. *et al.* Regional nutritional pattern and cancer mortality in the Federal Republic of Germany. **Nutr. Cancer** , v. 7, n. 3, p. 121-30, 1985.
- BOVERIS , A. , OSHINO , N. , CHANCE , B. The cellular production of hydrogen peroxide. **Biochem. J.** , v. 128, p. 617-30, 1972.
- BRADY , J. F. , ISHIZAKI , H. , FUKUTO , J. M. Inhibition of cytochrome p450 2E1 by diallyl sulfide and its metabolites. **Chem. Res. Toxicol.** , v. 4, P 642-7, 1991a.
- BRADY , J. F. , XIAO , F. , WANG , M. H. *et al.* Effects of disulfiram on hepatic p450IIE1, other microsomal enzymes, and hepatotoxicity in rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** , v. 108, p. 366-73, 1991b.
- BRENNER , D. A. , CHOJKIER , M. Acetaldehyde increases collagen gene transcription in cultured human fibroblasts. **J. Biol. Chem.** , v. 262 , p. 17690-5, 1987
- BRODMERKEL, G. J. Schiller' s test: an aid in esophagosopic diagnosis. **Gastroenterology** , v. 60, p. 813, 1971.
- BUETTNER , G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Arch. Biochem. Biophys.** , v. 300, n. 2, p. 535-43, 1993.
- BULAY , O. , MIRVISH , S. S. Carcinogenesis in rat esophagus by intraperitoneal injection of different doses of methyl-n-amyl nitrosamine. **Cancer Res.** , v. 39, p. 3644-6, 1979.

- BURTON , G. W. , WRONSKA , U. , STONE , L. *et al.* Biokinetics of dietary RRR- α -tocopherol in the male guinea pig at three dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E. Evidence that vitamin C does not "spare" vitamin E in vivo. **Lipids** , v. 25, p. 199-210, 1990.
- BUSSEY , H. J. , DECOSSE , J. J., DESCHNER , E. E. *et al.* . A randomized trial of ascorbic acid in polyposis coli. **Cancer**, v. 50, n. 7, p. 1434-9, 1982.
- CALMELS , S. , OHSHIMA , H., HENRY , Y. *et al.* Characterization of bacterial cytochrome cd(1)-nitrite reductase as one enzyme responsible for catalysis of nitrosation of secondary amines. **Carcinogen.** , v. 17, n. 3, p. 533-6, 1996.
- CAMERON , E., PAULING , L. Supplemental ascorbate in supportive treatment of cancer: prolongation of survival times in terminal human cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** , v. 73, n. 10, p. 3685-9, 1976.
- CAMERON, E. PAULING , L. **Cancer and vitamin C**. Linus Pauling Institute of Science and Medicine, 1979. p. 238.
- CAMERON , E. , PAULING , L. , LEIBOWITZ , B. Ascorbic acid and cancer review. **Cancer Res.** , v. 39, p. 663-81, 1979.
- CARNEY, J. M. , STARKE-REED , P. E. , OLIVER , C. M. Reversal of age-related increased in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound n-tert-butyl-a-phenylnitron. **Proc. Natl. Acad. Sci.** , v. 88, p. 5633-7, 1991.
- CATHCART , R. F. A unique function for ascorbate. **Med. Hypotheses** , v. 35, p. 32-7, 1991.
- CATHCART, R. F. , SCHWIERS , E. , SAL , R. L. *et al.* Thymine glycol and Thymidine glycol in human and rat urine: a possible assay for oxidative DNA Damage. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** , v. 81, p. 5633-7, 1984.
- CHOJKIER , M. , HOUGLUM , K., SOLIS-HERRUZO, J. *et al.* Stimulation for collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts. A role for lipid peroxidation? **J. Biol. Chem.** , v. 264, p. 16957-62, 1989.

- CLAPP , N. K. , CRAIG , A. W. Carcinogenic effects of diethylnitrosamine in RF Mice. **J. Natl. Cancer Inst.** , v. 39, n. 5, p. 903-12, 1967.
- COMMITTEE ON DIET, NUTRITION AND CANCER, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL RESEARCH COUNCIL **Diet, Nutrition and Cancer.** Washington : D.C. , 1982. 85p.
- COOK-MAZAFFARI , P. J. , AZORDEGAN , F. , DAY , N. E. *et al.* case-control study. **Br. J. Cancer** , v. 39, n. 3, p. 293-309, 1979.
- COUNTS , J. L. , GOODMAN , J. I. Alterations in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. **Cell.** , v. 83, p. 13-5, 1995.
- CRADDOCK , V. M. Etiology of esophageal cancer: some operative factors. **Eur. J. Cancer Prev.** , v. 1, p. 89-103, 1992.
- CRAIN , R. C. Spontaneous tumors in the Rochester strain of the Wistar rat. **Am. J. Pathol.**, v. 34, p. 311-35, 1958.
- GREAGAN, E. T. , MOERTEL , C. G. , O'FALLON, J. R. Failure of high dose vitamin C (ascorbic acid) therapy to benefit patients with advanced cancer. **N. Engl. J. Med.** , v. 301, p. 687-91, 1979.
- DEVIK, O. G. Formation of N-nitrosamines by the Maillard reaction. **Acta Chem. Scand.** , v. 21, n. 8, p. 2302-3, 1967.
- DION, P. W. , BRIGHT-SEE , E. B. , SMITH, C.C. *et al.* The effect of dietary ascorbic acid and α -tocopherol on fecal mutagenicity. **Mutat. Res.** , v. 102, n. 1, p. 27-37, 1982.
- DIPLOCK , A. T. Safety of antioxidant vitamins and β -carotene. **Am. J. Clin. Nutr.** , v. 62, p. 1510s-6s, 1995.
- DOLL, R. , PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of Avoidable risks of cancer in the United States today. **J. Natl. Cancer Inst.** , v. 66, p. 1191-308, 1981.
- DRUCKREY, H. Chemische Konstitution und carcinogene Wirkung bei nitrosaminen. **Naturwissenschaften** , v. 48, p. 134-5, 1961.

- DRUCKREY , H. , PREUSSMAN , R. , BLUM , G. *et al.* Erzeugung van Karzinamen der Speiserohre demch unsummetrische Nitrosamine. **Naturwissenschaften**, v. 50, p. 100, 1963.
- DRUCKREY , H. , PREUSSMANN , R. , IVANKOVIC, S. *et al.* Organotrope carcinogen wirkungen bei 65 verschiedenen N-nitrosoverbindungen an BD-ratten. **Z. Krebsforsch.** , v. 69, p. 103-201, 1967.
- DRUCKREY , H. Organospecific carcinogenesis in the digestive tract. In: NAKAHARA, *et.al.* **Topics in chemical carcinogenesis**. Tokyo, University Park Press, p. 73-103, 1972.
- ENDER , F. , HARVE , G., HELGEBOSTAD , A. *et.al.* Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring. **Naturwissenschaften** , v. 51, p. 637-41, 1964.
- ENDER, F. , HARVE , G. N. , MADSEN , R. *et al.* Studies on conditions under which N-nitrosodimethylamine is formed in herring meal produced from nitrite preserved herring. **Z. Tierphysiol. Tierernahr. Futtermittelkd.** , v. 22, n. 3, p.181-9, 1967.
- EUFINGER , H. , GAEHTGENS, G. Ueber die Einwirkung des Vitamin C auf das pathologisch veränderte weisse Blutbild. **Klin. Wochenschr.** , v. 15, p. 150-6, 1936.
- FAN, T. Y. , TANNENBAUM , S. R. Stability of N-nitroso compounds. **J. Food Sci.** , v. 37, p. 274-6, 1972.
- FINE , D. H. , ROUNBEHLER , D. P. Trace analysis of volatile N-nitrosocompounds by combined gas chromatography and thermal energy analysis. **J. Chromatogr.** , v. 109, p. 271-9, 1975.
- FLEJOU , J. F. , POTET , F. , MUZEAU , F. *et al.* Overexpression of p53protein in Barrett's syndrome with malignant transformation. **J. Clin. Pathol.** , v. 46, p. 330-3, 1993.
- FOLKMAN , J. Editorial: Is tissue mass regulated by vascular endothelial cells? Prostate as the first evidence. **Endocrinology** , v. 139, n. 2, p. 441, 1998.

- FOOD AND NUTRITION BOARD. **Diet and health: implications for reducing chronic disease risk.** Washington : D.C. National Academy of Sciences, 1989. 150p.
- FRAGA , C .G. , SHIGENAGA , N. K., PARK , J. W. *et al.* Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** , v. 87, p. 4533-7, 1990.
- FRAGA , C. G. , SHIGENAGA , M. K. , HELBOCK , H. J. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** , v. 24, p. 1-4, 1991.
- FRANCIS , A. J. , ANDERSON , D. , JENKINSON , P. C. *et al.* The protective effects of L-ascorbic acid and DL- α -tocopherol on cultured rat embryos treated with xanthine/xanthine oxidase. **Mutat. Res.** , v. 214, p. 137-45, 1989.
- FRANK , N. , BERTRAM , B. , SCHERF , H. R.. *et al.* Influence of dithiocarbamates on the metabolism and toxicity of N-nitrosodimethylamine in rats. **Carcinogen.** , v. 11, p. 199-203, 1990.
- FREI , B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. **Am. J. Med.** , v. 97, s.3A, p. 5s-12s, 1994.
- FREUND , H. A. Clinical manifestations and studies in parenchymatous hepatitis. **Ann. Intern. Med.** , v. 10, p. 1144-55, 1937.
- FURUHATA , M. , OHTSUKI , Y. , OGOSHI , S. *et al.* Prognostic significance of human papillomavirus genomes (type 16,18) and aberrant expression of p53 protein in human esophageal cancer. **Int. J. Cancer** , v. 54, p. 226-30, 1993.
- GERSHOFF , S. N. Vitamin C (ascorbic acid): new roles, new requirements? **Nutr. Rev.** , v. 51, p. 313-26, 1993.
- GERSTER , H. β -carotene, vitamin E and vitamin C in different stages of experimental carcinogenesis. **Eur. J. Clin. Nutr.** , v. 49, p. 155-68, 1995.

- GIAMALVA , D. H. , CHURCH , D. T. , PRYOR , W. A. Kynetics of ozonation. Reactions of ozone with alphetocopherol and oleate and linoleate esters in carbon tetrachloride and in aqueous micellar solvents. **J. Am. Chem. Soc.** , v. 108, p. 6646-9, 1986.
- GLATTHAAR , B. E. , HORNIG , D. H. , MOSER , U. The role of ascorbic acid in carcinogenesis. **Adv. Exp. Med. Biol.** , v. 206, p. 357-77, 1986.
- GORI , G. B. Diet and cancer. **J. Am. Diet. Assoc.** , v. 71, n. 4, p. 375-9, 1977.
- GRAHAM , S. , METTLIN , C. , MARSHALL , J. *et al.* Dietary factors in the epidemiology of cancer of the larynx. **Am. J. Epidemiol.** , v. 113, p. 675-80, 1981.
- GRDISA , M. , KRALJ , M. , ECKERT-MAKSIC , M. *et al.* 6-amino-6-deoxyascorbic acid induces apoptosis in human tumor cells. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** , v. 121, p. 98-102, 1995.
- GRICIUTE , L. Carcinogenicity of N-nitrosocompounds and their possible role in the development of human cancer. **IARC Sci. Publ.** , v. 3, p. 3-9, 1978.
- GUENGERICH , F. P. **Cytochrome p450**. 2nd ed. New York : Plenum Press, 1996. p.7-29: Human cytochromes p450.
- GUIDELINES FOR THE CLINICAL AND PATHOLOGIC STUDIES ON CARCINOMA OF THE ESOPHAGUS (BY JAPANESE SOCIETY FOR ESOPHAGEAL DISEASES). **Jpn. J. Surg.** , v. 6, n. 2, p. 69-78, 1976.
- GUTTENPLAN , J. B. Mechanisms of inhibition by ascorbate of microbial mutagenesis induced by N-nitroso compounds. **Cancer Res.** , v. 38, p. 2018-22, 1978.
- HAENSZEL , W. , CORREA , P. Developments in the epidemiology of stomach cancer over the past decade. **Cancer Res.** , v. 35, p. 3452-9, 1975.
- HALL , P. A. , RAY , A. , LEMOINE , N. R. *et al.* p53 immunostaining as a marker of malignant disease in diagnostic cytopathology [Letter]. **Lancet** , v. 338, p.513, 1991.
- HALLIWELL , B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **Am. J. Med.** , v. 91, p. 14s-22s, 1991.

- HANCK , A. Tolerance and effects of high doses of ascorbic acid. Dosis facit venenum. **Int. J. Vitam. Nutr. Res. Suppl.** , v. 23, p. 221-38, 1982.
- HARRIS , C. C. , AUTRUP , H. , STONER , G. D. *et al.* 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.** v.39, n. 11, p. 4401-6, 1979.
- HARRIS , R. W. C. , KEY , T. J. A. , SILCOCKS , P. B. *et al.* A case-control study of dietary carotene in men with lung cancer and in men with other epithelial cancers. **Nutr. Cancer** , v. 15, p. 65-6, 1991.
- HAVERY , D. C. , CHOU , H. J. Nitrosamines in sunscreens and cosmetic products: occurrence, formation, and trends. In: LOEPPKY , R. N. , MICHEJDA, C. J. (ed.) **Nitrosamines and related N-nitroso compounds: chemistry and biochemistry.** Washington : D.C. American Chemical Society, 1994. (ACS Symposium Series) p. 20-33
- HECHT , S. S. Approaches to cancer prevention based on na uderstanding of N-nitrosamine carcinogenesis. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** , v. 216, n. 2, p. 181-91, 1997.
- HECHT , S. S. , HOFFMANN, D. Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. **Carcinogen.** , v. 9, p. 875-84, 1988.
- HECHT , S. S. , HOFFMANN , D. The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer. **Cancer Surv.** , v. 8, p. 273-94, 1989.
- HEMILÄ , H. Vitamin C and the common cold. **Br. J. Nutr.** , v. 67, p.3-16, 1992.
- HENNEKENS , C. H. Health promotion and disease prevention: the role of antioxidant vitamins. **Am. J. Med. Suppl.** , v. 97, n. 3A, p. 1s-4s, 1994.
- HENNEKENS , C. H. , BARING , J. , PETO , R. Antioxidant vitamins –benefit not yet prouved. **N. Engl. J. Med.** , v. 330, p. 1080-1, 1994.
- HERMAN , H. Identifizierung eines Stoffwechselproduktes von Clitocybesuavcolens als 4-methylnitrosamino-benzaldehyd. **Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.**, v. 326, p. 13-6, 1961.

- HEYDERMAN , E. , DAGG , B. p53 immunostaining in benign breast disease [Letter]. **Lancet** , v. 338, p. 1532, 1991.
- HINDS , M. W. , KOLONEL , L. N. , HANKIN , J. H. *et al.* Dietary vitamin A, carotene, vitamin C, and risk of lung cancer in Hawaii USA. **Am. J. Epidemiol.**, v.119, p. 227-37, 1984.
- HOFFMANN , D. , HECHT , S. S. Nicotine-derived N-nitrosamines and tobacco related cancer: current status and future directions. **Cancer Res.**, v. 45, p. 935-44, 1985.
- HOFFMANN , D. , BRUNNEMANN , K. D. , PROKOPCZK , B. *et al.* Tobacco-specific N-nitrosamines and areca-derived N-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. **J. Toxicol. Environ. Health**, v.41, p. 1-52, 1994.
- HOLLSTEIN , M. , SIDRANSKY , D. , VOGELSTEIN , B. *et al.* p53 mutations in human cancers. **Science** , v. 253, p. 49-53, 1991.
- HONG , J. Y. , SMITH , T. , LEE , M. J. *et al.* Metabolism of carcinogenic nitrosamines by rat nasal mucosa and the effect of diallyl sulfide. **Cancer Res.** v. 51, p. 1509-14, 1991.
- HOTCHKISS , J. H. A review of current literature on N-nitroso compounds in foods. **Adv. Food Res.** , v. 31, p. 53-115, 1987.
- HOTCHKISS , J. H. Preformed N-nitroso compounds in foods and beverages. **Cancer Surv.** , v. 8, p. 295-321, 1989.
- IRVING , C. C. , DANIEL , D. S. , MURPHY , W. M. The effect of disulfiram on the carcinogenicity of N-butyl-N-(3-carboxypropyl)nitrosamine in the rat. **Carcinogen.**, v. 4, p. 617-20, 1983.
- ISHIZAKI , H. , BRADY , J. F. , NING , S. M. *et al.* Effect of phenethyl isothiocyanate on microsomal N-nitrosodimethylamine metabolism and other monooxygenase activities. **Xenobiotica** , v. 20, p. 255-64, 1990.

- JAIN , M. , COOK , G. M. , DAVIS , F. G. *et al.* A case-control study of diet and colo-rectal cancer. **Int. J. Cancer** , v. 26, p. 757-68, 1980.
- JANSEN , J. D. Nutrition and cancer. **World Rev. Nutr. Diet** , v. 39, p. 1-22, 1982.
- JOHNSON , F. C. The antioxidant vitamins. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** , v.11, p. 217-310, 1979.
- JOHNSTON , C. S. , HUANG , S. N. Effect of ascorbic acid nutritive on blood histamine and neutrophil chemotaxis in guinea pigs. **J. Nutr.** , v. 121, p. 172-6, 1992.
- KAKAR , S. C. , WILSON , C. W. M. Ascorbic acid values in malignant disease. **Proc. Nutr. Soc.** , v. 35, p.9A-10A, 1976.
- KALLISTRATOS , G. , FASSKE , E. Inhibition of benzo[a]pyrene carcinogenesis in rats with vitamin C. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** , v. 97, p. 91-6, 1980.
- KALLNER , A. , HARTMANN , D. , HORNIG , D. Steady-state turnover and body pool of ascorbic acid in man. **Am. J. Clin. Nutr.** , v. 32, p. 530-9, 1979.
- KAUTIAINEN , T. L. , JONES , P .A. DNA methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture. **J. Biol. Chem.** , v. 261, p. 1594-8, 1986.
- KAWAMURA , T. , KOIKE , M. Histopathological meaning and lugol unstained area of esophageal lesion. **Stomach and Intestine** , v. 29, p. 875-82, 1994.
- KESSLER , H. , HUSEMANN , B. , WAGNER , W. Potential protectiveeffect of vitamin C on carcinogenesis caused by nitrosamine in drinking water: an experimental study on Wistar rats. **Eur. J. Surg. Oncol.** , v. 18, p. 275-81, 1992.
- KHUDOLEY , V., MALAVEILLE , C. , BARSTCH , H. Mutagenicitystudies in *Salmonella typhimurium* on some carcinogenic N-nitrosamines in vitro and in the host-mediated assay in rats. **Cancer Res.** , v. 41, p. 3205-10, 1981.
- KINSLER , T. W. , TAFFE , B. G. Free radicals in tumor promotion. **Adv. Free Rad. Biol. Med.** , v. 2, p. 347-88, 1986.

- KLENNER , F. R. Virus pneumonia and its treatment with vitamin C. **J. South Med. and Surg.** , v. 110, p.60-3, 1948.
- KLENNER , F. R. The treatment of poliomyelitis and other viral diseases with vitamin C. **J. South Med. and Surg.** , v. 111, p. 210-4, 1949.
- KLENNER , F. R. Observations on the dose and administration of ascorbic acid when employed beyond the range of a vitamin in human pathology. **J. App. Nutr.** , v.23, p. 61-88, 1971.
- KLENNER , F. R. Significance of high daily intake of ascorbic acid in preventive medicine. **J. Int. Acad. Prev. Med.** , v. 1, p. 45-9, 1974.
- KMET , J. , MAHBOUBI , E. Esophageal cancer in the Caspian littoral of Iran: initial studies. **Science** , v. 175, n. 24, p. 846-53, 1972.
- KOTO , H. , TACHIMORI , Y. , MIZOBUCHI , S. *et al.* Cervical, mediastinal, and abdominal lymph node dissection for superficial carcinoma of the thoracic esophagus. **Cancer** , v. 72, p. 2879-82, 1993.
- KRASNER , N. , DYMOCK , I. W. Ascorbic acid deficiency in malignant disease: a clinical and biochemical study. **Br. J. Cancer** , v. 30, p. 142-5, 1974.
- KRAUSE , M. V. , MAHAN , L. K. **Alimentos, nutrição & dietoterapia.** São Paulo: Roca 1991. p. 99-143 : Vitaminas.
- KRUEL , C. D. P. **Classificação cito-patológica das lesões precursoras do carcinoma escamoso do esôfago: modelo experimental em roedores.** São Paulo, 1992. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Escola Paulista de Medicina.
- KURODA , Y. Antimutagenic activity of vitamin C in cultured mammalian cells. **Mutat. Res.** , v. 164, p. 273, 1986.
- KURODA , Y. Antimutagenic mechanism of vitamin C and its derivatives in mammalian cells in culture. **Mutat. Res.** , v. 182, p. 365, 1987.

- KURODA , Y. Antimutagenic activity of vitamins in cultured mammalian cells. In: KURODA , Y. , SHANKEL , D. M., WATERS , M. D. (ed.) **Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms II**. New York : Plenum Press, 1990. p. 233-56.
- LACHANCE , P. Dietary intake of carotenes and the carotene gap. **Clin. Nutr.** , v. 7, p. 118-22, 1988.
- LAVAL , F. , WINK , D. A. Inhibition by nitric oxide of the repair protein O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase. **Carcinogen.** , v. 15, p. 443-7, 1994.
- LEAF , C. D. , WISHNOK , J. S. , TANNENBAUM , S. R. Mechanisms of endogenous nitrosation (review). **Cancer Surv.** , v. 8, p. 323-34, 1989.
- LEEMING , R. A. From the common cold to cancer: how evolution and the modern lifestyle appear to have contributed to such eventualities. **Med. Hypotheses**, v. 43, p. 145-50, 1994.
- LEHNINGER , A. L. **Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo, 1988. p.184-202: Vitaminas e microelementos na função de enzimas.
- LEUCHTENBERGER , C. , LEUCHTENBERGER , R. The effects of naturally occurring metabolites (L-cysteine, vitamin C) on cultured human cells exposed to smoke of tobacco or marijuana cigarettes. **Cytometry** , v. 5, p. 396-402, 1984.
- LIEBES , L. , KRIGEL , R. , KUO , S. *et al.* Increased ascorbic acid content in chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 78, p. 6481-4, 1981.
- LIJINSKY , W. Structure-activity relations in carcinogenesis by N-nitroso compounds. **Cancer and Metastasis Reviews** , v. 6, p. 301-56, 1987.
- LIJINSKY , W. Chemistry and biology of N-nitroso compounds. In: COOMBS, M. M. , ASHBY, J. , HICKS , M. (ed.) **Cambridge Monographs on Cancer Research**. Cambridge : United Kingdom, 1992. p. 251-403.

- LIU , R. H., BALDWIN , B. , TENNANT , B. C. *et al.* Elevated formation of nitrate and N-nitrosodimethylamine in woodchucks (*Marmota monax*) associated with chronic woodchuck hepatitis virus infection. **Cancer Res.** , v. 51, p. 3925-9, 1991.
- LUPULESCU , A. The role of vitamin A, β -carotene, E and C in cancer cell biology. Review. **Int. J. Vit. Nutr. Res.** , v. 63, p. 3-14, 1992.
- MAGEE , P. N. The experimental basis for the role of nitroso compounds in human cancer. **Cancer Surv.** , v. 8, p. 207-39, 1989.
- MAIANI , G. , AZZINI , E. , FERRO-LUZZI , A . Vitamin C. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v. 63, n. 4, p. 289-95, 1993.
- MANDAL, S. , SHIVAPURKARM , N. M., GALATI , A. J. *et al.* Inhibition of N-nitrosobenzylmethylamine metabolism and DNA binding in cultured rat esophagus by ellagic acid. **Carcinogen.** , v. 9, p. 1313-6, 1988.
- MANDAL , S. , STONER , G. D. Inhibition of N-nitrosobenzylmethylamine-induced esophageal tumorigenesis in rats by ellagic acid. **Carcinogen.** , v. 11, p. 55-61, 1990.
- MANDARD , A. M. , MARNAY , J. , VILLEDIEU , B. *et al.* Autopsy findings in 111 cases of esophageal cancer. **Cancer** , v. 48, p. 329-35, 1981.
- MANDARD , A. M. , MARNAY , J. , GIGNOUX , M. *et al.* Cancer of the esophagus and associated lesions: detailed pathologic study of 100 esophagectomy specimens. **Hum. Pathol.** , v. 15, p. 660-9, 1984.
- MARCUS , R. , COULSTON , A. M. The vitamins. In: GOODMAN GILMAN, A. , RALL, T. W. , NIES , A. S. *et al.* (ed.) **The pharmacological basis of therapeutics**. 18. ed. New York : Macmillan Publishing, 1992. p. 1523-71.
- MARLETTA , M. A. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. **Chem. Res. Toxicol.** , v. 1, p. 249-57, 1988.

- MARSHALL , J. , GRAHAM , S. , METTLIN , C. *et al.* Diet in the epidemiology of oral cancer. **Nutr. Cancer** , v. 3, p. 145-9, 1982.
- MEDHAT , A. M. , ABDELWAHAB , K. S. E. D. , EL AASER , A. A. *et al.* Soybean and ascorbate feeding in experimental carcinogenesis: immunological studies. **Tumori** , v. 77, p. 372-8, 1991.
- MEISTER , A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. **J. Biol. Chem.** , v. 269, p. 9397-9400, 1994.
- METTLIN , C. , GRAHAM , S. , PRIORE , R. *et al.* Diet and cancer of the esophagus. **Nutr. Cancer** , v. 2, n. 3, p. 143-7, 1981.
- MIRVISH, S. S. Experimental evidence for inhibition of N-nitroso compound formation as factor in the negative correlation between vitamin C consumption and certain cancers. **Cancer Res. Suppl.** , v. 54, p. 1948s-51s, 1994.
- MIRVISH , S. S. The etiology of gastric cancer: intragastric nitrosamide formation and other theories. **J. Natl. Cancer Inst.** , v. 71, p. 629-47, 1983.
- MIRVISH , S. S. , WALLACE , L. , EAGEN , M. *et al.* Ascorbate-nitrite reaction possible means of blocking the formation of carcinogenic n-nitroso compounds. **Science**, v. 177 , n. 43, p. 65-8, 1972.
- MIRVISH , S. S. , HUANG , Q. , CHEN , S. C. *et al.* Metabolism of carcinogenic nitrosamines in the rat and human esophagus and induction of esophageal adenocarcinoma in rats. **Endoscopy Suppl.** , v. 25, p. 626-31, 1993.
- MISUMI , A. , HARADA , K. , MURAKAMI , A. *et al.* Role of lugol dye endoscopy in the diagnosis of early esophageal cancer. **Endoscopy** , v. 22, p. 12-6, 1990.
- MOCHIZUKI , M. , ANJO , T. , OKADA , M. Isolation and characterization of N-alkyl-N-(hydroxymethyl)nitrosamines from N-alkyl-N-(hydroperoxymethyl)nitrosamines by deoxygenation. **Tetrahedron. Lett.** , v. 21, p. 3693-6, 1980.

- MOKHTAR , N. M. , EL-AASER , A. A. , EL-BOLKAINY , M. N. *et al.* Effect of soybean feeding on experimental carcinogenesis - III. Carcinogenicity of nitrite and dibutylamine in mice: a histopathological study. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.** , v. 24, p. 403-11, 1988.
- MONTESANO , R. , HOLLSTEIN , M. , HAINAUT , P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. **Int. J. Cancer** , v. 69, n. 3, p. 225-35, 1996.
- MORIGAKI , T. , ITO , Y. Intervening effect of L-ascorbic acid on Epstein-Barr virus activation in human lymphoblastoid cells and its comparison with the effect of retinoic acid. **Cancer Lett.** , v. 15, p. 255-9, 1982.
- MOSER , U. Uptake of ascorbic acid by leucocytes. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.498, p. 200-15, 1987.
- MURATA , A. , MORISHIGE , F. , YAMAGUCHI , H. Prolongation of survival times of terminal cancer patients by administration of large doses of ascorbate. **Int. J. Vitam. Nutr. Res. Suppl.** , v. 23, p. 103-13, 1982.
- MURPHY , S. P. , SUBAR , A. F. , BLOCK, G. Vitamin E intakes and sources in the United States. **Am. J. Clin. Nutr.** , v. 52, p. 361-7, 1990.
- NAGAMATSU , M. , MORI , M. , KUWANO , H. *et al.* Serial histologic investigation of squamous epithelial dysplasia associated with carcinoma of the esophagus. **Cancer**, v. 69, p. 1094-8, 1992.
- NAPALKOV , N. P. , POZHARISSEKI , K. M. Morphogenesis of experimental tumors of the esophagus. **J. Natl. Cancer Inst.** , v. 42, p. 922-40, 1969.
- NATH , J. , GALLIN , J. I. Effect of vitamin C on tubulin tyrosination in polymorphonuclear leucocytes. **Am. N.Y. Acad. Sci.** , v. 498, p. 216-28, 1987.
- NISHIKAWA , A. , CHUNG , F. L. , FURUKAWA , F. *et al.* Chemopreventive effects of phenethyl and 3-phenylpropyl isothiocyanate on pancreatic carcinogenesis initiated with N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in hamsters. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.** , v. 36, p. 126, 1995.

- NISHIKIMI , M. , UDERFRIEND , S. Scurvy as an inborn error of ascorbic acid biosynthesis. **TIBS** , p. 111-3, may, 1980.
- NORKUS , E. P. , UENZIG , W. A. Studies on the antimutagenic activity of ascorbic acid in vitro and in vivo. **Carcinogen.** , v. 6, p. 1593-8, 1985.
- O'CONNOR , H. J. , HABIBZEDAH , N. , SCHORAH , C. J. *et al.* Effect of increased intake of vitamin C on the mutagenic activity of gastric juice and intragastric concentrations of ascorbic acid. **Carcinogen.** , v. 6, p. 1675-6, 1985.
- O'CONNOR , H. J. , SCHORAH , C. J. , HABIBZEDAH , N. *et al.* Vitamin C in the human stomach, relation to gastric pH, gastroduodenal disease and possible sources. **Gut**, v. 30, p. 436-42, 1989.
- OHSHIMA , H. , BARTSCH , H. Quantitative estimation of endogenous nitrosation in humans by monitoring N-nitrosoproline excretion in the urine. **Cancer Res.** , v. 41, p. 3658-66, 1981.
- PADH , H. Cellular functions of ascorbic acid. **Biochem. Cell. Biol.** , v. 68, p. 1166-73, 1990.
- PADH , H. , ALEO , J. J. Activation of serum complement generates inhibition os ascorbate transport. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** , v. 498, p. 502-5, 1987.
- PANUSH , R. S. , DELA FUENTE, J. C. Modulation of certainimmunological responses by vitamin C. In: HANCK , A. , RITZEL , G. (ed.) **Vitamin C**. Hans Huber Publishers, 1979. p. 179-99.
- PARENTI , A. R. , RUGGE , M. , FRIZZERA , E. *et al.* p53 overexpression in the multistep process of esophageal carcinogenesis. **Am. J. Surg. Pathol.** , v. 19, n.12, p. 1418-22, 1995.
- PARK , C. H. A. , MARE , M. , SAVIN , M. A. Growth supression of human leukemic cells in vitro by L-ascorbic acid. **Cancer Res.** , v. 40, p. 1062-5, 1980.

- PARKIN , D. M. , PISANI , P. , FERLAY , J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancer in 1985. **Int. J. Cancer** , v. 54, n. 4, p. 594-606, 1993.
- PAULING , L. **Vitamin C and the common cold**. San Francisco : W.H. Freeman, 1970. 67 p.
- PETO , R. , DOLL , R. , BUCKLEY , J. D. *et al.* Can dietary β -carotene materially reduce human cancer rates. **Nature** , v. 290, p. 201-8, 1981.
- PETO , R. , GRAY , R. , BRANTOM , P. Effects on 4080 rats of chronic administration of N-nitrosodiethylamine or N-nitrosodimethylamine: a detailed dose-response study. **Cancer Res.** , v. 51, p. 6415-51, 1991.
- PIENTENPOL , J. A. , VOGELSTEIN , B. Tumor supressor genes: no room at the p53 inn. **Nature** , v. 365, p. 17-8, 1993.
- PISANI , P. , PARKIN , D. M. , FERLAY , J. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. **Int. J. Cancer** , v. 55, n. 6, p. 891-903, 1993.
- PREUSSMANN , R. , STEWART , B. W. N-nitroso carcinogens. In: SEARLE, C. (ed.) **Chemical carcinogens**. Washington : American Chemical Society, 1981. p. 643-828. (Monograph 182, v. 2).
- PREUSSMANN , R. , EISENBRAND, G. N-nitroso carcinogens in the environment. In: SEARLE, C. (ed.) **Chemical Carcinogens**. Washington : American Chemical Society, 1984. p. 829.
- PROLLA, J. C. , DIETZ , J. , DA COSTA , L. A. Diferenças geográficas na mortalidade por câncer de esôfago no Rio Grande do Sul. **Rev. Ass. Med. Bras.** , v. 39, n.4 , p. 217-20, 1993.
- PRYOR , W. A. Free radicals and peroxides in the etiology of cancer. **Oncology Overview**. National Cancer Institute , v. 1, p. 7-13, 1987.

- PURDIE , C. A. , O'GRADY , J. , PIRIS , J. p53 expression in colorectal tumors. **Am. J. Pathol.** , v.1 38, p. 807-13, 1991.
- PURTILLO , D. T. , COHEN , S. M. Diet, nutrition and cancer: an update on a controversial relationship. **Postgrad. Med.** , v. 78, n. 1, p. 193-203, 1985.
- RAHIMTULA , A. D. , ZACHARIAH , P. K. , O'BRIEN , P. J. The effects of antioxidants on the metabolism and mutagenicity of benzo[a]pyrene in vitro. **Biochem. J.** , v. 164, p. 473-5, 1977.
- RAINA , V. , GURTOO , H. L. Effects of vitamins A, C and E on aflatoxin B₁-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. **Teratogen. Carcinogen. Mutagen.** , v. 5, p. 29-40, 1985.
- RATHBONE , B. J. , JOHNSON, A. W. , JONES , C. *et al.* Gastric juice "secretion" of ascorbic acid. **Proc. Nutr. Soc.** , v. 45, p. 69A, 1986.
- RAUTALAHTI , M. , HUTTUNEN, J. Antioxidants and carcinogenesis. **Ann. Med.** , v. 25, p. 435-41, 1993.
- REED , P. I. , SUMMERS , K. , SMITH , P. L. *et al.* Effect of gastric surgery for benign peptic ulcer and ascorbic acid therapy on concentrations of nitrite and N-nitroso compounds in gastric juice. **IARC Sci. Publ.** , v. 57, p. 975-9, 1984.
- REDDY , B. S. , HIROTA , N. , KATAYAMA, S. Effect of dietary sodium ascorbate on 1,2-dimethylhydrazine- or methylnitrosourea- induced colon carcinogenesis in rats. **Carcinogen.** , v. 3, p. 1097-9, 1982.
- REH , B. D. , FAJEN , J. M. Worker exposures to nitrosamines in a rubber vehicle sealing plant. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.** , v. 57, p. 918-23, 1996.
- REID , B. J. , SANCHEZ , C. A. , BLOUNT , P. L. *et al.* Barrett's esophagus: cell cycle abnormalities in advancing stages of neoplastic progression. **Gastroenterology** , v. 105, p. 119-29, 1993.

- REUBER , M. D. Carcinomas of the esophagus in rats with diethylnitrosamine. **Eur. J. Cancer** , v. 11, p.97-9, 1975.
- REUBER , M. D. Effect of age and sex on lesions of the esophagus in Buffalo Strain Rats ingesting diethylnitrosamine. **Expl. Cell. Biol.** , v. 44, p. 65-72, 1976.
- REUBER , M. D. Histopathology of preneoplastic lesions of the esophagus in BUF rats ingesting diethylnitrosamine. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 58, p. 313-21, 1977.
- RIBEIRO PINTO , L. F. **Cytocrome p450**. Paris, 1994. p. 681-3.
- RONEN , D. , ROTTER , V. , REISMAN , D. Expression from the murine p53 promoter is mediated by factor binding to a downstream helix-loop-helix recognition motif. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** , v. 88, p. 4128-32, 1991.
- ROSENBERG , J. C. , SCHWAD , J. G. , VAITKEVICIUS , V. K. Cancer of the esophagus. In: DEVITTA , V. T. , HELLMAN , S. , OSENBURG , S. (ed.) **Cancer principals and practice of oncology**. Philadelphia : PB Lippincott , 1985. P. 621-57.
- ROSIN , M. P. , STICH , H. F. Assessment of the use of the Salmonella mutagenesis assay to determine the influence of antioxidants on carcinogen-induced mutagenesis. **Int. J. Cancer** , v. 23, p. 722-7, 1979.
- ROTKIN , I. D. Studies in the epidemiology of prostatic cancer: expanded sampling. **Cancer Treat. Rep.** , v. 61, p. 173-80, 1977.
- RUBIO , C. A. Experimental models. In: PFEIFFER , C. J. **Cancer of the esophagus**. U.S.A. , 1982. v. 3, p. 139-68.
- RUBIO , C. A. Epithelial lesions antedating esophageal carcinoma. Histologic study in mice. **Pathol. Res. Pract.** , v. 176, p. 269-75, 1983.
- SALLET , J. A. **Carcinogênese esofágica experimental : contribuição ao estudo da histogênese do carcinoma epidermóide**. São Paulo, 1996. 110p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Campinas.

- SANDER , J. , BUERKLE , G. Induction of malignant tumors in rats by simultaneous feeding of nitrite and secondary amines. **Z. Krebsforsch** , v. 73, p. 54-66, 1969.
- SANDERS , C. L., MAHAFFEY , J. A. Action of vitamin C on pulmonary carcinogenesis from inhaled $^{239}\text{PuO}_2$. **Health Phys.** , v. 45, p. 794-8, 1983.
- SARBIA , M. , PORSCHEN , R. , BORCHARD , F. *et al.* p53 protein expression and prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Cancer** , v. 74, p. 2218-23, 1994.
- SCHILLER , W. Early diagnosis of carcinoma of the cervix. **Surg. Gyn. Obst.** , v. 56, p. 210-22, 1933.
- SCHMÄHL , D. , HAMPERL , H. Leberkrebserzeugende Wirkung von Diäthylnitrosamin nach oraler Gabe bei Ratten. **Naturwissenschaften** , v. 48, p. 134-45, 1961.
- SCHORAH , C. J. , SOBALA , G. M. , SANDERSON , M. *et al.* Gastric juice ascorbic acid: effects of disease and implications for gastric carcinogenesis. **Am. J. Clin. Nutr.** , v. 53, p. 287s-93s, 1991.
- SHAH , G. M. , BHATTACHARYA , R. K. In vivo effect of L-ascorbic acid on benz[a]pyrene metabolite-DNA adduct formation in rat liver. **J. Biosci.** , v. 4, p. 263-7, 1982.
- SHIAO , Y.H. , RUGGE , M. , CORREA , P. *et al.* p53 alteration in gastric precancerous lesions. **Am. J. Pathol.** , v. 144, p. 511-7, 1994.
- SHIMAYA , K. , SHIOZAKI , H. , INOUE , M. *et al.* Significance of p53 expression as a prognostic factor in oesophageal squamous cell carcinoma. **Virchows Archiv. A. Pathol. Anat. Histopathol.** , v. 422, p. 271-6, 1993.
- SIDDIQI , M. , TRICKER , A. R. , PREUSSMANN , R. Formation of N-nitroso compounds under simulated gastric conditions from Kashmir foodstuffs. **Cancer Letters** , v. 39, n. 3, p. 259-65, 1988.
- SINGH , D. , GODBOLE , A.G. A study of plasma and gastric juice ascorbic acid in peptic ulcer disease. **Assoc. Phys. India** , v. 16, p. 833-7, 1968.

- SINGH , N. V. , GABY , S. K. Premalignant lesions: role of antioxidant vitamins and β -carotene in risk reduction and prevention of malignant transformation. **Am. J. Clin. Nutr.** , v. 53, p. 386s-90s, 1991.
- SPIEGELHALDER , B. , WACKER , C. D. Prevention of nitrosamine exposure in the rubber industry. In: LOEPPKY , R. N. , MICHEJDA , C. J. (ed.) **Nitrosamines and related N-nitroso compounds**. Washington : American Chemical Society, 1994. p. 42-51. (ACS Symposium Series, v. 553).
- SPORN , M.B. Carcinogenesis and cancer: different perspectives on the same disease. **Cancer Res.** , v. 51, p. 6215-8, 1991.
- STAEHELIN , H. B. , BUESS , E. , BRUBACHER , G. Karzinom-Mortalität und Ernährung. **Prakt. Arzt.** , v. 37, p. 1625-9, 1983.
- STINSON , S. F. Esophageal carcinoma. Animal model: esophageal in the rat induced with methylalkyl-nitrosamines. **Am. J. Path.** , v. 96, p. 871-4, 1979.
- STREET , J. C. , CHADWICK , W. R. Ascorbic acid requirements and metabolism in relation to organochlorine pesticides. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** , v. 258, p. 132-43, 1975.
- SUGIMACHI , K. , MATSUOKA , H. , OHNO , S. *et al.* Multivariate approach for assessing the prognosis of clinical esophageal carcinoma. **Br. J. Surg.** , v. 75, p.1115-8, 1988.
- SUGIMACHI , K. , MATSUDA , H. , MORI , M. *et al.* Proposed new criteria for early carcinoma of the esophagus. **Surg. Gyn. Obst.** , v. 173, p. 303-8, 1991.
- SUGIMACHI , K. , TOH , Y. , MATSUDA , H. *et al.* Long-term results of esophagectomy for early esophageal carcinoma. **Hepato-Gastroenterol.** , v. 40, p.203-6, 1993.
- SUGIMACHI , K. , YASUDA , M. , WATANABE , M. *et al.* Carcinogenesis and histogenesis of esophageal carcinoma. **Cancer Suppl.** , v. 75, p. 1440-5, 1995.

- TAMURA , G. , MAESAWA , C. , SUZUKY , Y. *et al.* p53 gene mutations in oesophageal cancer by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. **Jps. J. Cancer. Res.** , v. 83, p. 559-62, 1992.
- TANIGUCHI , N. , PICKETT , C. B. , GRIFFITH , O. W. Oxy radicals and antioxidative responses in cancer: 12th Sapporo Cancer Seminar. **Cancer Res.** v. 53, p. 3207-10, 1993.
- TANNENBAUM , S. R. Endogeneous formation of nitrite and N-nitroso compounds. In: MILLER , E. C. (ed.) **Naturally occuring carcinogens-mutagens and modulators of carcinogenesis.** Baltimore : University Park Press, 1979. p. 211-20.
- TANNENBAUM , S. R. , WISHNOK , J. S. , LEAF , C. D. Inhibition of nitrosamine formation by ascorbic acid. **Am. J. Clin. Nutr.** , v. 53, p. 247s-50s, 1991.
- TANNENBAUM , S. R. , YOUNG , V. R. Endogenous nitrate formation in man. **J. Environ. Pahtol. Toxicol.** , v. 3, p. 357-68, 1980.
- TERWEL , L. , VAN DER HOEVEN , J. C. M. Antimutagenic activity of some naturally occurring compounds towards cigarette-smoke condensate and benzo[a]pyrene in the Salmonella/microsome assay. **Mutat. Res.** , v. 152, p. 1-4, 1985.
- TRICKER , A. R. , SPIEGELHALDER , B. , PREUSSMANN , R. Environmental exposure to preformed nitroso compounds. **Cancer Surv.** , v. 8, p. 251-72, 1989.
- TUYNS , A. J. Epidemiology of alcohol and cancer. **Cancer Res.** , v. 39, p. 2840-3, 1979.
- VOEGUELI , R. Die Schillersche jodprobe im rahmen der osophagusdiagnostik: vorläufige mitteilung. **Pract. Oto. Rino. Laryng.** , v. 28, p. 230-9, 1966.
- WACHSMAN , J.T. DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis. **Mutat. Res.** , v. 375, p. 1-8, 1997.
- WALDO , A. L. , ZIPF , R. E. Ascorbic acid level in leukemic patients. **Cancer**, v.8, p. 187-90, 1955.

- WANG , L. D. , HONG , J. Y. , QUI , S. *et al.* Accumulation of p53 protein in human esophageal precancerous lesions: a possible early biomarker for carcinogenesis. **Cancer Res.** , v. 53, p. 1783-7, 1993.
- WANG , Z. Y. , HONG , J. Y. , REUHL , K. R. *et al.* Inhibition of N-nitrosodiethylamine- and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone- induced tumorigenesis in A/J mice by green tea and black tea. **Cancer Res.**, v.52, p.1943-7, 1992.
- WARGOVICH , M. J. , WOODS , C. , ENG , V. W. S. *et al.* Chemoprevention of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats by the naturally occurring thioether, diallyl sulfide. **Cancer Res.** , v. 48, p. 6872-75, 1988.
- WARREN , F. L. Aerobical oxidation of aromatic hydrocarbons in the presence of ascorbic acid. **Biochem. J.** , v. 37, p. 338-45, 1943.
- WASSTERTHEIL-SMOLLER , S. , ROMNEY , S. L. , WYLIE-ROSETT , J. *et al.* Dietary vitamin C and uterine cervical dysplasia. **Am. J. Epidemiol.** , v. 114, p. 714-24, 1981.
- WATERHOUSE , J. A. H. **Cancer incidence in five continents.** Lyon : IARC, 285 p. 1982.
- WATTENBERG , L. W. Inhibitory effects of benzyl isothiocyanate administered shortly before diethylnitrosamine or benzo[a]pyrene on pulmonary and forestomach neoplasia in A/J mice. **Carcinogen.** , v. 8, p. 1971-3, 1987.
- WATTENBERG , L. W. , SPARNINS, V. L., BARANY, G. Inhibition of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. **Cancer Res.** , v .49, p. 2689-92, 1989.
- WEINBERG , R. A. Oncogenes, antioncogenes, the molecular bases of multistep carcinogenesis. **Cancer Res.** , v. 49, p. 3713-21, 1989.
- WILKINSON , J. T. , MORSE , M. A. , KRESTY , L. A. *et al.* Effect of alkyl chain length on inhibition of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal tumorigenesis and DNA methylation by isothiocyanates. **Carcinogen.** , v. 16, p. 1011-5, 1995.

- WILSON , V. L. , JONES , P. A. Inhibition of DNA methylation by chemical carcinogens in vitro. **Cell.** , v. 32, p. 239-46, 1983.
- WINN , D. M. , ZIEGLER , R. G. , PICKLE , L. W. *et al.* Diet in the etiology of oral and pharyngeal cancer among women from the southern USA. **Cancer Res.** , v.44, p. 1216-22, 1984.
- YAMANAKA , W. K. Vitamins and cancer prevention. How much do we know? **Postgrad. Med.** , v. 82, p. 149-53, 1987.
- YANG , C. S. Research on esophageal cancer in China: a review. **Cancer Res.**, v.40, p. 2633-44, 1980.
- YANG , C. S. , MIAO , J. , WENXIAN , Y. *et al.* Diet and vitamin nutrition of the high esophageal cancer risk in Linxian, China. **Nutr. Cancer** , v. 4, p. 154-64, 1982.
- YANG , C. S. , YOO , J. S. H. *et al.* Cytochrome P450III_{E1}: roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. **Drug Metab. Rev.** , v. 22, p. 147-59, 1990.
- YIN , Y. , TAINSKY , M. A. , BISCHOFF , F. Z. *et al.* Wild-type p53 restored cell cycle controls and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. **Cell.** , v. 70, p. 937-48, 1992.
- YOUNES , M. , LEOVITZ , R.M. , LECHAGO , L. V. *et al.* p53 protein accumulation in Barrett's metaplasia, dysplasia and carcinoma: a follow-up study. **Gastroenterology** , v. 105, p. 1637-42, 1993.
- YOUNG , V. R. , NEWBERNE , P. M. Vitamins and cancer prevention: issues and dilemmas. **Cancer** , v. 47, p.1226-40, 1981.
- XIAO , W. , SAMSON , L. In vivo evidence for endogenous DNA alkylation damage as a source of spontaneous mutation in eukariotic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** , v. 90, p. 2117-21, 1993.
- ZENG , Y. , OHSHIMA , H. , BOUVIER , G. *et al.* Urinary excretion of nitrosamino acids and nitrate by inhabitants of high and low-risk areas for nasopharyngeal cancer in southern China. **Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev.** , v.2, p. 195-200, 1993.

ZILBERSTEIN , B. **Esofagectomia cérvico-abdominal por via transdiafragmática no tratamento cirúrgico do câncer do esôfago: resultados e evolução a longo prazo.** São Paulo, 1988. 94 p. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ANDERSON , R. Ascorbate-mediated stimulation of neutrophil motility and lymphocyte transformation by inhibition of the peroxide/H₂O₂/halide system in vitro and in vivo. **Am. J. Clin. Nutr.** , v. 34, n. 9, p. 1906-11, 1981.

ANDERSON , R. THERON , A . Physiological potential of ascorbate, B- carotene and a-tocopherol individually and in the prevention of tissue damage carcinogenesis and immune dysfunction mediated by phagocyt- derivved. **World Rev Nutr. Diet.** , v. 62, p. 27-58, 1990.

BARNES , L. A . Some toxic effects of vitamin C. In: HAUCK , A . , RITZEL , G. (ed.) **Reevaluation of vitamin C.** Verlag, 1997. p 23-9.

BERTRAM , J. S. , KOLONEL , L. N. , MEYSKENS JUNIOR , F. L. Rationale and strategies for chemoprevention of cancer in humans. **Cancer Res.** , v. 47, n. 11, p. 3012-31, 1987.

BLOT , W. J. , LI , J. Y. , TAYLOR , P. R. *et al.* Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with especific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. **J. Natl. Cancer Inst.** , v. 85, p. 1483-92, 1993.

BRUCE , W. R. , VARGHESA , A. J. , FURNER , R. *et al.* A mutagen in the feces of normal humans. In: **Origins of human cancer.** New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1977. p. 1641-2.

- CHATERJEE , I. B. Ascorbic acid metabolism. **World Rev . Nutr. Diet.** , v. 30, p. 69-87, 1978.
- DE COSSE , J. J. , ADAMS , M. B. , KUZMA , J. F. *et al.* Effect of ascorbic acid on rectal polyps. **Surgery** , v. 78, p. 608-12, 1975
- HATHCOCK , J. N. , COON , J. **Nutrition and drug interrelationships.** New York, : Academic Press, 1978. 927p.
- ISSENBERG , J. N. Nitrite, nitrosamines and cancer. **Fed. Proc.** , v. 35, p. 1322-6, 1976.
- KOJIMA , H. , KONISHI , H. , KURODA , Y. Effects of L-ascorbic acid on the mutagenicity of ethyl methanesulfonate in cultured mammalian cells. **Mutat. Res.** , v. 266, p. 85-91, 1992.
- MIGLIOZZI , J. A . Effect of ascorbic acid on tumor growth. **Br. J. Cancer** , v. 35, p. 448-543, 1977.
- MIRVISH , S. S. N-nitroso compounds: their chemical and in vivo formation and possible importance as environmental carcinogens. **J. Toxicol. Environ Health** , v.2, p. 1267-77, 1977.
- MOERTEL , C. G. , CREAGAN , E. T. Letter to editor. **N. Engl. J. Med.** , v. 302, p. 694-5, 1980.
- OCKÉ , M. C. , KROMHOUT , D. , MENOTTI , A . *et al.* Average intake of anti-oxidant (pro) vitamins and subsequent cancer mortality in the 16 cohorts of the seven countries study. **Int. J. Cancer** , v. 61, p. 480-4, 1995.
- ODIN , A. P. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. **Mutat. Res.** , v. 386, p. 39-67, 1997.
- PACKER , J. E. , SLATER , T. F. , WILLSON , R. L. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. **Nature** v. 278, p. 737-8, 1979.

- PADH , H. Vitamin C: newer insights into its biochemical functions. **Nutr. Rev.** , v. 49, p. 65-70, 1991.
- RAINERI , R. , WEISBERGER , J. H. Reduction of gastric carcinogens with ascorbic acid. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** , v. 258, p. 181-9, 1975.
- RIVLIN , R. S. Riboflavin and cancer: a review. **Cancer Res.** , v. 33, p. 1977-86, 1973.
- ROUSSEAU , E. J. , DAVISON , A. J. , DUNN , B.. Protection by beta-carotene anrelated compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and genotoxicity: implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis. **Free Radic. Biol. Med.** , v. 13, n.4, p. 407-33, 1992.
- RUBIO , C. A. , LIU , F. , CHEJFEC , G. The induction of esophageal tumors in mice: dose and time dependency. **In Vivo** , v. 1, p. 35-8, 1987.
- SCHMIDT , K. , MOSER , U. Vitamin C - a modulator of host defense mechanism: an overview. **Int. J. Vitam. Nutr. Res. Suppl.** , v. 27, p. 363-79, 1985.
- STRYER , L. **Bioquímica**. 3.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1992. p. 265-6: Vitaminas.
- THERON , A. J. Physiological potential of ascorbate, B-carotene and a- tocopherol individually and a-tocopherol individually and in combination in the prevention of tissue damage, carcinogenesis and immune dysfunction mediated by phagocyte-derived reactive oxidants. **World Rev. Nutr. Diet.** , v. 62, p. 27-58, 1990.
- VAN RENSBERG , S. J. , COOK-MOZAFFARI , P. , VAN SCHALKWYK , D. J. *et al.* Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. **Br. J. Comm.**, v. 51, p. 713-26, 1985.
- WANG , Z. Y. , WANG , L. D. , LEE , M. J. *et al* . Inhibition of N-nitrosomethylbenzylmanine- induced esophageal tumorigenesis in rats by green and black tea. **Carcinogen.** , v. 16, p. 2143-8, 1995.

- WEISBERGER , J. H. , RAINERI , R. Dietary factors and the etiology of gastric cancer. **Cancer Res.** , v. 35, p. 3469-74, 1995.
- WEISBERGER , J. H. Mechanism of action of diet as a carcinogen. **Nutr. Nutr. Cancer** , v. 1, p. 74-81, 1979.

9. APÊNDICES

Tabela 19: Quantidade de vitamina C em alguns alimentos selecionados

ALIMENTO	QUANTIDADE	VITAMINA C (mg)
Kiwi	1	265
Brócolis		
Fresco	1 talo inteiro	162
Congelado	½ xícara	52
Couve-de-bruxelas	8	146
Pimentão doce verde	1	94
Cantalupo	½ melão (cerca de 13cm de diâmetro)	90
Couve-manteiga (cozida)	½ xícara	72
Pimentão		
Doce	1	70
Verde com molho picante (enlatado)	½ xícara	83
Vermelho com molho picante (enlatado)	½ xícara	37
Laranja	1 (7,5cm de diâmetro)	66
Suco de laranja		
Fresco	½ xícara	62
Congelado diluído	½ xícara	60
Enlatado	½ xícara	50
Couve cozida	½ xícara	51
Nabo verde	½ xícara	50
Morangos	½ xícara	44
Grapefruit	½	37
Suco de grapefruit enlatado, não adoçado	½ xícara	42
Tomates		
Frescos	1 (7,5cm de diâmetro)	42
Enlatados	½ xícara	21
Suco	½ xícara	20
Manga	½ xícara	40
Papaia	½ xícara (cubos 1 cm)	39
Limão	1 (7,5cm de diâmetro)	39
Melão	1/10 (16,5cm de diâmetro)	35
Couve-flor cozida	½ xícara	35
Mostarda verde cozida	½ xícara	34
Batata		
Assada, descascada depois	1 média	31
Cozida, descascada depois	1 média	22
Descascada, cozida depois	1 média	18
Purê	½ xícara	11
Frita	10	7
Chips	10	3
Melancia	1 fatia (15cm diâmetro por 2,5cm)	30
Batata-doce assada ou cozida	1 média	25
Espinafre		
Fresco	½ xícara	25
Congelado	½ xícara	25
Enlatado	½ xícara	16
Repolho cozido	½ xícara	24
Tangerina	1 (6,5cm de diâmetro)	22
Repolho picado	½ xícara	21
Quiabo cozido	10 vagens de 7,5cm	21
Suco de arando	½ xícara	20
Acerola	100g	1300

Fonte: KRAUSE & MAHAN, 1991

COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO UTILIZADA

NUVILABCR - Código de Produto 6003

Composição básica do produto: carbonato de cálcio, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, milho integral moído, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral aminoácido, farinha de peixe, farinha de carne.

Eventuais substitutivos: farelo de alfafa, farelo de arroz, farelo de girassol, farelo de milho, farinha de conchas de ostras tipo 1, farinha de penas hidrolizadas, farinha de sangue, soro de leite em pó, cevada, gordura animal estabilizada, solúveis de pescado dessecados.

Níveis de garantia por quilograma do produto:

Cálcio (máx.).....	1,40%
Extrato etéreo (mín)	3,00%
Fósforo (mín.)	0,60%
Matéria fibrosa (máx.)	9,00%
Matéria mineral (máx.)	10,00%
Proteína bruta (mín.)	22,00%
Umidade (máx.)	12,50%

Enriquecimento por quilograma do produto:

Vitaminas: Vitamina A 25.200 UI; Vitamina D 2.100 UI; Vitamina E 60,00 mg; Vitamina K 12,50 mg; Vitamina B1 14,40 mg; Vitamina B2 11,00 mg; Vitamina B6 12,00 mg; Vitamina B12 6,00 mcg; Ácido nicotínico 52,50 mg; Ácido pantotênico 112,00 mg; Ácido fólico 6,00 mg; Biotina 0,26 mg; Colina 100,00 mg.

Microelementos minerais: Ferro 50,00 mg; Zinco 60,00 mg; Cobre 10,00 mg; Iodo 2 mg; Manganês 60,00 mg; Selênio 0,05 mg; Cobalto 1,50 mg.

Aminoácidos: Metionina 300,00 mg; Lisina 100,00 mg.

Aditivo: Antioxidante 100,00 mg.

MODO DE USAR: Alimento equilibrado para camundongos e ratos de laboratório. Administração à vontade, através de comedouros suspensos.

CONSERVAÇÃO: Conservar em ambiente seco e arejado, evitando-se luz e calor excessivos.

Rótulo registrado no Ministério da Agricultura e Reforma Agrária sob nº 4453.00118.

METODOLOGIA DE DILUIÇÃO DAS DROGAS

CÁLCULO DAS DOSES

a) Vitamina C

3 ampolas com 500mg de vitamina C + 300ml de água =

1500mg por 300ml

200mg por 40 ml

O volume esperado de ingesta de líquido pelo animal, por dia é de 40ml. Assim, para cada 40ml de líquido consumido, ele estará ingerindo 200mg de vitamina C.

Considerando o peso médio inicial do rato de 155g, a dose seria de 1290mg de vitamina C por Kg de peso do animal, por dia.

b) DEN

Dose desejada: 10mg/kg

Peso inicial do animal: 155g

Dose por animal: 1,55mg

Densidade = 0,95 g/ml

Densidade = Massa

$\frac{\text{Massa}}{\text{Volume}}$

Volume = 40 microlitros / dia em 1000 ml/água

PREPARO FINAL DAS SOLUÇÕES E pH

40 microlitros DEN + 1000ml de água → pH 5,8

1500mg de vitamina C + 300ml da solução de água + DEN → pH 5,6

1500mg de vitamina C + 300ml de água → pH 6,0

300ml de água → pH 6,0

Tabela 20: Soluções utilizadas e pH

Solução	PH
Água	6,0
Água 1000ml + DEN 40µl	5,8
300ml solução DEN + Água e 1500mg vitC	5,6
300ml DEN + VITC 1500mg	6,0

Tabela 21: Evolução do peso dos animais do grupo I

TEMPO	90			120			150			180		
ANIMAIS	PI	PF	Δ	PI	PF	Δ	PI	PF	Δ	PI	PF	Δ
1	167	350	183	158	421	263	163	486	323	158	575	417
2	153	367	214	163	408	245	158	510	352	171	531	360
3	143	388	245	153	457	304	175	475	300	185	529	344
4	145	377	232	168	428	260	181	439	258	162	568	406
5	152	348	196	170	437	267	165	499	334	157	535	378
6	150	353	203	139	414	275	147	487	340	168	538	370
7	163	335	172	155	429	274	168	503	335	139	529	390
8	158	375	217	177	431	254	153	477	324	158	587	429
9	145	347	202	180	428	248	148	469	321	173	565	392
10	162	370	208	162	413	251	155	495	340	161	573	412
MEDIA	154	361	207	162	426	264	161	484	323	163	553	390

* em gramas

PI – Peso inicial PF – Peso final Δ - Diferença PF - PI

Tabela 22: Evolução do peso dos animais do grupo II

TEMPO	90			120			150			180		
ANIMAIS	PI	PF	Δ	PI	PF	Δ	PI	PF	Δ	PI	PF	Δ
1	171	369	198	151	401	250	155	505	350	149	586	437
2	165	343	178	169	438	269	148	488	340	181	591	410
3	137	372	235	173	427	254	158	497	339	153	555	402
4	149	333	184	144	413	269	165	489	324	167	540	373
5	138	345	207	136	399	263	173	506	333	145	580	435
6	169	351	182	128	405	277	169	515	346	177	559	382
7	158	369	211	149	439	290	181	490	309	166	568	402
8	167	377	210	157	440	283	185	487	302	183	539	356
9	143	345	202	168	435	267	179	479	300	164	547	383
10	152	377	225	175	426	251	180	500	320	150	579	429
MÉDIA	155	358	203	155	422	267	169	495	326	163	564	401

* em gramas

PI – Peso inicial PF – Peso final Δ - Diferença PF - PI

Tabela 23: Evolução do peso dos animais do grupo III

TEMPO	90			120			150			180		
ANIMAIS	PI	PF	Δ	PI	PF	Δ	PI	PF	Δ	PI	PF	Δ
1	151	299	148	149	237	88	141	233	92	138	227	89
2	146	256	110	156	247	91	166	251	85	155	268	113
3	144	278	134	161	273	112	173	278	105	146	281	135
4	154	280	126	130	260	130	139	259	120	143	257	114
5	167	260	93	134	235	101	140	237	97	168	249	81
6	147	277	130	153	246	93	157	252	95	160	293	133
7	162	289	127	165	257	92	169	280	111	132	311	179
8	155	275	120	171	283	112	148	287	139	139	328	189
9	158	261	103	157	261	104	133	277	144	173	298	125
10	126	301	175	163	259	96	171	287	116	142	305	163
MÉDIA	151	277	126	154	255	101	154	264	110	149	281	132

* em gramas

PI – Peso inicial PF – Peso final Δ - Diferença PF - PI

Tabela 24: Evolução do peso dos animais do grupo IV

TEMPO	90			120			150			180		
ANIMAIS	PI	PF	Δ	PI	PF	Δ	PI	PF	Δ	PI	PF	Δ
1	150	301	151	179	315	136	174	309	135	153	297	144
2	164	266	102	181	281	100	167	279	112	145	271	126
3	181	279	98	184	299	115	158	313	155	167	323	156
4	169	281	113	183	286	103	150	275	125	159	268	109
5	177	259	82	171	278	107	129	279	150	167	286	119
6	148	278	130	179	301	122	135	299	164	134	310	176
7	152	289	137	168	327	159	148	330	182	145	347	202
8	159	276	117	157	333	176	172	329	157	138	282	144
9	166	259	93	149	297	148	168	307	139	165	279	114
10	149	290	141	158	303	145	155	300	145	173	301	128
MÉDIA	161	277	116	171	302	131	155	302	147	154	296	142

* em gramas

PI – Peso inicial PF – Peso final Δ - Diferença PF - PI

Tabela 25: Evolução do peso dos animais do grupo V

TEMPO	90			120			150			180		
	PI	PF	Δ	PI	PF	Δ	PI	PF	Δ	PI	PF	Δ
1	166	322	156	154	313	159	167	303	136	137	315	178
2	163	298	135	145	310	165	133	338	205	141	357	216
3	173	315	142	138	322	184	180	335	155	166	339	173
4	138	325	187	170	337	167	173	351	178	180	368	188
5	156	318	162	137	320	183	148	317	169	147	323	176
6	144	299	155	152	305	153	161	335	174	129	351	222
7	172	323	151	147	328	181	139	338	199	131	363	232
8	181	317	136	158	321	163	173	331	158	168	349	181
9	134	305	171	165	333	168	168	341	173	157	356	199
10	168	289	121	167	307	140	141	338	197	163	360	197
MÉDIA	159	311	152	153	319	166	158	332	174	152	348	196

* em gramas

PI – Peso inicial PF – Peso final Δ - Diferença PF - PI

Tabela 26: Evolução do peso dos animais do grupo VI

TEMPO	90			120			150			180		
	PI	PF	Δ	PI	PF	Δ	PI	PF	Δ	PI	PF	Δ
1	127	351	224	151	323	172	172	355	183	139	369	230
2	158	332	174	169	352	183	164	381	217	147	408	261
3	155	401	246	136	391	255	158	373	215	134	359	225
4	161	388	197	145	373	228	149	381	232	153	390	237
5	147	427	280	166	392	226	135	415	280	148	432	284
6	168	298	130	144	331	187	131	354	223	170	435	265
7	154	313	159	133	351	218	154	377	223	137	398	261
8	144	351	207	167	369	202	162	381	219	159	401	242
9	146	327	181	163	349	186	157	385	228	165	427	262
10	153	307	154	171	361	190	150	388	238	152	413	261
MÉDIA	151	349	198	154	359	205	153	379	226	150	403	253

* em gramas

PI – Peso inicial PF – Peso final Δ - Diferença PF - PI