

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

***INFLUÊNCIA DA MORFINA NA CARCINOGENESE ESOFÁGICA E  
HEPÁTICA INDUZIDA PELA DIETILNITROSAMINA EM RATOS***

**CARLOS FROTA DILLENBURG**

***Tese de Doutorado***

Porto Alegre

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

***INFLUÊNCIA DA MORFINA NA CARCINOGENESE ESOFÁGICA E  
HEPÁTICA INDUZIDA PELA DIETILNITROSAMINA EM RATOS***

**CARLOS FROTA DILLENBURG**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Cirurgia. Área de Concentração: Cirurgia do Esôfago, Estômago e Duodeno.

Orientador: Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Kruei

Porto Alegre

2005

**D578i** Dillenburg, Carlos Frota

Influência da morfina na carcinogênese esofágica e hepática induzida pela dietilnitrosamina em ratos / Carlos Frota Dillenburg ; orient. Cleber Dario Pinto Kruel. – 2005.

126 f.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia. Porto Alegre, BR-RS, 2005.

1. Neoplasias esofágicas 2. Carcinoma de células escamosas 3. Morfina 4. Nitrosaminas 5. Carcinógenos I. Kruel, Cleber Dario Pinto II. Título.

NLM: WI 250

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

***"A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais volta ao seu tamanho original."***

***Albert Einstein***

*A minha esposa Claudia, que durante todo o tempo esteve ao meu lado, apoiando com muito carinho o desenvolvimento desta tese.*

*Ao meu filho Arthur, símbolo de vida e amor em suas formas mais intensas, trazendo a certeza de que a humanidade será cada vez melhor.*

*Aos meus pais, José e Ivelni, símbolos de segurança, serenidade e motivação que sempre foram durante a minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas e instituições que contribuíram direta ou indiretamente para que esta tese fosse concluída e, de forma especial:

- ao Dr. Cleber Dario Pinto Krueel, professor do Departamento de Cirurgia da UFRGS, pela sua orientação e apoio durante todos os momentos desta pesquisa;

- ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, decisivo para a conclusão deste trabalho ao disponibilizar recursos financeiros complementares, e seus professores pelos ensinamentos e oportunidade de aprimoramento científico;

- à secretária do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Estela Maris Emer Araripe, pela compreensão e auxílio durante o curso;

- ao Dr. Marco Antônio Dexheimer, professor de Bioquímica da UFRGS e diretor técnico da Pró-Ambiente – Análises Químicas e Toxicológicas Ltda. - pelo desprendimento e extrema boa vontade ao colocar à disposição a referida empresa, onde foram realizadas as diluições das soluções dentro das mais avançadas condições técnicas;

- a todos os funcionários da Pró-Ambiente – Análises Químicas e Toxicológicas Ltda.  
- pela simpatia e interesse demonstrados no sucesso do trabalho;

- à Fundação Estadual de Proteção e Pesquisa em Saúde – FEPPS - pela disponibilização do biotério e dos animais utilizados nesta pesquisa;

- à bióloga Patrícia Sesterheim, chefe da Seção de Produção Animal - Divisão de Produção e Experimentação Animal da FEPPS - pela sua dedicação e extrema capacidade profissional, demonstradas na produção e manutenção dos animais e pela transmissão constante de conhecimentos durante todo o período do experimento. Seu auxílio foi fundamental nesta pesquisa;

- à veterinária Luiza Maria Gomes de Macedo Braga pela sua capacidade profissional e boa vontade demonstradas durante o período do experimento;

- a todos os funcionários da FEPPS e, em especial, à estagiária de biologia Patrícia Tierling que, de forma dedicada e competente, cuidou dos animais durante os 161 dias do experimento;

- aos acadêmicos de medicina Tiago Luís Dedavid e Silva, André Silvio Schier e Giancarlo Marafon pela importante participação nas várias fases da pesquisa, no controle dos animais e no auxílio da realização do experimento. O espírito crítico e constantes questionamentos foram de grande auxílio no decorrer do trabalho;

- ao Dr. Leandro Totti Cavazolla pelas valiosas dicas e importante auxílio durante a realização do trabalho;

- ao Dr. Mário Bernardes Wagner, chefe do Serviço de Epidemiologia e Bioestatística do Hospital de Clínica de Porto Alegre (HCPA), e Vânia Naomi Hirakata, estatística do mesmo Serviço, pelo precioso auxílio na análise dos dados;

- aos funcionários do Serviço de Patologia do HCPA pela pronta disponibilização de materiais necessários ao andamento da pesquisa, em especial ao funcionário Jorge Alberto

Lopes que, de forma qualificada, realizou o preparo de todas as lâminas para a análise histopatológica.

- ao Dr. Carlos Thadeu Cerski, professor titular e chefe do Departamento de Patologia da UFRGS, à Dra. Maria Isabel Edelweiss, professora titular de Patologia da UFRGS, e à patologista Dra. Claudia Helena Werlang Dillenburg pelas qualificadas análises histopatológicas realizadas e importantes orientações ligadas à estruturação do trabalho;

- ao farmacêutico Renato Chagas Ribeiro, chefe da seção Farmácia de Dispensação do HCPA, pela extrema boa vontade e eficiência no fornecimento das substâncias necessárias ao experimento;

- ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que, através do seu Fundo de Incentivo à Pesquisa, disponibilizou apoio financeiro decisivo para a realização desta pesquisa. Em especial à agente administrativa, Marta Regina Dotto, e a chefe da seção de apoio logístico, Indara Carmanim Saccilotto, pela forma sempre atenciosa e eficiente no atendimento às dificuldades gerenciais ocorridas durante o estudo;

- à Professora Eloci Gloria de Mello pela revisão final do português;

- à Zuleica Santos pela formatação final do trabalho.



# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>12</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>14</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
2.1 CÂNCER DE ESÔFAGO - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	16
2.2 NITROSAMINAS E ÓPIO NA CARCINOGENESE ESOFÁGICA .....	21
2.3 CARCINOGENESE ESOFÁGICA E HEPÁTICA .....	22
2.4 NITROSAMINAS.....	24
2.5 MORFINA.....	25
2.5.1 <i>História</i> .....	25
2.5.2 <i>Propriedades bioquímicas da morfina</i> .....	28
2.6 HISTOPATOLOGIA DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO .....	29
2.7 HISTOPATOLOGIA DO CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	31
2.8 ÍNDICE TUMORAL ESOFÁGICO.....	33
<b>3 OBJETIVO.....</b>	<b>34</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1 ANIMAIS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO .....	35
4.2 ALIMENTAÇÃO E SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO .....	36
4.3 EXPERIMENTO.....	37
4.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E RESSECÇÃO DOS ESPÉCIMENS .....	38
4.5 PREPARO E CONSERVAÇÃO DO ESÔFAGO E FÍGADO .....	40
4.6 ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	41
4.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	44
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	49
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
5.1 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	51

---

5.2 ÍNDICE TUMORAL ESOFÁGICO – MACROSCOPIA .....	54
5.3 DOSAGEM DAS SUBSTÂNCIAS .....	55
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
6.1 MATERIAL E MÉTODOS .....	57
6.2 ANÁLISE DAS VARIÁVEIS EM ESTUDO .....	60
6.2.1 <i>Dosagem das substâncias</i> .....	60
6.2.2 <i>Índice Tumoral esofágico - macroscopia</i> .....	64
6.2.3 <i>Análise histopatológica</i> .....	65
6.2.3.1 Efeito da morfina sobre a carcinogênese esofágica e hepática.....	66
6.2.3.2 Efeito da morfina sobre o metabolismo hepático da Dietilnitrosamina ...	67
6.3 PERSPECTIVAS FUTURAS DA LINHA DE PESQUISA.....	69
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>70</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
<b>9 ARTIGO - MORFINA NÃO PROMOVE CARCINOGENESE ESOFÁGICA EM RATOS EXPOSTOS A DIETILNITROSAMINA.....</b>	<b>78</b>
RESUMO.....	80
INTRODUÇÃO .....	80
MÉTODOS .....	81
RESULTADOS .....	83
DISCUSSÃO .....	85
AGRADECIMENTOS .....	91
REFERÊNCIAS.....	92
<b>10 PAPER - MORPHINE DOES NOT PROMOTE ESOPHAGEAL CARCINOGENESIS IN RATS EXPOSED TO DIETHYLNITROSAMINE .....</b>	<b>99</b>
ABSTRACT .....	101
INTRODUCTION .....	103
METHODS .....	104
RESULTS .....	105
DISCUSSION .....	107
ACKNOWLEDGEMENTS .....	113
REFERENCES.....	114
<b>ANEXOS.....</b>	<b>121</b>
ANEXO A - RAÇÃO COMPLETA PARA CAMUNDONGOS E RATOS NUVILAB CR1 .....	122
ANEXO B – PROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO .....	123
ANEXO C - ACHADOS DE MACROSCOPIA ESTRATIFICADOS POR GRUPOS DE TRATAMENTO.....	125
ANEXO D - DOSE DAS SUBSTÂNCIAS INGERIDAS (MG/KG/DIA) DURANTE AS 23 SEMANAS .....	126

## LISTA DE ABREVIATURAS

CEE	- Carcinoma epidermóide de esôfago
DEN	- Dietilnitrosamina
DMAE	- Departamento Municipal de Água e Esgotos
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
FEPPS	- Fundação Estadual de Proteção e Pesquisa em Saúde
HCPA	- Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	- Hematoxicilina-Eosina
IT	- Índice Tumoral esofágico de Rubio
M3G	- Morfina-3-glicuronídeo
M6G	- Morfina-6-glicuronídeo
RNA	- Ácido ribonucléico

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esôfago cérvico-tóraco-abdominal e estômago dissecados com secção em nível cervical .....	39
Figura 2 – Lesões vegetantes múltiplas - setas (impregnado com azul de toluidina) .....	41
Figura 3 – Lesões vegetantes múltiplas, aumento de 8 vezes - setas (impregnado com azul de toluidina) .....	42
Figura 4 - Anatomia hepática do rato .....	43
Figura 5 - Tumores macroscópicos nos segmentos A e B de fígado de animal do grupo <i>Den</i> .....	43
Figura 6 - Espécimen esofágico enrolado sobre si mesmo, tipo “rocambolé” .....	44
Figura 7 - HE 200x, histologia esofágica normal em animal do grupo <i>Morf</i> .....	45
Figura 8 - HE 200x, displasia de baixo grau em esôfago de animal do grupo <i>Den/morf</i> .....	45
Figura 9 - HE 200x, displasia de alto grau em esôfago de animal do grupo <i>Den+morf</i> .....	46
Figura 10 - HE 200x, carcinoma epidermóide invasor da muscular da mucosa em esôfago de animal do grupo <i>Den+morf</i> .....	46
Figura 11 - HE 100x, histologia hepática normal em animal do grupo <i>Morf</i> .....	47
Figura 12 - HE 40 x, foco de células claras em fígado de animal do grupo <i>Den</i> .....	48
Figura 13 - HE 100x, carcinoma hepatocelular em animal do grupo <i>Den</i> .....	48
Figura 14 - HE 400x, carcinoma hepatocelular em animal do grupo <i>Den</i> .....	49
Figura 15 - Incidência de lesões esofágicas e hepáticas por grupo.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Incidências neoplásicas e doses das substâncias estratificadas por grupos de tratamento.....	52
Tabela 2 - Frequência relativa dos achados na microscopia esofágica estratificada por grupos de tratamento.....	53
Tabela 3 - Frequência relativa dos achados na microscopia hepática estratificada por grupos de tratamento.....	54
Tabela 4 - Relação entre Índice Tumoral e histologia esofágica estratificada por grupo de tratamento.....	55

## RESUMO

A alta incidência de câncer esofágico no norte do Irã foi associada ao consumo de ópio e exposição às nitrosaminas. A dietilnitrosamina (DEN) possui potencial estabelecido de produzir câncer experimental em esôfago e fígado. Avaliou-se por histopatologia o efeito da administração oral de morfina e DEN na carcinogênese esofágica e hepática em 176 ratos, durante 23 semanas, divididos em grupos: **Morf.** morfina; **Den.** DEN; **Den+morf.** DEN e morfina numa mesma solução; **Den/morf.** DEN e morfina em diferentes soluções e dias. **Morf** não promoveu neoplasias. Encontraram-se maiores incidências neoplásicas: a) no esôfago, **Den** em relação à **Den/morf** e **Den+morf** (71,1%, 55,8% e 50,0%); b) no fígado, **Den** e **Den/morf** em relação à **Den+morf** (73,8%, 81,4% e 40,9%); c) maior incidência de neoplasia hepática do que esofágica em **Den/morf** (81,4% e 55,8%). Diferentes doses de DEN foram ingeridas entre os grupos **Den**, **Den/morf** e **Den+morf**, respectivamente 2,9, 2,8 e 2,3 mg/kg/dia. Estes resultados mostram que a morfina não promoveu a carcinogênese esofágica e pode ter estimulado o metabolismo hepático de primeira passagem do carcinógeno.

# 1 INTRODUÇÃO

O câncer de esôfago está entre os dez mais frequentes no mundo e, se for considerado o impacto social nas regiões endêmicas, o problema se torna um verdadeiro flagelo para aquelas populações. Foi constatada uma íntima correlação entre doença e hábitos regionais, ou seja, com o modo de vida dessas pessoas (ZHU, 1991; VELHO, 2003) e observa-se que a origem do câncer esofágico está associada a fatores diferentes em cada região (GHADIRIAN, 1988; MONTESANO, 1996).

A alta incidência de câncer esofágico foi associada ao hábito do consumo de ópio em regiões de alta incidência no norte do Irã (HEWER, 1978; MALAVEILLE, 1982; GHADIRIAN, 1985; 1988) e à exposição às nitrosaminas na China, principalmente através da dieta (LU, 1991; CHENG, 1992; WU, 1993; LIN, 2002).

As razões para a associação entre ópio e câncer de esôfago não são conhecidas, porém experimentos mostraram que uma dose de sulfato de morfina, o principal alcalóide do ópio, causou alquilação do DNA, aumentada no esôfago e diminuída no fígado, em ratos que receberam dietilnitrosamina (DEN) 45 minutos após a dose de morfina. A DEN, uma nitrosamina, é considerada uma das substâncias com maior potencial de produzir câncer no esôfago e fígado de ratos e camundongos (LIJINSKY, 1992; RIBEIRO PINTO, 1997), e a alquilação do DNA constitui-se numa conhecida alteração precursora da carcinogênese

provocada pela DEN nestes órgãos. Desta forma, a morfina causaria uma diminuição da carcinogênese hepática e o aumento da esofágica por influenciar no metabolismo hepático da DEN. Uma vez sugerido que observações feitas em ratos poderiam ser extrapoladas para o homem (RIBEIRO PINTO, 1997), estas seriam possíveis evidências metabólicas, num experimento agudo, para a associação entre ópio e câncer de esôfago em ratos e, por extensão, em humanos.

No presente estudo, foi oferecido DEN na água de beber para ratos durante três dias em cada uma das 23 semanas, os quais foram comparados a grupos que ingeriram morfina simultaneamente ou não com DEN. Avaliou-se o efeito da administração crônica de morfina e DEN na carcinogênese esofágica e hepática.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CÂNCER DE ESÔFAGO - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Há mais de dois mil anos a literatura médica chinesa vem descrevendo o câncer de esôfago. Documentos da época já descreviam pacientes que apresentavam disfagia e eructação que evoluía de forma letal em centenas de milhares de pessoas (WU, 1982).

O câncer de esôfago está entre as 10 mais freqüentes neoplasias no mundo, alcançando números superiores a 300.000 novos casos por ano, a maioria ocorrendo nos países em desenvolvimento. Existe íntima relação da doença com aspectos culturais e hábitos regionais, ou seja, com o modo de vida (ZHU, 1991; VELHO, 2003). Isto constitui uma importante evidência de que a origem do câncer de esôfago é multifatorial. Como consequência, formam-se zonas de alta e baixa incidências próximas umas das outras, muitas vezes dentro de um mesmo país ou estado (GHADIRIAN, 1988; MONTESANO, 1996). As áreas de maior incidência situam-se no norte da China, no nordeste do Irã, em regiões da Índia, no norte da França e na África do Sul. O litoral do mar Cáspio, o nordeste do Irã, as planícies do Turquistão, que situam-se no norte do Afeganistão e da China, formam um verdadeiro cinturão de câncer esofágico. Em Gonbad, litoral norte do Irã, são acometidos 400:100.000 habitantes/ano, a maior taxa de ocorrência mundial (IARC, 1991). Na América do Sul, a sua incidência varia de intermediária a alta, mas é particularmente

elevada no chamado Cone Sul – regiões do norte da Argentina, nordeste do Uruguai (40:100.000 hab./ano) e no estado do Rio Grande do Sul (27:100.000 hab./ano).

Dentro do próprio território do estado do Rio Grande do Sul, onde a cada ano surgem 800 novos casos, a incidência é variável: 16,49:100.000 hab./ano na microrregião da Campanha a 4,74:100.000 hab./ano na microrregião de Soledade (DE STEFANI, 1990; PROLLA, 1993). A taxa de mortalidade por câncer de esôfago coloca-o no primeiro lugar entre os estados brasileiros e no quinto lugar no mundo, superado apenas pelas províncias de Henan (China), Gonbad (Irã), Transkei (África do Sul) e Bretagne (França) (BARROS, 1992).

De acordo com as Estimativas de Incidência de Câncer no Brasil, devem ocorrer cerca de 10.590 casos novos no país em 2005. É o sexto tipo de câncer mais incidente e, em 2000, foi o sexto tipo mais mortal com 5.307 óbitos. Foi responsável por 4,9% dos óbitos masculinos e por 1,3% dos femininos no país em 2000 (INCA, 2005).

Apesar de todo o progresso técnico havido em relação ao diagnóstico e tratamento desses pacientes nas últimas décadas, os elevados índices de complicações e mortalidade relacionados à cirurgia e à baixa sobrevida global, não têm sofrido modificações significativas na maioria dos relatos da experiência ocidental (PARICIO, 1993; GURSKI, 1997; SCHIRMER, 1997; ROSA, 1999). Esses maus resultados cirúrgicos devem-se principalmente ao diagnóstico tardio da doença, quando os pacientes já se apresentam sintomáticos e em más condições clínicas para serem submetidos à cirurgia (SKINNER, 1984; URSCHER, 1995).

O grau de penetração da lesão na parede esofágica e o comprometimento linfonodal são dois fatores importantes no prognóstico desses pacientes. O índice de sobrevida em cinco anos cai drasticamente quando se comparam pacientes com lesões restritas à mucosa (em torno de 90%) com aqueles com invasão de submucosa (cerca de 40%) (SKINNER, 1982). O diagnóstico precoce do carcinoma epidermóide do esôfago (CEE) é o grande

diferencial do aumento de sobrevida nesses pacientes. Esse diagnóstico somente será melhorado quando se conhecerem as populações de risco para a doença e essas forem submetidas a programas de rastreamento populacional (DE BARROS, 1992; KRUEL, 1992; ROTH, 1997). Como parte destes programas, as populações seriam submetidas a métodos diagnósticos bem estabelecidos como a endoscopia esôfago-gástrica, complementada com técnicas que ampliam seu potencial diagnóstico, como a instilação de Lugol sobre o epitélio e a investigação da imunexpressão de p53 na mucosa esofágica (FREITAG, 1999; FAGUNDES, 1999, 2005).

O CEE é o tipo histológico mais freqüente, responsável por 81 a 96% dos casos, e sua etiopatogenia é multifatorial (DE BARROS, 1999; INCA, 2005). Os principais fatores de risco já demonstrados são os consumos de tabaco e de álcool etílico, especialmente quando associados (TUYNS, 1980; SWANN, 1984; VICTORA, 1987; DE STEFANI, 1990; BLOT, 1994; ANDERSON, 1995). No mundo ocidental, o grupo populacional de maior risco constitui-se de indivíduos do sexo masculino (proporção 4:1), na sexta década de vida e com hábito de consumo crônico de álcool e/ou tabaco (BLOT, 1994). O álcool é considerado um potencializador da indução de tumores epiteliais, produzindo inicialmente lesões inflamatórias e estimulando a proliferação celular epitelial. Já o tabaco tem efeito carcinogênico dose-dependente. Em subgrupos populacionais não expostos ao consumo de álcool e/ou tabaco, os coeficientes de mortalidade para neoplasia do esôfago foram inferiores àqueles da população em geral (DE BARROS, 1992).

Em diversos países, o câncer de esôfago foi associado ao baixo nível sócio-econômico e à deficiência dietética de vitaminas A, C, E, riboflavina, caroteno e micronutrientes encontrados em vegetais e frutas frescas, necessários para manter a integridade da mucosa esofagiana (GHADIRIAN, 1988; DE STEFANI, 1990; BLOT, 1993, 1994).

Em estudo de caso controle em população do Rio Grande do Sul, VICTORA *et al.* (1987) identificaram o hábito da ingestão do mate ou chimarrão em altas temperaturas (acima de 70°C) como responsável por um risco relativo isolado, duas vezes superior, entre bebedores e não-bebedores para o desenvolvimento de neoplasia esofágica. KRUEL *et al.* (1996) observaram significativo aumento no Índice de Tumores esofágicos em um grupo de camundongos que recebeu água quente (temperatura entre 60°C e 70°C) associado à DEN quando comparado a um grupo que recebeu água em temperatura ambiente e DEN. Em população da zona endêmica de Taquara – Rio Grande do Sul, de BARROS *et al.* (2000) aferiram o volume médio de 1.265 ml (250 a 6.000 ml) de chimarrão ingerido por pessoa, sendo que em 72% das residências a temperatura da bebida foi de pelo menos 60 °C. Neste estudo, concluíram que os indivíduos não estimavam corretamente a temperatura da água que ingeriam, e que estas altas temperaturas do chimarrão poderia contribuir para a carcinogênese nesta população ( DE BARROS, 2000).

Outros autores (ATTWOOD, 1992; MELO, 1999) demonstraram, em experimentos com ratos, que o refluxo de conteúdo gastroduodeno-esofágico é significativamente mais deletério para a mucosa esofágica do que o refluxo gastro-esofágico, atuando isoladamente como um carcinógeno esofágico, produzindo metaplasia intestinal (Esôfago de Barrett) e adenocarcinoma de esôfago.

Em regiões de alto risco na China, os hábitos alimentares foram responsabilizados pela maior incidência de câncer esofágico. Entre os principais fatores encontra-se o consumo de vegetais em conservas ricas em nitrosaminas, de pão contaminado com fibras de sílica (GHADIRIAN, 1988) e o uso de substâncias que liberam nitrosaminas voláteis durante o preparo dos alimentos (LIN, 2002). Este último autor detectou taxas significativamente aumentadas de nitrosaminas nos alimentos com conseqüente maior consumo diário na dieta, bem como maiores níveis de excreção urinária dessas substâncias em relação às populações das regiões de baixo risco. Por outro lado, CHENG (1994)

demonstrou que o acréscimo de substâncias “protetoras” à dieta (retinol, riboflavina, zinco e vitaminas C e E) produzia um efeito protetor em relação ao carcinoma esofágico.

Nas regiões de alta prevalência do I<sup>r</sup>ã, demonstrou-se que mais de 75% dos casos de CEE tinham relação com o estilo de vida e hábitos alimentares da população. Fibras de sílica, poderosas agentes carcinogênicas, foram encontradas em pães com sementes mistas e na parede esofágica de pacientes afetados, em regiões de maior frequência de câncer de esôfago, como também descrito na China previamente (GHADIRIAN, 1988). HEWER *et al.* (1978) implicaram o ópio como provável envolvido na gênese do CEE no nordeste do I<sup>r</sup>ã e inspiraram a realização de diversos trabalhos, incluindo o presente estudo. Os autores detectaram morfina na urina de 50% dos indivíduos com idade superior a 35 anos, indicando que a adição ao ópio é provavelmente muito comum na região. A confiabilidade dos relatos do uso próprio de ópio nas populações de áreas de alto risco foi confirmada por ABNET *et al.* (2004), através de uma extensa coorte, comparando questionários com medidas urinárias de morfina.

Diferentes produtos do ópio são utilizados no I<sup>r</sup>ã. Entre os mais importantes estão o ópio bruto e o resíduo do cachimbo de ópio que é localmente chamado de *sukhteh*. Outro que possui importância é um produto refinado, chamado *shireh*, obtido do ópio bruto ou de uma mistura do ópio bruto e *sukhteh*, o qual, depois de fervido em água, filtrado (normalmente várias vezes) e evaporado, torna-se uma substância de consistência emborrachada. O ópio bruto e o *shireh* são mascarados e ingeridos ou fumados; o *sukhteh* é mascarado ou convertido em *shireh* (HEWER, 1978).

## 2.2 NITROSAMINAS E ÓPIO NA CARCINOGENESE ESOFÁGICA

Enquanto que evidências têm demonstrado a relação entre câncer de esôfago e nitrosaminas em regiões de alta incidência (PRESTON-MARTIN, 1989; FORMAN, 1989; LU, 1991; CHENG, 1992; WU, 1993; LIN, 2002), tem sido sugerida também a participação do ópio (ou seu metabólito, a morfina) neste processo (GHADIRIAN, 1985, 1988; KALANT, 1997).

As nitrosaminas podem ser formadas a partir de substâncias comuns como as aminas, mediante combinação dessas com nitritos, reação chamada de nitrosação. Essa reação ocorre sob variadas condições de pH e temperatura de modo que as nitrosaminas podem formar-se no solo, durante o armazenamento ou preparo de alimentos, ou endogenamente, por ação de bactérias ou de macrófagos ativados que catalisam a união entre aminas e nitritos ou reduzem nitratos a nitritos (BARTSCH, 1989).

As aminas podem ser encontradas em diversos alimentos e fármacos, ao passo que nitratos e nitritos são encontrados naturalmente nos alimentos e na água, além de fazerem parte dos conservantes alimentares. Os seres humanos são expostos às nitrosaminas predominantemente através da síntese natural no trato gastrointestinal. Além disso, o consumo de tabaco, o uso de cosméticos e produtos farmacêuticos podem causar exposição à nitrosaminas pré-formadas (PRESTON-MARTIN, 1989; BARTSCH, 1989; FORMAN, 1989; LIJINSKY, 1992).

Evidências consistentes têm demonstrado a associação de diversos carcinógenos e seus co-fatores com câncer esofágico. Os dados são provenientes de estudos observacionais na China (LU, 1991; CHENG, 1992; WU, 1993;) e Irã (GHADIRIAN, 1985; 1988), bem como de estudos experimentais em cobaias com nitrosaminas associadas ao álcool (GIBEL, 1967; AZE, 1993), ao chá preto (VELHO, 2003), a modelos de refluxo

gastroesofágico (ATTWOOD, 1992; MELO, 1999) e à cafeína (SCHIRMER, 1999). Na China, compostos nitrosos foram detectados em alimentos e na urina de moradores em áreas com alta incidência de câncer de esôfago (LU, 1991; CHENG, 1992; WU, 1993; LIN, 2002). Além disso, a síntese natural dos compostos nitrosos parece ser maior que o normal na população destas áreas de alto risco (BATSCH, 1989; WU, 1993). O O<sup>6</sup>-metilguanina, um produto da reação das nitrosaminas com DNA, foi detectado no DNA esofágico de pessoas nessas áreas de alta incidência (UMBENHAUER, 1985). Também estudos experimentais com álcool têm mostrado evidências consistentes do envolvimento das nitrosaminas no câncer esofágico e hepático. O álcool, o maior fator associado com câncer de esôfago em seres humanos nos países ocidentais e em alguns orientais (GHADIRIAN, 1988), mostrou um aumento substancial da sua relação com o número de tumores extra-hepáticos produzidos pelas nitrosaminas em animais de laboratório, incluindo tumores do esôfago em ratos (GIBEL, 1967; AZE, 1993). Este aumento no número de tumores seria, primariamente, devido às mudanças que o álcool produz na farmacocinética das nitrosaminas (SWANN, 1984) e levou à hipótese de que o efeito do álcool na incidência do câncer humano, é o resultado do seu efeito na farmacocinética das nitrosaminas a que o homem está exposto (BARTSCH, 1989; ANDERSON, 1995). RIBEIRO PINTO (1997), em experimentos com duração de oito a dez dias, mostrou mudanças na farmacocinética e distribuição da DEN induzida pela administração prévia de morfina a ratos. Estas mudanças foram similares àquelas produzidas pelo etanol. O estudo desse autor constitui a base metabólica para a influência da morfina na carcinogênese esofágica e hepática induzida pela DEN.

### 2.3 CARCINOGENESE ESOFÁGICA E HEPÁTICA

Acredita-se que a carcinogênese esofágica siga os mesmos caminhos identificados em outros órgãos com epitélio escamoso em relação ao comportamento dos agentes químicos carcinogênicos. Quando as nitrosaminas ou outros agentes químicos

carcinogênicos são ingeridos com a dieta, esses sofrem transformação enzimática e convertem-se em carcinógenos ativos. Para tornarem-se ativos, as nitrosaminas exigem transformação metabólica *in vivo* para, então, exercerem seus efeitos carcinogênicos, o que explica o porquê das nitrosaminas produzirem tumores em tecidos distantes do local de sua administração (LEAF, 1989). O ponto crítico requerido para a ativação da DEN é sua hidroxilação, comumente ocorrida através do sistema de enzimas do citocromo P450 que são enzimas presentes no retículo endoplasmático e mitocôndria celulares (GUENGERICH, 1995). Secundariamente, esta hidroxilação pode ocorrer com mediação de outros sistemas enzimáticos ainda pouco conhecidos (ARCHER, 1989). Desta forma, é produzido um agente alquilante, que interage e induz mutações do DNA por alquilação (LIJINSKI, 1992; RIBEIRO PINTO, 1997), alterando o controle do crescimento tecidual e promovendo o desenvolvimento de carcinomas (MONTESANO, 1996). A reação da DEN ativada com o DNA e RNA celulares acontece imediatamente após sua ativação pelos citocromos P450 ou outros sistemas enzimáticos. Por essa razão, torna-se importante o fato de estas enzimas encontrarem-se em sua maior parte no fígado, mas também em outros órgãos, entre eles o esôfago (MAGEE, 1989; YOO, 1990; LIJINSKI, 1992).

O álcool pode estimular a replicação de células displásicas na mucosa esofágica por competir com as nitrosaminas pelo metabolismo hepático, favorecendo, assim, uma maior biodisponibilidade tecidual e ativação dos carcinógenos pelo sistema P450 da célula epitelial esofágica (RUSSO, 1996). Na ausência do álcool, a ativação das nitrosaminas, e conseqüente replicação de células neoplásicas, aconteceria principalmente em nível hepático. Foi demonstrado que o efeito farmacocinético da morfina é semelhante em experimentos de curta duração – 8 a 10 dias – em nível biomolecular (RIBEIRO PINTO, 1997).



## 2.4 NITROSAMINAS

Os compostos N-nitrosos costumam apresentar uma organoespecificidade bem definida, alterando a bioquímica e a genética celular do DNA de maneira a impedir a reparação e replicação celular corretas. A partir dessas alterações celulares, surgem as lesões pré-malignas e, mais tarde, os carcinomas (MONTESANO, 1996). Vários tumores têm sido induzidos na maioria dos órgãos de roedores e outros animais pela administração dos vários tipos destes compostos e pelas mais variadas vias (BAKER, 1974; REUBER, 1975, 1977; RUBIO, 1983; MANDARD, 1984; LIJINSKY, 1992; KRUEL, 1992).

O único carcinógeno conhecido capaz de promover câncer de esôfago em animais é a N-nitrosamina. Neste grupo, a DEN é uma das substâncias com maior potencial de produzir câncer no esôfago e fígado de ratos e camundongos (LIJINSKY, 1992; RIBEIRO PINTO, 1997; GURSKY, 1997). É um carcinógeno completo, o que significa que pode causar câncer sem a necessidade de estimulação adicional por outros agentes químicos (MAGEE, 1989). Além disso, induz e promove neoplasias do tipo epitelial em várias espécies de animais, acometendo o sistema respiratório, digestivo alto, fígado e rins (LIJINSKY, 1992; YANG, 2004).

A DEN possui peso molecular 102,1, é constituída de um radical nitroso ligado a quatro átomos de carbono e dez de hidrogênio— $C_4H_{10}N_2O$  e é estável em pH neutro (LIJINSKY, 1992).

## 2.5 MORFINA

### 2.5.1 História

Capítulos a parte são os inúmeros marcos do ópio e da morfina na história da humanidade. Grande influência foi exercida sobre as atitudes dos povos, provocando adição coletiva, correntes comerciais e até mesmo guerras. Paralelamente, o uso com fins medicinais sempre foi de grande importância. DUARTE *et al.* (2005) publicaram interessante revisão histórica, da qual trechos são transcritos a seguir:

“O conhecimento do ópio remonta à pré-história. A evidência mais antiga do cultivo da papoula data de 5.000 anos atrás, num ideograma do povo Sumério descrevendo-a como a ‘planta da alegria’. O Papiro de Ebers (1552 a.C.) refere-se ao ópio como uma substância empregada com eficiência para a sedação de crianças. Era assim que a Deusa Ísis sedava seu filho Hórus. Consta que Deméter, divindade grega do século VII a.C., conhecia as propriedades sedativas e hipnóticas do ópio, pois, desesperada com o estupro de sua filha Perséfone, ingeriu essa substância para dormir e, assim, esquecer o seu sofrimento.

Hipócrates, considerado o pai da medicina, prescrevia o ‘mecônio’ (provavelmente um suco de papoula) como purgativo, narcótico e para a cura da leucorréia. Naquela época, as propriedades analgésicas do ópio eram provavelmente desconhecidas.

No ano 80 da nossa era, Dioscórides descreveu um xarope obtido da papoula que denominou Dia-kodium, e concluiu que o extrato da planta é menos ativo do que o suco extraído da cápsula.

O ópio é uma denominação de origem grega que significa suco e teve grande importância na civilização romana. Galeno, a expressão máxima da medicina romana, foi um entusiasta das virtudes do ópio no século II d.C., porém percebeu os riscos do uso exagerado do ópio através do caso do Imperador Antonino, de quem era médico, e que, ao que tudo indica, foi vítima de dependência da droga. Dados sugerem que, a partir dos romanos, a propriedade analgésica do ópio passou a ser reconhecida.

No período de ouro da Civilização Islâmica, por volta do século IX, os árabes dominaram o comércio no Oceano Índico e introduziram o ópio na Índia e na China. Durante cerca de mil anos os chineses empregaram o ópio basicamente para o controle da diarreia.

Em 1700, John Jones, um médico londrino, publicou um livro denominado *Mysteries of Opium Revealed*, constituindo-se provavelmente na primeira publicação específica sobre ópio. No livro, o autor alertava para os riscos do emprego excessivo dessa droga.

O fato mais importante do início do século XIX foi a descoberta da morfina, obtida por Friedrich Sertürner, um assistente de farmacêutico alemão, que trabalhou no isolamento de princípios ativos do ópio. Ele identificou uma substância cristalina, insolúvel em água, que denominou *Principium somniferum* por se mostrar farmacologicamente ativa. O próprio Sertürner substituiu essa denominação por *morphium* em homenagem ao Deus grego do sono, *Morpheus*. Gay Lussac, em publicação numa revista francesa, onde traduziu os trabalhos de Sertürner, propôs a substituição de *morphium* por morfina, denominação que ficou consagrada. Alguns anos depois, Sertürner resolveu realizar uma auto-experiência com morfina. Baseado nos sintomas que se sucederam, escreveu: 'Considero meu dever chamar a atenção para os efeitos terríveis dessa nova substância a fim de que uma calamidade possa ser evitada'. Dessa forma, a morfina, primeiro alcalóide extraído do ópio, teve os seus riscos proclamados pelo seu próprio descobridor.

A crença de que o ópio não acarretava prejuízo individual ou coletivo começou a ruir em 1830, e, em 1860, essa droga se tornou problema médico e social em função dos altos

índices de mortalidade. Segundo esses dados, um terço de todos os envenenamentos fatais foram devidos a casos de sobredose de ópio, quer tomado como fonte de prazer, quer com intenções suicidas. DeQuincey, nascido em 1785, segundo seu próprio depoimento, tomou ópio pela primeira vez em 1804, quando estudante em Oxford, por recomendação de um colega, para o controle de uma dor de dente. Assim ele descreveu suas primeiras sensações: 'Dentro de uma hora, oh céus! Que extraordinária mudança! Que ressurgimento das mais inatingíveis profundezas do espírito! O fato de as minhas dores terem desaparecido pareceu-me então uma insignificância. Aqui estava a panacéia para todo e qualquer sofrimento humano; aqui estava o segredo da felicidade.' Em 1821, ele escreveu uma autobiografia intitulada *Confessions of an English Opium Eater* que causou um grande impacto na opinião pública.

A chamada Guerra do Ópio, ocorrida na primeira metade do século XIX, motivou a conscientização dos problemas gerados pelo abuso dessa droga. O hábito de fumar ópio foi introduzido na China no século XVII. Contudo, somente na segunda metade do século XVIII a importação do ópio pela China foi expandida inicialmente pelos portugueses, depois pelos franceses e ingleses, quando a quantidade importada por esse país foi estimada em 10.000 toneladas. Obviamente, o hábito de fumar ópio foi estimulado de forma inescrupulosa pelos interessados num comércio tão compensador. Era natural, no entanto, que o governo chinês se preocupasse com os efeitos resultantes dessa importação exagerada, fato que culminou com o edito publicado em 1800, o qual proibia a importação de ópio. Em consequência, foi destruído um depósito de ópio pertencente à Companhia das Índias Ocidentais. Esse ato precipitou a 'Guerra do Ópio' entre a Inglaterra e a China, sendo esta última derrotada. Com a celebração do Tratado de Nanquin, Hong-Kong foi cedida à Inglaterra e alguns portos foram abertos ao comércio europeu e norte-americano. Em 1858, ainda como consequência do Tratado de Nanquin, o comércio do ópio foi legalmente admitido. O incentivo ao uso do ópio na China por parte do governo inglês provocou reações na própria Inglaterra, onde foi criada a *Society for the Suppression of Opium Trade*, sob a Presidência do Conde

Shaftesbury. Essa sociedade promoveu várias reuniões com o objetivo de protestar contra o incentivo ao perigoso hábito de fumar ópio.”

A morfina passou a ser utilizada na medicina de forma controlada, constituindo-se num potente analgésico opióide, largamente usado no tratamento da dor aguda e crônica severas até os dias atuais (CHRISTRUP, 1997).

### 2.5.2 Propriedades bioquímicas da morfina

A morfina é um alcalóide presente de forma natural no ópio, extraído da papoula, nome popular do *Papaver somniferum*. A papoula provavelmente evoluiu de uma espécie silvestre nativa da Ásia Menor, uma planta que alcança entre um e um metro e meio de altura, e apresenta fácil cultivo (CHRISTRUP, 1997). O processo de obtenção do ópio não sofreu grandes variações no decorrer dos séculos: inicia-se duas semanas após a queda das folhas, quando as cápsulas que contêm as sementes endurecem. Ao anoitecer, a cápsula é escarificada com incisões rasas permitindo fluir o látex. Deixa-se, então, que ele se adense, graças à evaporação, na própria superfície da cápsula. Daí resulta uma goma marrom que é removida na manhã seguinte com um instrumento de ferro com a forma de uma pá de pedreiro pequena. Essa goma pode, então, ser transformada em pó, o ópio bruto, do qual pode-se extrair seus subprodutos (DUARTE, 2005).

Extrai-se cerca de um quilograma de morfina de cada dez kilogramas de ópio. Um quarto do peso do pó de ópio é constituído por, pelo menos, 25 alcalóides que foram classificados em dois grupos distintos. O grupo mais importante é representado pelos derivados do fenantreno que exercem suas ações, primariamente, sobre o Sistema Nervoso Central. A morfina, protótipo desse grupo, representa 10% dos alcalóides do ópio. A codeína foi isolada por Robiquet, em 1832, e representa 0,5% dos alcalóides do ópio. O segundo

grupo exerce basicamente ação espasmolítica, e tem como principal representante a papaverina que representa 1% dos alcalóides do ópio (CHRISTRUP, 1997).

A fórmula química da morfina foi proposta por Gulland & Robinson em 1923 e confirmada por Schöpf em 1927, embora sua síntese química tenha sido completada somente em 1952 por Gates & Tschudi (CHRISTRUP, 1997).

A morfina é solúvel em água e pouco lipossolúvel. Quando administrada por via oral é quase completamente absorvida no trato gastrointestinal. Entretanto, devido ao extenso metabolismo hepático de primeira passagem, a biodisponibilidade sistêmica é baixa e variável (19-47%) (REISINE, 1996; CHRISTRUP, 1997). O passo metabólico predominante da morfina no homem é a glicuronidação, e o fígado é o sítio principal para a biotransformação, principalmente às custas do citocromo P450 (RANE, 1995; RIBEIRO PINTO, 1997). Esta biotransformação também acontece em muito menor extensão nos rins e cérebro. Em torno de 90% é convertida em metabólitos, principalmente a morfina-3-glicuronídeo (M3G) (45-55%) e morfina-6-glicuronídeo (M6G) (10-15%) e o restante em metabólitos menores, entre os quais a normorfina e a codeína. A M6G é encontrada no sangue aproximadamente 30 minutos após administração oral, numa razão de 9:1 em relação à morfina, e possui atividade analgésica equivalente, ou até quatro vezes mais potente, que a morfina. A M3G não possui qualquer atividade analgésica (CHRISTRUP, 1997). A morfina encontra-se em baixas concentrações teciduais após 24 horas da última dose e 90% da sua excreção renal acontece durante o primeiro dia, principalmente na forma M3G (OSBORNE, 1997).

## 2.6 HISTOPATOLOGIA DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO

As displasias são descritas como o resultado da proliferação de células com fenótipo morfológicamente anormal que apresentam irregularidade nuclear e perda da polaridade em

graus diversos. Caracterizam o mais adiantado grau do estado precursor e estão presentes em estudos experimentais e em zonas de alto risco, são multifocais e podem ser confundidas com esofagite à endoscopia. O carcinoma *in situ*, para alguns, é a mais avançada forma de displasia (SAEKI, 2002; VELHO, 2003).

Um dos critérios mais empregados para o diagnóstico histológico de displasia escamosa do esôfago é a Classificação Histológica Internacional dos Tumores da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WATANABE, 1990). De acordo com essa classificação, as alterações nucleares mais características são o aumento de volume, o pleiomorfismo (com mitoses freqüentes) e a hiperchromatose. A displasia leve ou de baixo grau é uma lesão intra-epitelial onde há perda parcial da polaridade celular e a imaturidade está restrita à metade inferior do epitélio. Quando estas modificações ultrapassam a metade da espessura do epitélio temos a displasia moderada e quando está presente em mais de três quartos das camadas do epitélio a displasia é dita grave, ambas, displasia moderada e displasia grave, são chamadas displasias de alto grau. Quando as células imaturas preenchem toda a espessura do epitélio, sem ultrapassá-lo, tem-se o carcinoma *in situ* que, para muitos, é também uma displasia grave. Quando as células pavimentosas neoplásicas ultrapassam a membrana basal tem-se o carcinoma epidermóide invasor (DAWSEY, 1994).

É importante ressaltar que esses critérios são bastante subjetivos, de modo que a identificação de uma lesão displásica do esôfago em países do Ocidente difere consideravelmente no Japão (SAEKI, 2002). Essas diferenças podem significar modificação relevante na incidência de displasias quando de estudos populacionais em zonas de alto risco, como é o caso dos estudos de DAWSEY (1994) em relação aos de CRESPI (1984) e de QIU (1988), todos na província chinesa de Linxian.

Displasias diagnosticadas como de alto grau pela classificação ocidental, por exemplo, são invariavelmente consideradas carcinoma pela classificação japonesa (BOSMAN, 2001). Para superar estas diferenças foram introduzidas outras classificações

(Padova, Viena e Viena revisada), as quais possibilitam uma maior uniformidade de resultados (SCHLEMPER, 2001). De qualquer forma, esta diferença na terminologia não significa que uma esteja mais certa do que a outra, mas apenas que são diferentes (RIDDELL, 1998).

Em um acompanhamento endoscópico de 682 pacientes durante 3,5 anos, em Linxian, uma das regiões de maior incidência no mundo, verificou-se que as únicas lesões que estiveram associadas a maior risco de câncer de esôfago foram as displasias moderada e grave e o carcinoma *in situ*, sem distinção entre as duas últimas (DAWSEY, 1994).

Apesar destas considerações e evidências, ainda não se pode dizer que esteja completamente elucidado o significado biológico das displasias do esôfago (SAEKI, 2002; VELHO, 2003).

## 2.7 HISTOPATOLOGIA DO CARCINOMA HEPATOCELULAR

As lesões hepatocelulares específicas em ratos foram descritas e classificadas em Workshop realizado previamente por BANNASCH *et al.* (1975). Áreas de alterações celulares (focos de células claras) e nódulos neoplásicos foram considerados como lesões com maior probabilidade de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular.

As áreas de alteração celular apresentam-se com alterações do citoplasma dos hepatócitos. Existe uma óbvia destruição da arquitetura hepática, e as áreas de células afetadas mostram-se sem limitação evidente com o tecido hepático circunjacente. As células afetadas podem ser maiores ou menores que os hepatócitos normais, e alguns núcleos podem estar hipertrofiados às custas de vesículas ou hiper cromáticos e ter grandes nucléolos. Considerou-se estas alterações como sendo citologicamente similares às dos nódulos neoplásicos (BANNASCH, 1975).



Os nódulos neoplásicos apresentam, como diferencial das áreas de alteração celular, a limitação evidente do nódulo com o tecido hepático circunjacente. A limitação é secundária à compressão exercida pelo nódulo sobre os sinusóides normais na periferia que se tornam estreitados, e os hepatócitos “esmagados” auxiliam na definição da limitação nodular. Os nódulos neoplásicos são lesões proliferativas, sabidamente induzidas por carcinógenos, e possuem uma probabilidade aumentada de desenvolvimento do carcinoma hepatocelular. Embora eles possam ocorrer nos animais controles, a incidência é tão baixa quanto a ocorrência natural de carcinoma hepatocelular (BANNASCH, 1975).

O diagnóstico de carcinoma hepatocelular é baseado nas características histopatológicas bem documentadas na literatura. As lesões são, em geral, consideravelmente maiores e mais irregulares que os nódulos neoplásicos e têm aspecto mais pálido do que o tecido hepático normal. Podem envolver porções maiores dos lobos hepáticos, além de apresentarem grande tendência de invasão vascular. Na periferia, eles comprimem ou invadem o parênquima circunjacente. As células tumorais são de aparência pleomórfica, com numerosas células anaplásicas gigantes e também células pequenas e completamente indiferenciadas. Nos graus mais avançados, os núcleos são grandes e pleomórficos e o nucléolo é proeminente. Podem estar presentes mitoses atípicas. (BANNASCH, 1975; HYTIROGLOU, 1998; LAWERS, 2002).

Os autores concluíram no Workshop que células hepáticas tumorais benignas, isto é, sem potencial de comportamento maligno, não podem ser reconhecidas em ratos. Exemplo deste tipo de lesão é o adenoma. Além disto, as áreas de alteração celular, como os focos de células claras, têm probabilidade importante de transformação em nódulos neoplásicos que, por sua vez, tem potencial de degeneração para carcinoma hepatocelular (BANNASCH, 1975). RABES *et al.* (1970) observaram que focos ou áreas de células claras são causadas por diminuição das atividades enzimáticas da glicose-6-fosfato e adenosina trifosfato precocemente e se constitui num achado constante também no carcinoma hepatocelular bem estabelecido. Desta forma, assumiu-se que as células destas áreas

deficientes eram precursoras de carcinoma hepatocelular. Por estas razões, todas as lesões descritas foram incluídas no diagnóstico de malignidade no presente estudo.

## 2.8 ÍNDICE TUMORAL ESOFÁGICO

O índice Tumoral esofágico (IT) foi descrito por Rubio *et al.* em 1987 e utilizado por vários autores na avaliação da incidência tumoral em estudos experimentais (KRUEL, 1996; GURSKY, 1999; SCHIRMER, 1999; DILLENBURG, 2000; VELHO, 2003). É obtido após a contagem do número de tumores e medição do comprimento do órgão; é calculado da seguinte forma: número de lesões / tamanho do esôfago (cm).

### **3 OBJETIVOS**

Avaliar o efeito da morfina sobre a carcinogênese esofágica e hepática induzida pela ingestão de dietilnitrosamina.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo experimental foi avaliado e aprovado pela Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do GPPG-HCPA (Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

### 4.1 ANIMAIS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizadas ratas da espécie *Rattus norvegicus*, da cepa *Wistar*, fornecidas pelo Biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul (FEPPS), com idade inicial em torno de dois meses e peso médio de 205 g no início do experimento.

Todos os animais foram mantidos por períodos diários de 12 horas de luz, sob fluxo contínuo de ar e submetidos a temperaturas que variaram de 13°C a 27,5°C. Foram divididos em grupos de quatro animais e mantidos dentro de gaiolas plásticas com grade metálica servindo de tampa e fundo forrado com serragem. As gaiolas foram higienizadas em dias alternados.

## 4.2 ALIMENTAÇÃO E SUBSTÂNCIAS EM ESTUDO

Todos os animais foram alimentados desde o nascimento até os 21 dias de vida com aleitamento materno. Após esse período, receberam ração para roedores *ad libitum* (Anexo A) que foi reposta a cada dois dias e trocada uma vez por semana. A água de beber veio da rede de abastecimento de Porto Alegre (DMAE) e foi utilizada para as diluições de todas as soluções.

O carcinógeno dietilnitrosamina (DEN) utilizado foi proveniente da Sigma Chemicals CO (St.Louis, USA) com as seguintes características: DEN - Sigma Química – N-0756, frasco de 25 ml, densidade – 0,95 g/ml, peso molecular - 102,1 e fórmula química - C<sub>4</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O. O sulfato de morfina foi fabricado por Cristália, Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. (Itapira, São Paulo, Brasil), disponibilizado em frascos-ampolas de 1 ml, contendo 10 mg de sulfato de morfina DCB 0856.03-7 por ml de solução e foi utilizado sob permissão da Vigilância Sanitária da Prefeitura Municipal de Porto Alegre.

As soluções finais foram renovadas semanalmente, sendo preparadas às quintas-feiras. Foram acondicionadas em recipientes plásticos e guardadas na geladeira a 4 °C, protegidas da luz, até que fossem oferecidas aos animais.

Todas as soluções foram preparadas pelo mesmo bioquímico em laboratório de análises toxicológicas (Pró-Ambiente – Análises Químicas e Toxicológicas Ltda.), sob a supervisão de um químico toxicologista.

As soluções que continham sulfato de morfina foram oferecidas aos animais em frascos pretos que bloqueavam a ação da luz sobre a substância. Nos dias das trocas das soluções, foi medido o volume ingerido pelos animais de cada gaiola e o restante foi desprezado.

### 4.3 EXPERIMENTO

O delineamento consistiu de um experimento comparativo de múltiplos grupos, no qual foi induzida esôfago e hepatocarcinogênese. O período de exposição às substâncias foi de 23 semanas ou 161 dias.

As **176** ratas foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos com 44 animais em cada, assim constituídos:

**Morf**: recebeu solução aquosa de sulfato de **morfina**;

**Den**: recebeu solução aquosa de **DEN**;

**Den+morf**: recebeu solução aquosa de **DEN e morfina**, diluídas **simultaneamente**;

**Den/morf**: recebeu solução aquosa de sulfato de **morfina**, sendo substituída por solução aquosa de **DEN** nos dias subseqüentes.

A solução de sulfato de morfina foi ingerida durante quatro dias no **Den/morf** e durante três dias por semana nos grupos **Morf** e **Den+morf**. Já a DEN foi ingerida durante três dias por semana nos grupos **Den**, **Den+morf** e **Den/morf**. A dose de 5mg/kg/dia foi a utilizada tanto para o sulfato de morfina quanto para a DEN.

Todas as trocas ou renovações de soluções ocorreram às segundas, quartas e sextas-feiras entre as 11 e 12 horas (Quadro 1). O volume de líquido desprezado a cada vez foi registrado e utilizado para controle da quantidade de substância ingerida por gaiola.

Os animais foram pesados no início do estudo, aos três meses e imediatamente antes da eutanásia, o que resultou em três tomadas de peso ao longo do trabalho.

**Quadro 1** – Cronograma da administração de líquidos

<b>GRUPO</b>	<b>SEGUNDA-FEIRA</b>	<b>QUARTA-FEIRA</b>	<b>SEXTA-FEIRA</b>
<b><i>Morf</i></b>	Retirar morfina Colocar água	Renovar água	Retirar água Colocar morfina
<b><i>Den</i></b>	Retirar DEN Colocar água	Renovar água	Retirar água Colocar DEN
<b><i>Den+morf</i></b>	Retirar DEN + morfina Colocar água	Renovar água	Retirar água Colocar DEN + morfina
<b><i>Den/morf</i></b>	Retirar DEN Colocar morfina	Renovar morfina	Retirar morfina Colocar DEN

#### 4.4 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E RESSECÇÃO DOS ESPÉCIMENS

A eutanásia dos animais ocorreu após 23 semanas ou 161 dias do início do experimento em todos os grupos pela inalação de éter etílico em campânula plástica fechada. Após a morte, o roedor foi pesado em balança eletrônica de precisão e fixado pelos quatro membros, com alfinetes, em uma pequena mesa cirúrgica de isopor.

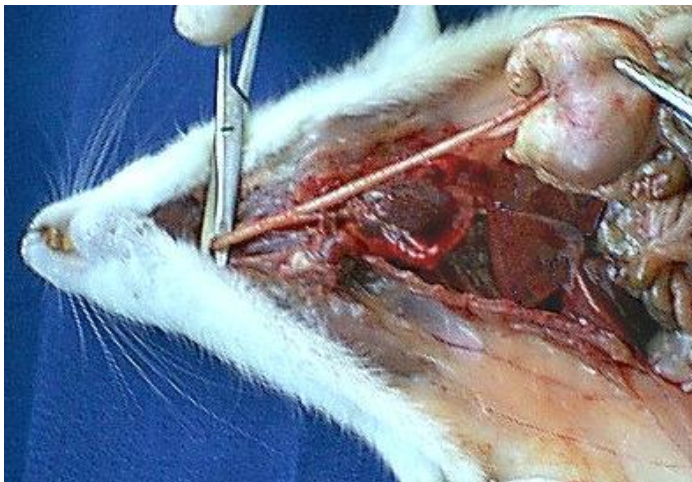
A abertura da pele foi feita por uma incisão mediana, suprapúbica, que se estendia à região submentoniana; após seu descolamento, a pele também foi fixada lateralmente à mesa por alfinetes.

A abertura do peritônio, inicialmente sobre a linha média, foi feita no sentido cranial até o xifóide, acompanhando, a partir daí, os rebordos costais, bilateralmente, em direção aos hipocôndrios, de forma a expor amplamente a cavidade abdominal.

Os gradeados costais foram seccionados em sua base, lateralmente, no sentido cranial, afinilando em direção ao manúbrio, enquanto o diafragma foi seccionado transversalmente, de um lado ao outro, até a ressecção completa do plastrão condroesternal, com intuito de expor amplamente a cavidade torácica e a região cervical.

O estômago foi tracionado suavemente, permitindo identificar o esôfago inferior. O fígado foi liberado de sobre a transição esofagogástrica e o esôfago progressivamente liberado no sentido ascendente. As vísceras torácicas foram liberadas em bloco, anteriormente, incluindo a traquéia torácica, de modo a permitir a liberação do esôfago até a transição cérvico-torácica.

O estômago foi, então, separado, por dissecação romba, de seus ligamentos laxos, do baço e do pâncreas, expondo o piloro, que foi, em seguida, seccionado. Liberados o estômago e as porções abdominal e torácica do esôfago, o segmento cervical desse foi individualizado pela tração anterior da traquéia, mantido o conjunto esôfago-gástrico sob tensão, até que esôfago e traquéia se tornassem indistinguíveis (hipofaringe). Nesse ponto, sob tração vigorosa, o esôfago foi seccionado o mais proximal possível (Figura 1).



**Figura 1 – Esôfago cérvico-tóraco-abdominal e estômago dissecados com secção em nível cervical**



Seguiu-se com a ressecção do fígado, através da secção dos ligamentos redondo e falciforme, da veia cava em sua porção supra-hepática e do pedículo hepático.

Os corpos dos animais foram acomodados em sacos plásticos, vedados ao final dos procedimentos de eutanásia e destinados de acordo com as normas do biotério da FEPPS.

#### **4.5 PREPARO E CONSERVAÇÃO DO ESÔFAGO E FÍGADO**

Depois de isolado o bloco de esôfago e estômago, o esôfago foi, então, acomodado sobre uma lâmina de isopor e seccionado do estômago distalmente à junção esofagogástrica. Foi introduzida na luz da extremidade distal do esôfago uma das hastes de uma tesoura de microdissecção, de ponta fina, servindo como guia e promovendo a secção e abertura longitudinal anterior do esôfago em toda a sua extensão. Foram fixadas com alfinetes as extremidades do esôfago, deixando toda a mucosa à mostra.

Depois de realizada a mensuração com auxílio de um paquímetro, os dados obtidos foram registrados nas planilhas de controle (Anexo B.1). O esôfago foi acondicionado em um frasco plástico contendo solução de formalina tamponada a 10%, identificado por uma etiqueta auto-adesiva de papel, onde constava uma senha formada pelo grupo e número correspondentes ao animal, nessa ordem.

O conjunto formado pela peça, alfinetes, lâmina de papel e lâmina de isopor foi colocado no interior dos frascos de maneira que o esôfago ficasse voltado para a superfície líquida.

Os espécimens hepáticos foram igualmente acondicionados em um frasco plástico contendo solução de formalina tamponada a 10% e identificados de maneira idêntica aos esôfagos.

#### 4.6 ANÁLISE MACROSCÓPICA

##### Esôfago

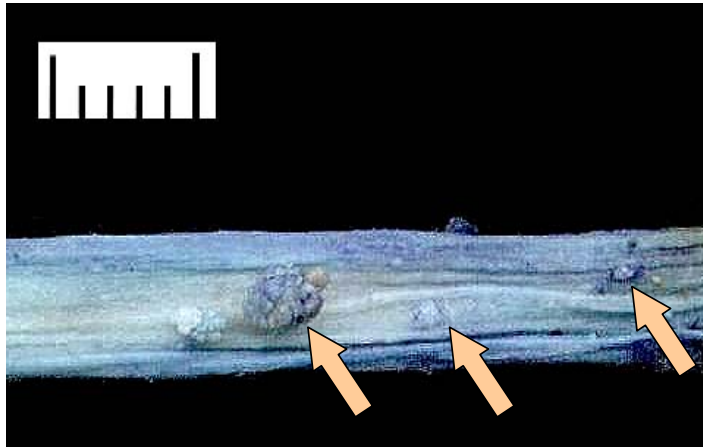
Três dias após a eutanásia dos animais, utilizou-se um microscópio estereoscópico para obter-se um aumento de dez vezes na análise das peças. Estas foram avaliadas após coloração com azul de toluidina, retornando, posteriormente, ao recipiente original (Figuras 2 e 3), os quais foram encaminhados para processamento no laboratório e posterior análise da microscopia.

A contagem dos tumores foi feita por um único examinador, a quem foi destinado o material de forma aleatória, sem que este conhecesse qual o grupo de origem da peça em exame.

**Cálculo do Índice Tumoral:** arbitrou-se previamente que seriam considerados tumores para fins desse estudo, todas as massas tumorais esofágicas  $\geq 1$  milímetro lineares. Após a contagem do número de lesões presentes no esôfago, obteve-se o Índice Tumoral de RUBIO (1987, 1993): número de lesões/comprimento do esôfago (cm) (Anexo B.1).



**Figura 2 – Lesões vegetantes múltiplas - setas (impregnado com azul de toluidina)**



**Figura 3 – Lesões vegetantes múltiplas, aumento de 8 vezes - setas (impregnado com azul de toluidina)**

### **Fígado**

Os espécimens hepáticos foram pesados, anotadas as características macroscópicas em relação à presença, quantidade, localização e tamanho dos tumores no protocolo específico (Anexo B.2). Foram feitos cortes paralelos em todos os lobos hepáticos, distando em 1 milímetro entre cada um e escolhidos os fragmentos que representavam amostra do tumor macroscópico. No caso de não haver alterações tumorais, padronizou-se a coleta de cortes de maior extensão dos lobos A, B e C (Figuras 4 e 5). Portanto, foram encaminhadas três amostras de cada fígado para o processamento no laboratório e posterior análise microscópica.

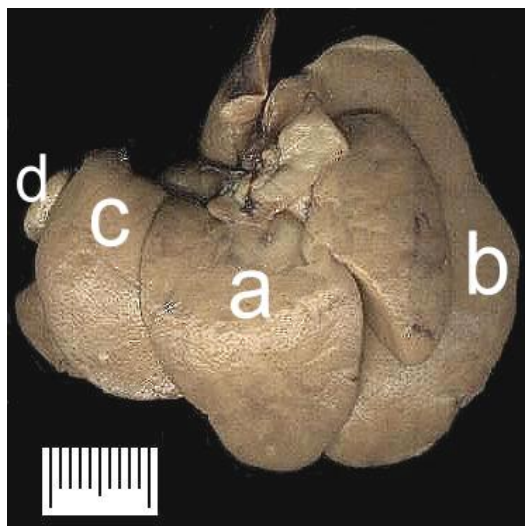


Figura 4 - Anatomia hepática do rato (modificado de HARTMANN, 1981): a – lobo medial; b - lobo esquerdo; c – lobo direito lateral; d – processo caudado e processo papilar (posteriores)

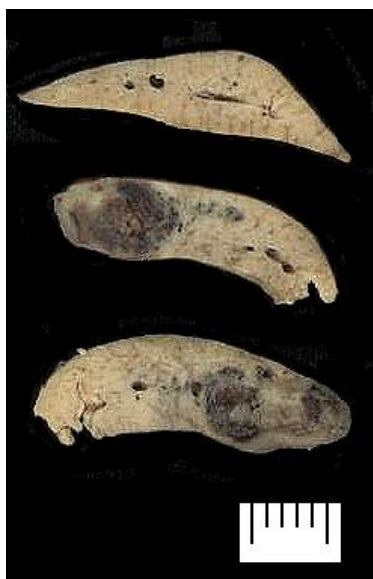


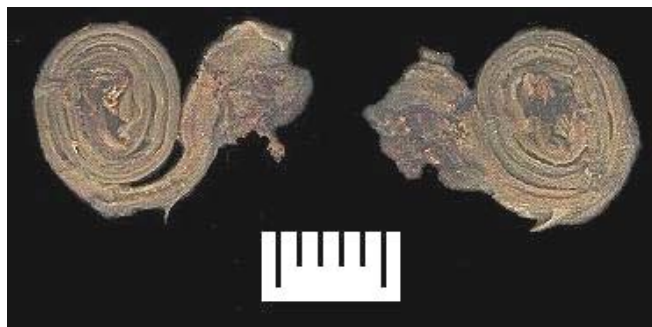
Figura 5 - Tumores macroscópicos nos segmentos A e B de fígado de animal do grupo *Den*

#### 4.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

As análises histopatológicas foram acompanhadas e as anotações protocolares realizadas pessoalmente pelo autor. Quando estavam presentes lesões de diferentes graus num mesmo espécimen, foi considerada sempre a de maior gravidade.

##### Esôfago

O processamento ocorreu após o esôfago ser enrolado sobre si mesmo a partir de uma das extremidades (tipo “rocambolé”), com vistas a gerar cortes histológicos que atingissem um perfil longitudinal da víscera (Figura 6). Após, os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). Foram, então, analisados em microscópio óptico comum para identificação de alterações histopatológicas por dois patologistas, aos quais foi designado o material de forma aleatória, sem que estes conhecessem o grupo de origem da peça em exame. Quando houve discordância entre eles, foi feita nova análise simultânea, até que se atingisse um consenso.



**Figura 6 - Espécimen esofágico enrolado sobre si mesmo, tipo “rocambolé”**

Os achados foram classificados como (RUBIO, 1983): 1) histologia normal; 2) hiperplasia; 3) esofagite; 4) papiloma; 5) displasia de baixo grau; 6) displasia de alto grau (incluídos aqui os casos de *carcinoma in situ*); 7) carcinoma invasor: da mucosa, da muscular da mucosa e da submucosa. (Anexo B.1) (Figuras 7 a 10)

Foram consideradas neoplasias malignas a displasia de alto grau e o carcinoma invasor, sendo denominadas de lesões neoplásicas esofágicas ou CA esofágico.

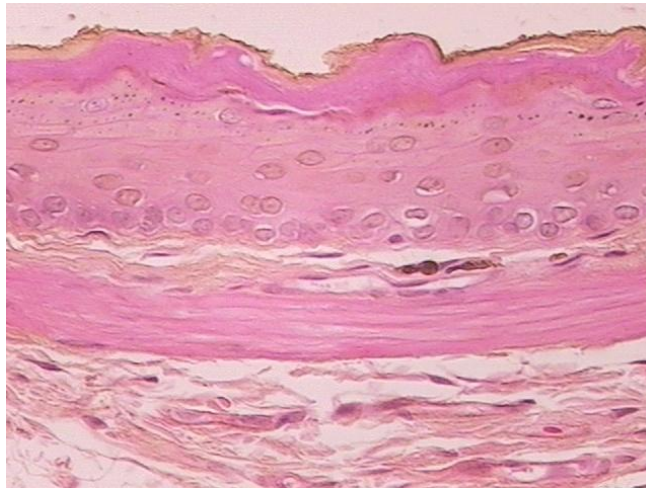


Figura 7 - HE 200x, histologia esofágica normal em animal do grupo *Morf*

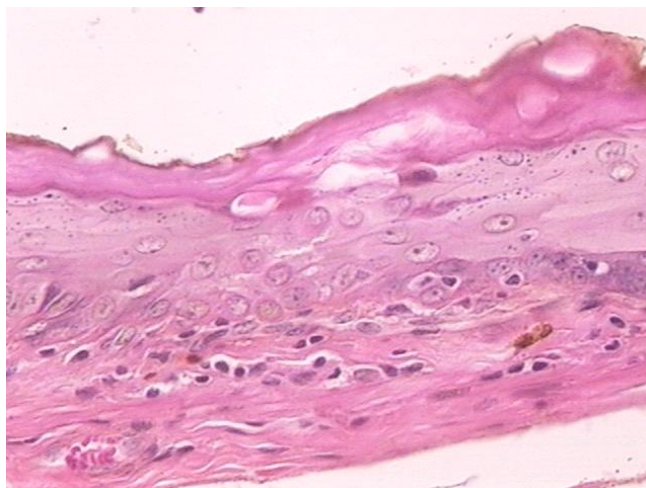


Figura 8 - HE 200x, displasia de baixo grau em esôfago de animal do grupo *Den/morf*

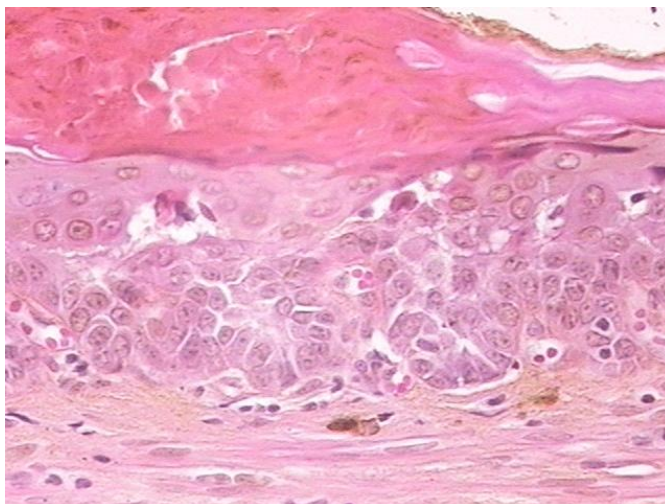


Figura 9 - HE 200x, displasia de alto grau em esôfago de animal do grupo *Den+morf*

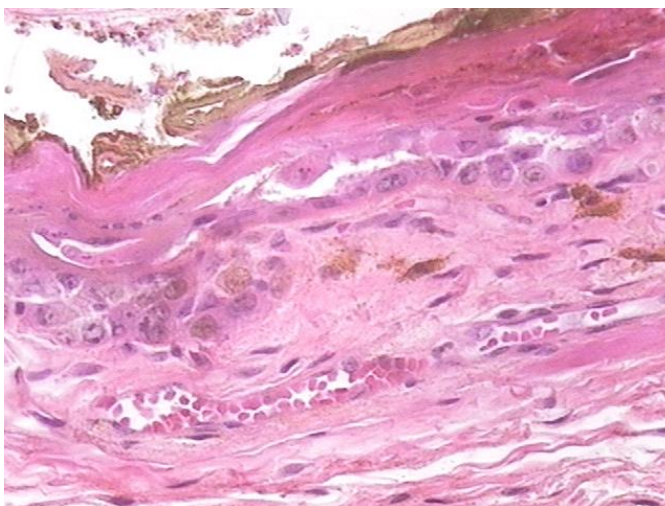


Figura 10 - HE 200x, carcinoma epidermóide invasor da muscular da mucosa em esôfago de animal do grupo *Den+morf*

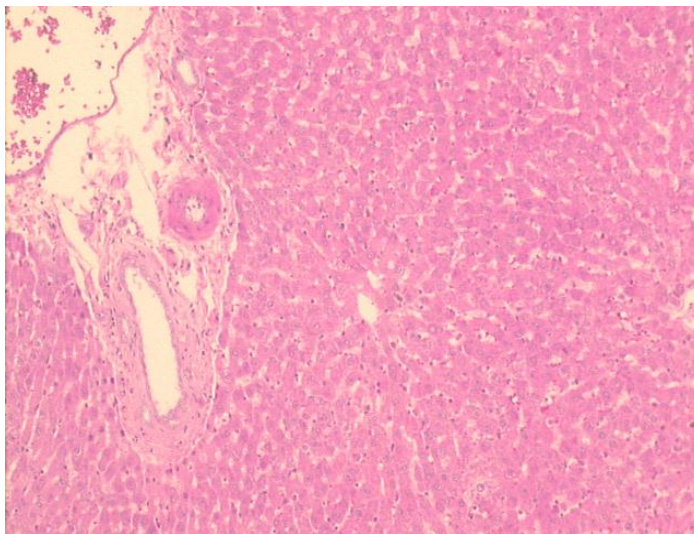


### Fígado

Durante o processamento, os cortes hepáticos foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina e analisados em microscópio óptico comum por um patologista especialista em doenças hepáticas, ao qual não foi informado a que grupo pertencia cada espécimen.

Os achados foram classificados como (BANNASCH, 1975): 1) histologia normal, 2) focos de células claras, 3) nódulos neoplásicos, 4) carcinoma hepatocelular (Anexo B.2) (Figuras 11 a 14).

Foram consideradas neoplasias malignas os focos de células claras, os nódulos neoplásicos e o carcinoma hepatocelular, sendo denominados de lesões neoplásicas hepáticas ou CA hepático.



**Figura 11 - HE 100x, histologia hepática normal em animal do grupo *Morf***



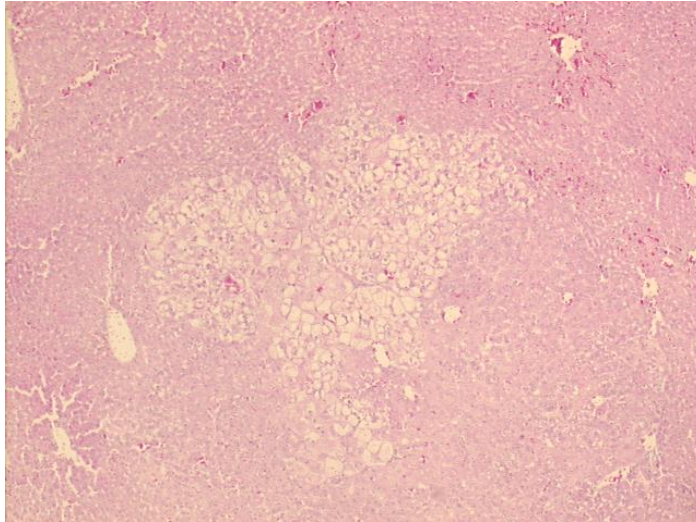


Figura 12 - HE 40x, foco de células claras em fígado de animal do grupo *Den*

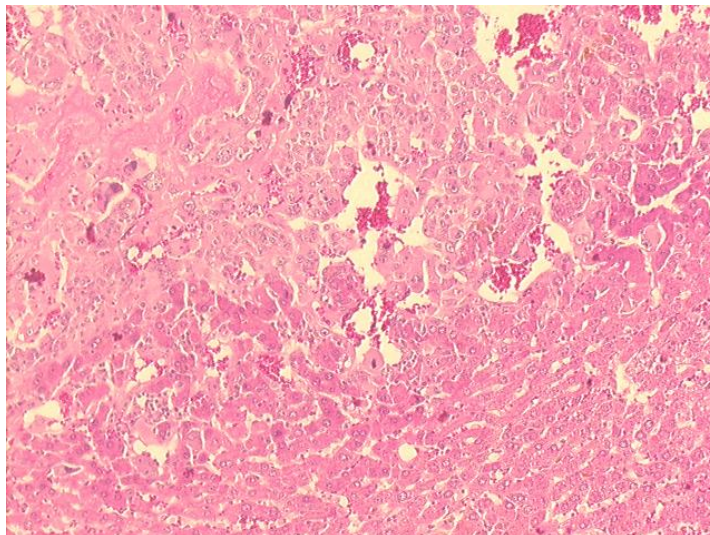


Figura 13 - HE 100x, carcinoma hepatocelular em animal do grupo *Den*

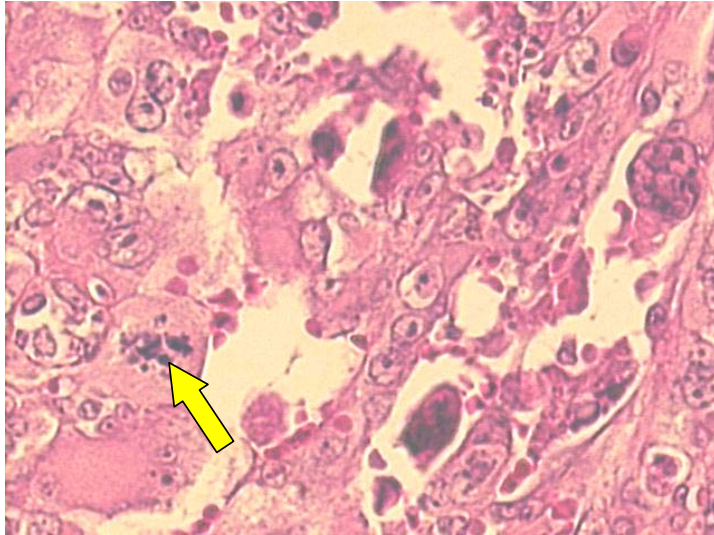


Figura 14 - HE 400x, carcinoma hepatocelular em animal do grupo *Den*; presença de mitose atípica (seta)

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o cálculo do tamanho da amostra, foram levadas em consideração as seguintes incidências estimadas de neoplasia esofágica por grupo: *morf.* 0; *den:* 30%; *den+morf* e *den/morf.* 60 a 65%. O número de animais para  $\alpha = 5\%$  e poder de 80%, foi de 44 para cada grupo.

Para as variáveis quantitativas, foram calculadas medidas descritivas incluindo a média e o desvio padrão. A comparação dos grupos foi feita através da ANOVA com um critério de classificação e localização das diferenças através do teste de Tukey.

Para todas as variáveis categóricas, foi realizada descrição com frequência e percentual. Grupos foram comparados por qui-quadrado com as diferenças localizadas entre os grupos pelo procedimento de post-hoc proposto por Zar. O nível de significância adotado no estudo foi de  $\alpha = 0,05$ . Os dados foram processados e analisados com o auxílio dos programas Excel 2000 e SPSS versão 12.0.

## 5 RESULTADOS

Não foram observadas alterações de conduta dos ratos secundárias à ingestão de sulfato de morfina.

Do total de 176 ratos fêmeas, houve duas mortes não programadas durante o experimento, ambas precoces (aos 31 e 74 dias de experimento). Não foi possível a realização de necropsia devido ao elevado grau de decomposição dos animais no momento em que foram encontrados. Ambas as mortes ocorreram dentro do grupo **Den**.

Houve impossibilidade de realização de exame histopatológico em 13 espécimens esofágicos: 2 devido às mortes não programadas e 11 por extravio acidental das peças durante o período de estocagem. Quatro foram as perdas no grupo **Morf**, 6 no grupo **Den** (2 por mortes não programadas e 4 por extravio), 2 no **Den+morf** e 1 no **Den/morf**. Não foi realizado exame histopatológico em 3 espécimens hepáticos: 2 devido às mortes não programadas (ambas em **Den**) e 1 por inadequação do material para análise (em **Den/morf**).

Portanto, 163 esôfagos e 173 fígados foram submetidos ao exame histológico.

## 5.1 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A morfina ingerida de forma isolada (**Morf**) não induziu carcinogênese significativa em nenhum dos órgãos analisados (Tabela 1).

A incidência de lesões pré-malignas e malignas esofágicas (displasias de alto grau, carcinomas *in situ* e epidermóides invasores) foi maior no grupo **Den** (71,1%) em relação a todos os demais grupos ( $p < 0,001$ ). Esta incidência foi similar entre os dois grupos que ingeriram DEN e morfina (**Den+morf** 50% e **Den/morf** 55,8%) (Tabela 1).

A incidência de lesões pré-malignas e malignas hepáticas (focos de células claras, nódulos displásicos e carcinomas hepatocelulares) foi menor no grupo que ingeriu DEN e morfina simultaneamente numa mesma solução (**Den+morf** 40,9%) do que nos que ingeriram o carcinógeno (**Den/morf** 81,4% e **Den** 73,8%) ( $p < 0,001$ ) (Tabela 1).

O efeito da morfina sobre o metabolismo de primeira passagem hepático da DEN pode ser observado na Tabela 1 e na Figura 15. O grupo **Den/morf** apresentou incidência maior de lesões neoplásicas hepáticas do que esofágicas (respectivamente 81,4% e 55,8%) ( $p = 0,013$ ), enquanto que os grupos **Den** (73,8% e 71,1%) e **Den+morf** (40,9% e 50%) apresentaram percentuais semelhantes dessas lesões nos dois órgãos.

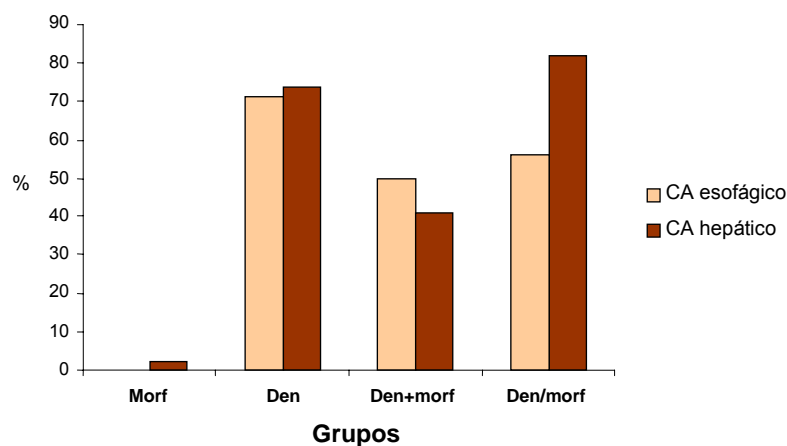
### Esôfago

A histologia foi normal na imensa maioria dos animais do grupo **Morf** (95%), em contraste com os grupos que ingeriram DEN, os quais foram normais em somente 2,6% no **Den**, 16,7% no **Den+morf** e 14% no **Den/morf**. O grupo **Den** teve uma maior incidência de alterações com tendência a lesões de maior desestruturação epitelial do que os grupos tratados também com morfina (**Den+morf** e **Den/morf**) (Tabela 2).

**Tabela 1 - Incidências neoplásicas e doses das substâncias estratificadas por grupos de tratamento**

	<i>Morf</i>	<i>Den</i>	<i>Den+morf</i>	<i>Den/morf</i>	P
<b>CA esofágico</b>	n = 40 0 (0,0) <sup>a</sup>	n = 38 27 (71,1) <sup>c</sup>	n = 42 21 (50,0) <sup>b</sup>	n = 43 24 (55,8) <sup>b</sup>	< 0,001
<b>CA hepático</b>	n = 44 1 (2,3) <sup>a</sup>	n = 42 31 (73,8) <sup>c</sup>	n = 44 18 (40,9) <sup>b</sup>	n = 43 35 (81,4) <sup>c</sup>	< 0,001
<b>Dose DEN</b>	-	2,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>c</sup>	< 0,001
<b>Dose Morfina</b>	2,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	-	2,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	< 0,001

Dados são expressos em número (percentual) de casos positivos ou em média ± desvio padrão de mg/kg/dia. Letras-índice distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Grupo *Morf*: ingeriu morfina; *Den*: dietilnitrosamina (DEN); *Den+morf*: DEN e morfina numa mesma solução; *Den/morf*: DEN e morfina em diferentes soluções e dias. CA esofágico: lesões consideradas pré-malignas (displasias de alto grau) e malignas (carcinomas epidermóides) no exame histopatológico. CA hepático: lesões consideradas pré-malignas (focos de células claras, nódulos displásicos) e malignas (carcinomas hepatocelulares) no exame histopatológico. "-": solução não fornecida para ingestão aos respectivos grupos.



**Figura 15 - Incidência de lesões esofágicas e hepáticas por grupo**

Tabela 2 - Frequência relativa dos achados na microscopia esofágica estratificada por grupos de tratamento

	<b>Morf</b> (n = 40)	<b>Den</b> (n= 38)	<b>Den+morf</b> (n = 42)	<b>Den/morf</b> (n = 43)	<b>P</b>
<b>Normal</b>	38 (95,0)	1 (2,6)	7 (16,7)	6 (14,0)	< 0,001
<b>Hiperplasia</b>	0 (0,0)	2 (5,3)	4 (9,5)	1 (2,3)	0,166
<b>Esofagite</b>	0 (0,0)	2 (5,3)	4 (9,5)	3 (7,0)	0,283
<b>Papiloma</b>	1 (2,5)	0 (0,0)	1 (2,4)	0 (0,0)	0,572
<b>Displasia de Baixo grau</b>	1 (2,5)	6 (15,8)	5 (11,9)	9 (20,9)	0,084
<b>Displasia de Alto grau</b>	0 (0,0)	19 (50,1)	19 (45,2)	18 (41,9)	< 0,001
<b>Carcinoma Invasor</b>	0 (0,0)	8 (21,0)	2 (4,8)	6 (14,0)	< 0,001
<i>Mucosa</i>	0 (0,0)	6 (15,8)	2 (4,8)	4 (9,3)	0,051
<i>Muscular da mucosa</i>	0 (0,0)	1 (2,6)	0 (0,0)	2 (4,7)	0,314
<i>Submucosa</i>	0 (0,0)	1 (2,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,346

Dados são expressos em número (percentual) de casos. Grupo **Morf**: ingeriu morfina; **Den**: dietilnitrosamina (DEN); **Den+morf**: DEN e morfina numa mesma solução; **Den/morf**: DEN e morfina em diferentes soluções e dias.

### Fígado

Quase a totalidade dos animais do grupo **Morf** apresentou histologia normal (97,7%), o que não ocorreu com os grupos que ingeriram DEN. Nestes, a histologia foi normal em 26,2% no **Den**, 59,1% no **Den+morf** e 18,2% no **Den/morf**. Embora o grupo **Den/morf** tenha apresentado maior incidência de alterações, os 3 casos de carcinoma hepatocelular ocorreram no grupo **Den** (Tabela 3).

**Tabela 3 - Frequência relativa dos achados na microscopia hepática estratificada por grupos de tratamento**

	<b>Morf</b> (n = 44)	<b>Den</b> (n= 42)	<b>Den+morf</b> (n = 44)	<b>Den/morf</b> (n = 43)	<b>P</b>
<b>Normal</b>	43 (97,7)	11 (26,2)	26 (59,1)	8 (18,6)	< 0,001
<b>Focos de células claras</b>	1 (2,3)	25 (59,5)	8 (18,2)	28 (65,1)	< 0,001
<b>Nódulos neoplásicos</b>	0 (0,0)	3 (7,1)	10 (22,7)	7 (16,3)	0,005
<b>Carcinoma hepatocelular</b>	0 (0,0)	3 (7,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,023

Dados são expressos em número (percentual) de casos. Grupo **Morf**: ingeriu morfina; **Den**: dietilnitrosamina (DEN); **Den+morf**: DEN e morfina numa mesma solução; **Den/morf**: DEN e morfina em diferentes soluções e dias.

## 5.2 ÍNDICE TUMORAL ESOFÁGICO – MACROSCOPIA

Na análise macroscópica dos esôfagos observou-se lesões papilares e vegetantes, indistintamente entre os grupos testados, apresentando entre 1 e 4 milímetros de diâmetro. As lesões apresentaram-se uniformemente distribuídas em toda a extensão do esôfago.

O Índice Tumoral esofágico proposto por Rubio (1987) (IT) foi calculado e apresentou os seguintes valores para cada grupo: **Morf**: 0; **Den**: 0,13; **Den+morf**: 0,03; e **Den/morf**: 0,06. O grupo **Den** apresentou significativamente maior IT do que os outros grupos ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença estatística entre os demais grupos (Tabela 4). Para dados do cálculo do IT, ver Anexo C.

O IT mostrou resultados semelhantes aos da histologia ( $p < 0,05$ ), tendo o grupo **Den**, apresentado maiores incidências de neoplasia maligna do que os demais grupos ( $p < 0,001$ ). Os grupos que ingeriram morfina e carcinógeno não apresentaram diferença na incidência neoplásica entre si tanto na macro quanto na microscopia. Estes achados sugerem que os resultados das análises do IT e da histologia são semelhantes (Tabela 4).

**Tabela 4 - Relação entre Índice Tumoral e histologia esofágica estratificada por grupo de tratamento**

	<i>Morf</i>	<i>Den</i>	<i>Den+morf</i>	<i>Den/morf</i>	<b>P</b>
<b>Índice Tumoral Esofágico</b>	n = 44 0 ± 0,0 <sup>b</sup>	n = 42 0,13 ± 0,2 <sup>a</sup>	n = 44 0,03 ± 0,2 <sup>b</sup>	n = 44 0,06 ± 0,2 <sup>b</sup>	< 0,001
<b>CA esofágico</b>	n = 40 0 (0,0) <sup>a</sup>	n = 38 27 (71,1) <sup>c</sup>	n = 42 21 (50,0) <sup>b</sup>	n = 43 24 (55,8) <sup>b</sup>	< 0,001

Dados são expressos em número (percentual) de casos positivos ou em média ± desvio padrão de mg/kg/dia. Letras-índice distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Grupo *Morf*: ingeriu morfina; *Den*: dietilnitrosamina (DEN); *Den+morf*: DEN e morfina numa mesma solução; *Den/morf*: DEN e morfina em diferentes soluções e dias. Índice Tumoral de Rubio (IT): contagem macroscópica do número de lesões esofágicas / comprimento do esôfago (cm). CA esofágico: lesões pré-malignas (displasia de alto grau), e malignas (carcinomas epidermóides) no exame Histopatológico.

### 5.3 DOSAGEM DAS SUBSTÂNCIAS

A dosagem de cada substância ingerida variou de acordo com o tipo de solução oferecida (Tabela 1). A dose ingerida foi calculada com base na quantidade semanal de ingestão da solução, no peso dos animais e na concentração das substâncias no líquido oferecido aos animais. A pesagem das ratas foi realizada no início do estudo, aos três meses e imediatamente antes da eutanásia, o que resultou em três tomadas de peso ao longo do trabalho. As doses semanais das substâncias ingeridas pelos animais encontram-se no Anexo D.

A dose média ingerida foi inferior à estimada de 5 mg/kg/dia em todos os grupos. Entre os expostos ao carcinógeno, todos os grupos ingeriram doses diferentes entre si (*Den*: 2,9 mg/kg/dia, *Den+morf*: 2,3 mg/kg/dia, *Den/morf*: 2,8 mg/kg/dia) ( $p < 0,001$ ) (Tabela 1).

Entre os grupos que ingeriram morfina (*Morf*: 2,5 mg/kg/dia; *Den+morf*: 2,3 mg/kg/dia; *Den/morf*: 2,4 mg/kg/dia), o *Den+morf* ingeriu menos morfina do que os outros grupos ( $p < 0,001$ ) (Tabela 1).



Estima-se que a perda de soluções tenha sido de 10 ml/gaiola/semana, em virtude da vibração das gaiolas pelo movimento dos animais, com conseqüente gotejamento das soluções dos frascos para o fundo das gaiolas (FEPPS, 2000). Cada grupo foi composto por 11 gaiolas e as soluções foram oferecidas durante 3 dias por semana, com um consumo médio de 3.450 ml. Desta forma, a perda estimada de solução por grupo foi de 47,14 ml por semana (1,37%). Por ser uma quantidade insignificante, estas perdas não foram incluídas no cálculo da dose final ingerida pelos animais.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 MATERIAL E MÉTODOS

Os compostos nitrosos apresentam-se na dieta ou no ambiente em doses bem inferiores àquelas necessárias para desenvolver câncer, por isso a grande preocupação é com a sua exposição crônica. Vários autores referiram a presença de nitratos carcinogênicos na dieta (principalmente em conservantes, corantes e aromatizantes alimentares de carnes, peixes, vegetais, cogumelos, queijos e leite), no tabaco, em bebidas alcoólicas (cerveja, *whisky* e licores), na exposição ocupacional (indústria da borracha, manufatura de pneus, pesticidas, cosméticos e curtimento do couro) e na higiene pessoal e doméstica (cosméticos, xampus e detergentes) (ENDER, 1967; SIDDIQI, 1991; CHENG, 1992; LIJINSKY, 1992). Outros estudos demonstraram seu potencial hepatotóxico e carcinogênico, tanto em seres humanos como em animais (SCHMÄHL, 1960; BARTSCH, 1989, PÉREZ, 2005), e foi descrito que as nitrosaminas produziam a alquilação do DNA em tecidos humanos *in vitro* (LIJINSKY, 1992). A partir dessas pesquisas, foi sugerido que as nitrosaminas poderiam estar relacionadas ao câncer de esôfago no homem (ARCHER, 1989; BARTSCH, 1989; FORMAN, 1989; LU, 1991; LIN, 2002).

A incidência do câncer de esôfago é influenciada por diferentes fatores nas diversas áreas endêmicas do mundo. Na Europa e Estados Unidos da América é relacionado com o consumo do álcool e tabaco, associados ou não (TUYNS, 1980; BLOT, 1994), e no norte do Irã foi associado por epidemiologistas com o fumo do ópio e a ingestão de resíduos do cachimbo de ópio (*sukhteh*). Experimentos mostraram que o etanol altera a farmacocinética das nitrosaminas (SWANN, 1984; ANDERSON, 1995). Desta forma, elas são mais expostas ao tecido esofágico, sendo capazes de induzir câncer de esôfago em animais (SWANN, 1984; AZE, 1993; ANDERSON, 1995). Estes estudos aumentaram ainda mais as suspeitas de que a exposição às nitrosaminas seria um importante fator neste tipo de câncer no homem. RIBEIRO PINTO (1997) mostrou que a morfina, o principal alcalóide do ópio, também modifica a farmacocinética e distribuição da DEN e que as mudanças são similares àquelas produzidas pelo etanol. Isto reforça a hipótese de que estas duas substâncias possuem uma base comum na influência sobre a carcinogênese esofágica: seus efeitos na farmacocinética das nitrosaminas às quais o homem está exposto.

O conhecimento de que os compostos N-nitrosos exibem atividade biológica similar em tecidos animais e humanos, sugere que as observações feitas em ratos poderiam ser imputadas ao homem (ARCHER, 1989). A descoberta de que as nitrosaminas apresentam um organotropismo bem definido permitiu o desenvolvimento de modelos de estudo de câncer em vários órgãos. Vários autores produziram a carcinogênese esofágica em animais com a dietilnitrosamina utilizando camundongos (RUBIO, 1983, 1987; KRUEL, 1992; GURSKY, 1999), ratos búfalo (REUBER, 1975, 1977) e ratos *Wistar* (MANDARD, 1984) com incidências variáveis de carcinoma esofágico. Várias espécies de animais, tais como coelhos (IIZUKA, 1977), galináceos (YANG, 1980) e cães da raça Beagle (SASAJIMA, 1977) foram utilizados em outros experimentos. Porém o custo operacional, bem como o longo tempo para completar-se a carcinogênese esofágica, limitam o seu uso.

No presente estudo utilizou-se ratos da cepa *Wistar* com o objetivo de assemelhar-se ao estudo de RIBEIRO PINTO (1997), no qual foram utilizados ratos *Sprague-Dawley* e

medidos parâmetros bioquímicos após a administração em curto prazo de DEN e morfina nos tecidos esofágico, hepático e renal. Seu custo operacional aceitavelmente baixo e a adaptabilidade às condições de trabalho, foram fatores que reforçaram o uso desta espécie. A utilização de fêmeas e o número de quatro animais por gaiola visaram evitar os conflitos por estabelecimento de lideranças territoriais, atitude quase exclusiva dos machos, minimizando, desta forma, o número de mortes não programadas (KRUEL, 1992).

O número e a distribuição dos animais empregados no presente estudo confirmaram ser adequados para uma análise satisfatória e que suportaram as perdas durante as análises microscópicas esofágicas em número total de 13 (7,4%), sem comprometimento dos resultados e respeitando os princípios bioéticos vigentes (GOLDIM, 1997). Entre as perdas, duas foram por óbito. Não foi possível a realização de necropsia devido ao elevado grau de decomposição dos animais no momento em que foram encontrados: em um dos casos havia alguns fragmentos ósseos e em outro, somente pequena quantidade de pêlos dentro da caixa. Portanto, a causa destes óbitos não pode ser esclarecida. Três (1,7%) espécimens hepáticos não puderam ser examinados: dois devido às mortes não programadas e um por inadequação do material para análise.

Foi utilizado um composto alimentar (Anexo A) semelhante aos usados em outros experimentos, que atendia aos critérios do *National Research Council* e *National Institute of Health – USA*, e que já havia provado não influir no processo de carcinogênese (RUBIO, 1983, 1987; MANDARD, 1984; KRUEL, 1992; GURSKY, 1999; VELHO, 2003).

A administração das substâncias diluídas na água de beber deveu-se a simplicidade do método, exigindo mínima manipulação dos ratos e comprovada eficiência (RUBIO, 1983, 1987; MANDARD, 1984; KRUEL, 1992; GURSKY, 1999; SCHIRMER, 1999). A eutanásia dos animais foi realizada por asfixia em caixa plástica com éter etílico, de acordo com as normas bioéticas vigentes, no número de vinte animais por dia, divididos em nove dias

diferentes, respeitando a tabela cronológica de 161 dias de experimento para cada animal, organizado antes do início do experimento.

## 6.2 ANÁLISE DAS VARIÁVEIS EM ESTUDO

Com o intuito ético de diminuir a eutanásia desnecessária dos animais, foi constituído um grupo controle com oito ratas (ao invés de 44) ingerindo somente água. Nenhum destes animais apresentou alteração macroscópica no esôfago (DILLENBURG, 2000), nem microscópica em esôfago e fígado. Este grupo foi excluído da análise, pois o número de oito animais provocou forte assimetria dos dados, prejudicando a adequada análise estatística. Os demais trabalhos da linha de pesquisa da instituição também utilizaram a mesma fonte de água em seus grupos controles de ingestão de água, somando centenas de animais (KRUEL, 1996; GURSKY, 1999; SCHIRMER, 1999; MELLO, 1999; VELHO, 2003). Nestes estudos, não houve um único caso de alteração maligna, o que justifica a utilização deste dado histórico associado ao do presente estudo para a exclusão do referido grupo de ingestão de água da análise estatística.

### 6.2.1 Dosagem das substâncias

O conhecimento do peso aferido no início, meio e final do experimento, da quantidade semanal de líquidos ingeridos e da concentração das substâncias na solução aquosa permitiu o cálculo da dose semanal realmente ingerida de cada substância. Utilizou-se este parâmetro pelos seguintes motivos: a) é facilmente comparável aos inúmeros estudos que relatam as doses administradas aos animais, sejam eles modelos experimentais de carcinogênese ou experimentos com morfina ou outras substâncias

(RIBEIRO PINTO, 1997; COCHIN 1959; SLADEK, 1974; SCHMÄHL, 1960; GIBEL, 1967); b) permite a correção das variações de peso e quantidade ingerida de líquidos durante os meses de experimentação, tornando a variável de mensuração (mg/kg/dia) mais precisa e direta do que simplesmente a quantidade ingerida de líquidos citada em outros trabalhos (RUBIO, 1987, 1993; KRUEL, 1992; GURSKY, 1999; MELO, 1999; SCHIRMER, 1999 VELHO, 2003); c) serve de parâmetro de controle das incidências neoplásicas entre os grupos, avaliando se as diferenças são conseqüências da ação das substâncias ou das diferentes doses das mesmas.

As doses de DEN utilizadas nos trabalhos iniciais, como o de BAKER *et al.* (1974), tinham uma elevada hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. Por isso, estudos posteriores como os de RUBIO *et al.* (1987), utilizaram doses menores a fim de diminuir a mortalidade dos animais de experimentação. Este autor, administrando DEN na concentração de 0,04 ml/litro de água de beber durante três dias por semana, promoveu tumores esofágicos em camundongos após períodos de 4 e 6 meses (1 e 3 tumores/cm de mucosa esofágica, respectivamente). A concentração de 0,04 ml/litro de água é equivalente à dose de 7 mg/kg/dia, dose superior à utilizada neste estudo. Vários outros autores (KRUEL, 1992; GURSKY, 1999; MELO, 1999; SCHIRMER, 1999 VELHO, 2003) utilizaram-se deste modelo em camundongos e ratos, mostrando graus variados de incidência tumoral esofágica. GIBEL (1967) provocou tumores esofágicos em 30% e 56% dos ratos com as respectivas doses de 2,5 e 10 mg/kg/dia, e hepáticos em 100% dos que receberam estas mesmas doses. Além disto, foi demonstrada a alquilação dos DNAs hepático e esofágico com 3mg/kg/dose (RIBEIRO PINTO, 1997). SCHMÄHL *et al.* (1960) provocaram tumores hepáticos em quase todos os ratos de seu experimento, no período de  $138 \pm 10$  dias, utilizando a dose de 5mg/kg/dia de DEN, ingerida diariamente. No presente estudo, optou-se pela dose de 5mg/kg/dia de DEN, durante três dias por semana, assemelhando-se aos modelos de RUBIO *et al.* (1987) e RIBEIRO PINTO (1997) com o intuito de diminuir a mortalidade de origem hepática. O tempo de exposição de 23 semanas ou 161 dias foi

adotado por ser um período em que ocorre um grande número de lesões cancerosas com níveis aceitáveis de mortalidade (MELO, 1999; VELHO, 2003).

Foi demonstrado que uma dose única de 5mg/kg de sulfato de morfina aumentou a alquilação do DNA esofágico de ratos em 90% e diminuiu a do hepático em 10%, quando administrada 45 minutos antes de uma única dose de 3 mg/kg de DEN. Tais resultados não se alteraram significativamente com o aumento das doses de sulfato de morfina para 10 e 20 mg/kg (RIBEIRO PINTO, 1997). Entretanto, a ingestão de 15,5 mg/kg/dia provocou importante diminuição na atividade geral dos animais e conseqüente menor ingestão das soluções como demonstrado em estudo piloto detalhado em DILLENBURG (2000). No presente estudo, optou-se pela utilização de 5mg/kg/dia de sulfato de morfina, por ser uma dose capaz de provocar a alteração farmacocinética referida por RIBEIRO PINTO (1997), sem provocar diminuição da atividade dos animais. Entretanto, as doses ingeridas foram significativamente inferiores às estimadas, variando entre 2,3 e 2,5 mg/kg/dia. Estas doses menores equivalem a 170 mg/dia no homem, semelhantes às utilizadas em analgesia na medicina ocidental, tornando-as comparáveis as desta população de usuários crônicos de morfina. Por outro lado, a dose é inferior às relatadas na população de adictos do norte do Irã que recebiam 3 gramas diárias de ópio (HEWER, 1978). Por esta razão, provavelmente não traduzem validade para esta população, na qual foi primeiramente descrita a relação entre ópio e câncer de esôfago (DOWLATSHAHI, 1985).

As doses realmente ingeridas pelos animais ficaram entre 46% e 58,9% das esperadas para todas as substâncias (Tabela 1). As baixas temperaturas do ambiente de experimentação, desprovido de climatização, durante o inverno (13 a 20°C em pelo menos metade do experimento), podem ter contribuído para uma menor ingestão líquida pelos animais e conseqüente menor exposição às substâncias. Embora as carcinogêneses esofágica e hepática sejam reconhecidamente dose-dependentes, a menor dosagem de DEN não teria influído decisivamente sobre os resultados destas carcinogêneses no presente estudo. Rubio *et al.* (1987, 1993) descreveram que, além da dose administrada, o

tempo transcorrido seria de grande importância na formação de tumores em esôfagos de camundongos. Segundo estes autores, clones de células esofagianas seriam “programadas” à carcinogênese em estágios precoces do tratamento com a DEN, e que um grande número de tumores ocorreriam em intervalos maiores mesmo após algumas poucas doses de DEN. Enquanto animais tratados por três meses apresentaram IT = 0,9, os tratados por três meses e mantidos vivos por quatro meses adicionais, com uma dieta livre de carcinógeno, apresentaram IT cinco vezes maior (IT = 4,6) (RUBIO, 1993). No presente estudo, desenvolveu-se no grupo **Den** uma percentagem de animais acometidos por lesões neoplásicas esofágicas muito superior à estimada previamente ao início do estudo (obtida = 71%; estimada = 30%), a despeito das doses ingeridas terem sido 59% das esperadas neste grupo. Outros autores relataram incidências de carcinomas hepatocelulares próximas a 100% com doses diárias entre 5 e 10 mg/kg/dia de DEN com mortalidade de até 10% (SCHMÄHL, 1960; GIBEL, 1967). A partir disto, pode-se inferir que: a) tanto o tempo transcorrido de seis meses quanto as doses realmente ingeridas de DEN foram adequados para provocar os efeitos carcinogênicos esperados nos dois órgãos avaliados, com mortalidade praticamente nula, apesar das doses terem sido muito inferiores às estimadas no início do estudo; b) as baixas temperaturas ambientais não interferiram no processo de carcinogênese induzida pela DEN em esôfago e fígado, mesmo podendo ter diminuído a ingestão hídrica pelos animais e, em consequência, da dosagem das substâncias.

A significativa diferença das doses ingeridas de DEN entre os grupos (**Den**: 2,9 mg/kg/dia, **Den+morf**: 2,3 mg/kg/dia e **Den/morf**: 2,8 mg/kg/dia) ( $p < 0,001$ ) (Tabela 1) determinou que as incidências neoplásicas poderiam ter sido influenciadas pelas diferentes doses de carcinógeno ingerido.

Em relação à morfina, a significativa diferença entre as doses de **Den+morf** (2,3 mg/kg/dia) e os demais grupos (**Morf**: 2,5 mg/kg/dia e **Den/morf**: 2,4 mg/kg/dia) ( $p < 0,001$ ) não parece relevante (Tabela 1). A razão para assumir-se tal similaridade de efeito entre os grupos estaria na incapacidade de indução direta da carcinogênese pela morfina como



observado no grupo **Morf** e descrito por outros autores (YOO, 1990, RIBEIRO PINTO, 1997). Além disso, a morfina é quase totalmente eliminada nas primeiras 24 horas após sua administração (OSBORNE, 1997), não exercendo efeitos cumulativos decorrentes da quantidade ingerida como no caso da DEN. Desta forma, considerou-se que a ingestão de quatro dias por semana de morfina pelo grupo **Den/morf** não o tornaria um grupo diferente dos que ingeriram morfina três dias por semana.

### 6.2.2 Índice Tumoral esofágico - macroscopia

Após a retirada dos órgãos dos animais, foi realizada a análise macroscópica esofágica pelo pesquisador. As peças foram entregues sem qualquer identificação com o objetivo de evitar resultados potencialmente tendenciosos. A coloração da peça esofágica com azul de toluidina e o uso do microscópio estereoscópico facilitaram a leitura das lesões com, no mínimo, um milímetro de diâmetro, técnicas utilizadas em outros trabalhos (GURSKY, 1999; SCHIRMER, 1999; VELHO, 2003). Obtinha-se, como já descrito, o Índice Tumoral esofágico de Rubio (1987) que se mostrou adequado na avaliação da incidência tumoral esofágica em ratos e camundongos previamente (RUBIO 1987, 1993; KRUEL, 1996; VELHO, 2003; GURSKY, 1999; SCHIRMER, 1999). A comparação entre os achados macroscópicos e microscópicos classifica este índice como adequado na avaliação da incidência de neoplasias esofágicas também no presente estudo (Tabela 4) ( $p < 0,05$ ).

### 6.2.3 Análise histopatológica

As peças examinadas foram preparadas em Hematoxilina-Eosina, técnica esta consagrada na avaliação histopatológica de lesões pré-malignas e malignas, tanto hepáticas quanto esofágicas, por diversos autores (BANNASCH, 1975; WATANABE, 1990; DAWSEY, 1994; KRUEL, 1996; RIDDELL, 1998; GURSKY, 1999; SCHIRMER, 1999; SCHLEMPER, 2001; SAEKI, 2002; VELHO, 2003). O exame histológico foi realizado por patologistas que não conheciam a que grupo pertencia cada espécimen para evitar-se resultados tendenciosos.

Os percentuais de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, obtidos entre os animais expostos somente à DEN, foram de 71,1% no esôfago e 73,8% no fígado. Estes dados foram semelhantes aos relatados por outros autores que se utilizaram de doses equivalentes às estimadas no início deste estudo (SCHMÄHL, 1960; GIBEL, 1967; REUBER, 1975; MANDARD, 1984).

A análise dos dados histológicos relativos à influência da morfina sobre os efeitos da DEN foi didaticamente dividida em duas etapas: 1) carcinogênese esofágica e hepática; 2) metabolismo hepático.

### 6.2.3.1 Efeito da morfina sobre a carcinogênese esofágica e hepática

Não há referência na literatura, até o momento, de modelos experimentais que estudaram efeitos carcinogênicos diretos ou indiretos da morfina sobre a mucosa esofágica.

Houve incidência maior de lesões neoplásicas esofágicas nos animais que ingeriram somente o carcinógeno (71,1%) ( $p < 0,001$ ) em relação aos dois grupos que ingeriram DEN e morfina (**Den+morf** e **Den/morf**). Estes dois grupos apresentaram incidência neoplásica semelhante entre si (50 e 55,8%) (Tabela 1). Apesar das doses de DEN terem sido diferentes entre os grupos **Den**, **Den/morf** e **Den+morf** (2,9, 2,8 e 2,3 mg/kg/dia) ( $p < 0,001$ ), observou-se uma relativa correspondência entre elas e a incidência de neoplasias esofágicas: o grupo que ingeriu mais carcinógeno apresentou maior incidência de neoplasia. Estes achados sugerem que a morfina não exerceria um efeito carcinogênico indutor sobre a mucosa esofágica.

A incidência de lesões neoplásicas hepáticas não encontrou correspondência com a dose ingerida do carcinógeno. Os grupos **Den** e **Den/morf** apresentaram incidências similares entre si, e maiores do que **Den+morf** (73,8%, 81,4% e 40,9%) ( $p < 0,001$ ), apesar das doses terem sido diferentes entre todos os grupos (2,9, 2,8 e 2,3 mg/kg/dia) ( $p < 0,001$ ) (Tabela 1). Observa-se que **Den** ingeriu uma dose significativamente maior do carcinógeno do que **Den/morf**, mas foi acometido por 73,8% de neoplasias em comparação com 81,4% do outro grupo. Apesar das incidências não serem significativamente diferentes, estes resultados poderiam expressar algum efeito da morfina sobre a carcinogênese hepática. Permanece a questão: se as doses de carcinógeno fossem similares, haveria uma significativa maior incidência de neoplasias no grupo **Den/morf** em relação a **Den**? Os dados não permitem concluir se a morfina exerceria efeito sobre a carcinogênese hepática.

Embora o carcinoma hepatocelular tenha ocorrido apenas 3 vezes, todos acometeram os animais do grupo **Den**, mostrando que a DEN, sem influência da morfina, provocou lesões de maior gravidade do que nos demais grupos.

Foi encontrada lesão (2,3%) pré-neoplásica hepática em um animal do grupo **Morf**, um foco de células claras. BANNASCH *et al.* (1975) afirmam que estas lesões podem ocorrer nos animais controles com incidência tão baixa quanto a ocorrência natural de carcinoma hepatocelular.

### **6.2.3.2 Efeito da morfina sobre o metabolismo hepático da Dietilnitrosamina**

O mecanismo das mudanças produzidas pela morfina não é claro, mas é provável a participação do sistema enzimático citocromo P450 (RIBEIRO PINTO, 1997). Embora tratamentos crônicos ou subagudos de ratos machos adultos com morfina tenham diminuído os níveis de alguns P450s, doses elevadas de morfina entre 5 e 20 mg/kg/dia administradas a ratos por quatro dias ou mais induziram outros P450s como os subgrupos 1A2, 2B1 e 2E1 (RANE, 1995). O P450 2E1 realiza uma parcela substancial do metabolismo hepático da DEN no rato (YOO, 1990). A morfina, além de ser metabolizada pelo P450 hepático (YOO, 1990; RIBEIRO PINTO, 1997), atua como agente indutor deste P450 e poderia influenciar no metabolismo de primeira passagem hepática da DEN, tanto estimulando quanto atenuando a ativação do carcinógeno. A morfina administrada de forma isolada, interrompida (três dias por semana) e crônica induziria semanalmente o subgrupo 2E1 da enzima P450 hepático, mantendo-o ativado e livre para o momento em que o carcinógeno fosse ingerido. Assim, a DEN seria largamente metabolizada no fígado, tornando-se localmente ativa e capaz de provocar alta incidência de carcinoma neste órgão. Por ter sido amplamente metabolizada no fígado, haveria menor biodisponibilidade hemática para outros órgãos que

também possuíssem P450 como o esôfago, com conseqüente menor ativação local e capacidade de formação de carcinomas neste órgão. Doses reconhecidamente carcinogênicas de DEN, como as oferecidas ao grupo **Den/morf**, poderiam ter se utilizado deste mecanismo metabólico da pré-ativação pela morfina para provocar um significativo maior percentual de neoplasias hepáticas do que esofágicas, respectivamente 81,4% e 55,8% (Tabela 1). Através deste mesmo mecanismo poderia ter se formado uma lesão hepática pré-maligna no grupo **Morf**, no qual carcinógenos naturais seriam metabolizados mais facilmente ao encontrarem um subgrupo enzimático previamente ativado.

Ao ser ofertado DEN e morfina simultaneamente, poderia haver a indução e utilização do P450 2E1 hepático pela morfina, mantendo este P450 “ocupado” no momento em que o carcinógeno realiza seu metabolismo de primeira passagem, caracterizando um fenômeno competitivo entre as duas substâncias. Dependendo do grau de competição em nível hepático, a biodisponibilidade hemática de DEN estaria inalterada ou mesmo aumentada, com conseqüente metabolização e carcinogênese também inalteradas ou aumentadas no esôfago. Este poderia ter sido o fenômeno metabólico ocorrido no grupo **Den+morf**, no qual observaram-se resultados estatisticamente similares de 40,9% de neoplasias hepáticas e 50% de esofágicas (Tabela 1).

Estes achados sugerem que a morfina poderia estimular o metabolismo hepático da DEN, quando em exposição crônica, nas situações em que as substâncias foram ingeridas de forma intercalada. Esta hipótese baseia-se em achados indiretos de incidência neoplásica em achados histológicos, e necessitaria de novos estudos com aferições metabólicas diretas para conclusões mais definitivas.

### 6.3 PERSPECTIVAS FUTURAS DA LINHA DE PESQUISA

Este trabalho abre caminho para estudos subseqüentes, baseados em avaliações de biologia molecular de esôfago e fígado, para conclusões acessórias a respeito da influência da morfina na carcinogênese induzida pela DEN em modelos experimentais.

## **7 CONCLUSÃO**

Neste modelo experimental, concluímos que:

a morfina não apresentou efeito indutor sobre a carcinogênese esofágica induzida pela ingestão de dietilnitrosamina.

## 8 REFERÊNCIAS

1. Abnet CC, Saadatian-Elahi M, Pourshams A, Boffeta P, Feizzadeh A, Brennan P, et al. Reliability and validity of opiate use self-report in a population at high risk for esophageal cancer in Golestan, Iran. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13:1068-70.
2. Anderson LM, Chhabra SK, Nerurkar PV, Souliotis VL, Kyrtopoulos SA. Alcohol-related cancer risk: a toxicokinetic hypothesis. *Alcohol* 1995;12:97-104.
3. Archer MC. Mechanisms of action of N-nitroso compounds. *Cancer Surv* 1989;8:241-50.
4. Attwood SE, Smyrk TC, DeMeester TR, Mirvish SS, Stein HJ, Hinder RA. Duodeno-esophageal reflux and the development of esophageal adenocarcinoma in rats. *Surgery* 1992;111:503-10.
5. Aze Y, Toyoda K, Furukawa F, Mitsumori K, Takahashi M. Enhancing effect of ethanol on esophageal tumor development in rats by initiation of diethylnitrosamine. *Carcinogenesis* 1993;14:37-40.
6. Baker JR, Mason MM, Yerganian G, Weisburger EK, Weisburger JH. Induction of tumors of the stomach and esophagus in inbred Chinese hamsters by oral diethylnitrosamine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974;146:291-3.
7. Bannasch P, Becker FF, Busey W, Farber E, Firminger HI, Garner FM, Gössner W, et al. Report of a workshop on classification of specific hepatocellular lesions in rats. *Cancer Research* 1975; 35:3214-23.
8. Bartsch H, Ohshima H, Pignatelli B, Calmels S. Human exposure to endogenous N-nitroso compounds: quantitative estimates in subjects at high risk for cancer of the oral cavity, oesophagus, stomach and urinary bladder. *Cancer Surv* 1989;8:335-62.
9. Blot WJ, Li JY, Taylor PR, Guo W, Dawsey S, Wang GQ, et al. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1483-92.
10. Blot WJ. Esophageal cancer trends and risk factors. *Semin Oncol* 1994;21:403-10.



11. Bosman FT. Dysplasia classification: pathology in disgrace? *J Pathol* 2001;194:143-4.
12. Cheng KK, Day NE, Duffy SW, Lam TH, Fok M, Wong J. Pickled vegetables in the aetiology of oesophageal cancer in Hong Kong Chinese. *Lancet* 1992;339:1314-8.
13. Cheng KK. The etiology of esophageal cancer in Chinese. *Semin Oncol* 1994;21:411-5.
14. Christrup LL. Morphine metabolites. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997;41:116-22.
15. Clapp NK, Craig AW. Carcinogenic effects of diethylnitrosamine in RF mice. *J Natl Cancer Inst* 1967;39:903-16.
16. Cochin J, Axelrod J. Biochemical and pharmacological changes in the rat following chronic administration of morphine, nalorphine and normorphine. *J Pharmacol Exp Ther* 1959;(125):105-10.
17. Crespi M, Munhoz N, Grassi A. Precursor lesions of esophageal cancer in a low-risk population in China: comparison with high-risk populations. *Int J Cancer* 1984;34:599-602.
18. Dawsey SM, Lewin KJ, Liu FS, Wang GQ, Shen Q. Esophageal morphology from Linxian, China. *Cancer* 1994;73:2027-37.
19. De Barros SG. Detecção de lesões precursoras em indivíduos sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1992.
20. De Barros SG, Ghisolfi ES, Luz LP, Barlem GG, Vidal RM, Wolff FH, Magno VA, et al. [High temperatura "mate" infusión drinking in a population at risk for squamous cell carcinoma of the esophagus]. *Arq Gastroenterol* 2000; 37:25-30.
21. De Barros SG, Vidal RM, Luz LP, Ghisolfi ES, Barlem GG, Komlos F, Wolff FH, et al. [Prevalence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction in a 10 year period at a câncer referral center in southern Brazil]. *Arq Gastroenterol* 1999; 36:32-6.
22. De Stefani E, Muñoz N, Estève J, Vasallo A, Victora CG, Teuchmann S. Mate drinking, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Res* 1990;50:426-31.
23. Dillenburg CF. Influência da morfina na carcinogênese esofágica induzida pela dietilnitrosamina em ratos [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2000.
24. Dowlatshahi K, Miller RJ. Role of opium in esophageal cancer: a hypothesis. *Cancer Res* 1985;45:1906-7.
25. Duarte DF. Uma breve história do ópio e dos opióides. *Rev Bras Anesthesiol* 2005; 55:135-146.
26. Ender F, Havre GN, Madsen R, Ceh L, Helgebostad A. Studies on conditions under which N-nitrosodimethylamine is formed in herring meal produced from nitrite-preserved herring. The risk of using nitrite uncritically as a preservative agent. *Z Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd* 1967;22:181-9.
27. Forman D. Are nitrates a significant risk factor in human cancer? *Cancer Surv* 1989;8:443-58.

28. Fagundes RB, de Barros SG, Pütten AC, Mello ES, Wagner M, Bassi LA, Bombassaro MA, et al. Occult dysplasia is disclosed by Lugol chromoendoscopy in alcoholics at high risk for squamous cell carcinoma of the esophagus. *Endoscopy* 1999; 31: 281-5.
29. Fagundes RB, Mello CR, Pütten AC, Moreira LF, de Barros SG. p53 immunoreexpression: an aid to conventional methods in the screening of precursor lesions of squamous esophageal cancer in patients at high-risk? *Cancer Detect Prev* 2005; 29:227-32
30. Freitag CP, de Barros SG, Kruehl CD, Pütten AC, Dietz J, Gruber AC, Diehl AS, et al. Esophageal dysplasias are detected by endoscopy with Lugol in patients at risk for squamous cell carcinoma in southern Brazil. *Dis esophagus* 1999; 12:191-5.
31. Ghadirian P, Stein GF, Gorodetzky C, Roberfroid MB, Mahon GA, Bartsch H, et al. Oesophageal cancer studies in the Caspian littoral of Iran: some residual results, including opium use as a risk factor. *Int J Cancer* 1985;35:593-7.
32. Ghadirian P, Vobecky J, Vobecky JS. Factors associated with cancer of the oesophagus: an overview. *Cancer Detect Prev* 1988;11:225-34.
33. Gibel W. Experimentelle untersuchungen zur zynkarzinogenese beim ösophaguskarzinom. *Arch Geschwulstforsch* 1967;30:181-9.
34. Goldim J; Raymundo M. Pesquisa em saúde e direito dos animais. 2. ed. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre; 1997.
35. Guengerich FP. Human cytochrome P450 enzymes. In: Montellano PRO, editor. *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*. 2nd ed. New York: Plenum Press; 1995. p. 473-509.
36. Gurski RR, Schirmer CC, Toneto JE Jr, Rosa AR, Toniazzo GP, Fasolo GR, et al. Delayed cervical anastomosis of the esophagus for esophageal carcinoma. *Int Surg* 1997;82:56-9.
37. Gurski RR, Schirmer CC, Kruehl CR, Komlos F, Kruehl CD, Edelweiss MI. Induction of esophageal carcinogenesis by diethylnitrosamine and assessment of the promoting effect of ethanol and N-nitrosornicotine: experimental model in mice. *Dis Esophagus* 1999;12:99-105.
38. Hartmann AA. Proliferação celular e carcinogênese: estudo em fígado de ratos após dupla hepatectomia parcial e sincronização celular com hidroxauréia [dissertação]. Munique – Alemanha: "Universität Ludwig-Maximilian"; 1981.
39. Hewer T, Rose E, Ghadirian P, Castegnaro M, Malaveille C, Bartsch H, et al. Ingested mutagens from opium and tobacco pyrolysis products and cancer of the oesophagus. *Lancet* 1978;2:494-6.
40. Hytioglou P, Theise ND. Differential diagnosis of hepatocellular nodular lesions. *Seminars in Diagnostic Pathology* 1998; 285-299.
41. IARC (Internacional Agency for Research on Cancer Working Group). (1991) Evaluation of carcinogenic risks to humans. *IARC Monogr.*, 51, 1757-1763.
42. Iizuka T, Ichimura S, Kawachi T, Hirota T, Itabashi M. Carcinoma of the esophagus of rabbits induced with N-methyl-benzylamine and sodium nitrite. *Gann* 1977;68:829-35.

43. INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2005.
44. Kalant H. Opium revisited: a brief review of its nature, composition, non-medical use and relative risks. *Addiction* 1997;92:267-77.
45. Kruel CDP. Classificação citopatológica das lesões precursoras do carcinoma escamoso do esôfago: modelo experimental em camundongos [tese] São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1992.
46. Kruel CDP, Gurski RR, Golbert L, Luz L, Ferreira M, Lemos N. Effect of thermal injury and the oral administration of diethylnitrosamine in the development of esophageal tumors in mice. In: Perachia A, Rosati R, Bonavina L, Fumagalli U, Bona S, Chella B, editors. *Recent advances in diseases of the esophagus*. Bologna: Monduzzi; 1996. p. 37-40.
47. Lawers GY, Terris B, Balis UJ, Batts KP, Regimbeau JM, Chang Y et al. Prognostic histologic indicator of curatively resected hepatocellular carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2002; 26:25-34.
48. Leaf CD, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Mechanisms of endogenous nitrosation. *Cancer Surv* 1989; 8:323-34.
49. Lijinsky W. *Chemistry and biology of N-nitroso compounds*. Cambridge: Cambridge University Press; 1992. (Cambridge Monographs on Cancer Research)
50. Lin K, Shen ZY, Lu SH, Wu YN. Intake of volatile N-nitrosamines and their ability to exogenously synthesize in the diet of inhabitants from high-risk área of esophageal câncer in southern China. *Biomed Environ Sci* 2002; 15:277-82.
51. Lin K, Shen W, Shen Z, Wu Y, Lu S. Dietary exposure and urinary excretion of total N-nitroso compounds, nitrosamino acids and volatile nitrosamine in inhabitants of high- and low-risk áreas for esophageal câncer in southern China. *Int J Cancer* 2002; 102:207-11.
52. Lu SH, Chui SX, Yang WX, Hu XN, Guo LP, Li FM. Relevance of N-nitrosamines to oesophageal cancer in China. *IARC Sci Publ* 1991;105:11-7.
53. Magee PN. The experimental basis for the role of nitroso compounds in human cancer. *Cancer Surv* 1989;8:207-39.
54. Malaveille C, Friesen M, Camus AM, Garren L, Hautefeuille A, Béréziat JC, et al. Mutagens produced by the pyrolysis of opium and its alkaloids as possible risk factors in cancer of the bladder and oesophagus. *Carcinogenesis* 1982;3:577-85.
55. Mandard AM, Marnay J, Herlin P, Elie H, Tuyns AJ, Le Talaer JY. Cancer of the esophagus induced in the Wistar rat by ethyl-N-butyl-nitrosamine. *Bull Cancer* 1984;71:419-24.
56. Melo LL, Kruel CD, Kliemann LM, Cavazzola LT, Boeno R da L, Silber PC, et al. Influence of surgically induced gastric and gastroduodenal content reflux on esophageal carcinogenesis--experimental model in Wistar female rats. *Dis Esophagus* 1999;12:106-15.
57. Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer* 1996;69:225-35.

58. Osborne R, Joel S, Trew D, Slevin M. Drugs acting on the central nervous system. In: Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill Companies editors 1997.
59. Paricio PP, Garcia Marcilla JA, Martinez de Haro L, Ortiz Escandell MA, Castellanos Escrig G. Results of surgical treatment of epidermoid carcinoma of the thoracic esophagus. *Surg Gynecol Obstet* 1993;177:398-404.
60. Pérez YS, Legleu CC, Cuellar CG, Carreón JP, García SH, Neyoy CG, et al. Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters* 2005; 217:25-32.
61. Preston-Martin S, Correa P. Epidemiological evidence for the role of nitroso compounds in human cancer. *Cancer Surv* 1989;8:459-73.
62. Prolla JC, Dietz J, da Costa LA. Diferenças geográficas na mortalidade por neoplasia do esôfago no Rio Grande do Sul. *Rev Assoc Med Bras* 1993;39:217-20.
63. Qiu SL, Yang GR. Precursor lesions of esophageal cancer in high-risk populations in Henan Province, China. *Cancer* 1988;62:551-7.
64. Rabes H, Hartenstein R, Scholze P. Specific stages of cellular response to homeostatic control during diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis. *Experientia* 1970; 26:1356-1359.
65. Rane A, Liu Z, Henderson CJ, Wolf CR. Divergent regulation of cytochrome P450 enzymes by morphine and pethidine: a neuroendocrine mechanism? *Mol Pharmacol* 1995;47:57-64.
66. Reisine T, Pasternak G. Goodman & Gilman's, editors. The pharmacological basis of therapeutics. 9th ed. McGraw-Hill; 1996. Drugs acting on the central nervous system.
67. Reuber MD. Carcinomas of the esophagus in rats ingesting diethylnitrosamine. *Eur J Cancer* 1975;11:97-9.
68. Reuber MD. Histopathology of preneoplastic and neoplastic lesions of the esophagus in BUF rats ingesting diethylnitrosamine. *J Natl Cancer Inst* 1977;58:313-21.
69. Ribeiro Pinto LF, Swann PF. Opium and oesophageal cancer: effect of morphine and opium on the metabolism of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in the rat. *Carcinogenesis* 1997;18:365-9.
70. Riddell RH, Iwafuchi M. Problems arising from eastern and western classification systems for gastrointestinal dysplasia and carcinoma: are they resolvable? *Histopathology* 1998;33:197-202.
71. Rosa AR, Gurski RR, Schirmer CC, Brentano L, Krueel CD. Survival and prognostic factors in patients with resected epidermoid oesophageal carcinoma. *Int Surg* 1999;84:193-8.
72. Roth MJ, Liu SF, Dawsey SM, Zhou B, Copeland C, Wang GQ, et al. Cytologic detection of esophageal squamous cell carcinoma and precursor lesions using balloon and sponge samplers in asymptomatic adults in Linxian, China. *Cancer* 1997;80:2047-59.

73. Rubio C, Munck-Wikland E, Fagerberg J, Strander H, Kuylenstierna R, Krueel C. Further studies on the carcinogenic-free interval following exposure in experimental esophageal tumorigenesis. *In Vivo* 1993;7:81-4.
74. Rubio CA. Epithelial lesions antedating oesophageal carcinoma. I. Histologic study in mice. *Pathol Res Pract* 1983;176:269-75.
75. Rubio CA, Liu FS, Chejfec G, Sveander M. The induction of esophageal tumors in mice: dose and time dependency. *In Vivo* 1987;1:35-8.
76. Russo A, Franceschi S. The epidemiology of esophageal cancer. *Ann Ist Super Sanita* 1996;32:65-72.
77. Saeki H, Kimura Y, Ito S, Miyazaki M, Ohga T. Biologic and clinical significance of squamous epithelial dysplasia of the esophagus. *Surgery* 2002;131:22-27.
78. Sasajima K, Kawachi T, Sano T, Sugimura T, Shimosato Y. Esophageal and gastric cancers with metastases induced in dogs by N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J Natl Cancer Inst* 1977;58:1789-94.
79. Schirmer CC. Avaliação do efeito da cafeína na carcinogênese esofágica induzida pela dietilnitrosamina. Estudo experimental em camundongos [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1999.
80. Schirmer CC, Gurski R, Castro MA, Madruga GS, Pedrosa FL, Krueel CD, et al. Neoplasias associadas com carcinoma epidermóide de esôfago. *Rev Assoc Med Bras* 1997;43:335-9.
81. Schlemper RJ, Kato Y, Stolte M. Review of histological classifications of gastrointestinal epithelial neoplasia: differences in diagnosis of early carcinomas between Japanese and Western pathologists. *J Gastroenterol* 2001;36:445-56.
82. Schmähl D, Preussmann R, Hamperl H. Leberkrebs-erzeugende wirkung von diäthylnitrosamin nach oraler gabe bei ratten. *Naturwissenschaften* 1960;47:89.
83. Siddiqi MA, Tricker AR, Kumar R, Fazili Z, Preussmann R. Dietary sources of N-nitrosamines in a high-risk area for oesophageal cancer - Kashmir, India. *IARC Sci Publ* 1991;105:210-3.
84. Skinner DB, Dowlatshahi KD, DeMeester TR. Potentially curable cancer of the esophagus. *Cancer* 1982;50 Suppl:2571-5.
85. Skinner DB. Surgical treatment for esophageal carcinoma. *Semin Oncol* 1984;11:136-43.
86. Sladek NE, Chaplin MD, Mannering GJ. Sex-dependent differences in drug metabolism in the rat. *Drug Metab and Disp* 1974; 2:293-300.
87. Swann PF. Effect of ethanol on nitrosamine metabolism and distribution. Implications for the role of nitrosamines in human cancer and for the influence of alcohol consumption on cancer incidence. *IARC Sci Publ* 1984;57:501-12.
88. Swann PF. The possible role of nitrosamines in the link between alcohol consumption and esophageal cancer in man. *Toxicol Pathol* 1984;12:357-60.

89. Swann PF, Coe AM, Mace R. Ethanol and dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine metabolism and disposition in the rat. Possible relevance to the influence of ethanol on human cancer incidence. *Carcinogenesis* 1984;5:1337-43.
90. Tuyns AJ, Castegnaro M, Toussaint G, Walker EA, Gričute LL, Le Talaer JY, et al. Research on the etiological factors of oesophageal cancer in the West of France. *Bull Cancer* 1980;67:15-28.
91. Umbenhauer D, Wild CP, Montesano R, Saffhill R, Boyle JM, Huh N, et al. O(6)-methyldeoxyguanosine in oesophageal DNA among individuals at high risk of oesophageal cancer. *Int J Cancer* 1985;36:661-5.
92. Urschel JD. Esophagogastronomy anastomotic leaks complicating esophagectomy: a review. *Am J Surg* 1995;169:634-40.
93. Velho AV. A influência do chá preto sobre a indução tumoral esofágica pela dietilnitrosamina: modelo experimental em camundongos [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003.
94. Victora CG, Muñoz N, Day NE, Barcelos LB, Peccin DA, Braga NM. Hot beverages and oesophageal cancer in southern Brazil: a case-control study. *Int J Cancer* 1987;39:710-6.
95. Watanabe H, Jass JR, Sobin LH. Histological typing of oesophageal and gastric tumours. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag;1990. p.11-8.
96. Wu Y, Chen J, Ohshima H, Pignatelli B, Boreham J, Li J, et al. Geographic association between urinary excretion of N-nitroso compounds and oesophageal cancer mortality in China. *Int J Cancer* 1993;54:713-9.
97. Wu YK, Huang GJ, Shao LF, Zhang YD, Lin XS. Honored guest's address: progress in the study and surgical treatment of cancer of the esophagus in China, 1940--1980. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982;84:325-33.
98. Yang CS. Research on esophageal cancer in China: a review. *Cancer Res* 1980;40:2633-44.
99. Yang FC, Zheng SS, Jiang TA. A modified rat model for hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3:585-7.
100. Yoo JS, Ishizaki H, Yang CS. Roles of cytochrome P450IIE1 in the dealkylation and denitrosation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in rat liver microsomes. *Carcinogenesis* 1990;11:2239-43.
101. Zhu JQ, Xiao Y, Liu ZQ, Chen JS, Guo ZL. The effects of Chinese tea on the methylation of DNA by the esophageal carcinogen N-nitrosomethylbenzylamine. *Biomed Environ Sci* 1991;4:225-31.

**9 ARTIGO - MORFINA NÃO PROMOVE CARCINOGENESE  
ESOFÁGICA EM RATOS EXPOSTOS A  
DIETILNITROSAMINA**

**MORFINA NÃO PROMOVE CARCINOGENESE ESOFÁGICA EM RATOS EXPOSTOS A  
DIETILNITROSAMINA**

**AUTORES:**

**Carlos Frota Dillenburg (1)**

**Cleber Dario Pinto Kruel (2)**

**Carlos Thadeu Cerski (3)**

**Maria Isabel Edelweiss (4)**

**Claudia Helena Werlang Dillenburg (5)**

**Tiago Luís Dedavid e Silva (6)**

**André Silvio Schier (6)**

**Giancarlo Marafon (6)**

**Endereço para correspondência:**

**Carlos Frota Dillenburg**

Av. Dr. Maurício Cardoso, 833/504

93.510-250

Novo Hamburgo – RS – Brasil

[carlos.dillenburg@terra.com.br](mailto:carlos.dillenburg@terra.com.br)

Tel.: 51 / 9986-0979

3594-6922

Fax: 51 / 3582-6922

- (1) Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
- (2) Professor Adjunto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil; Doutor em Cirurgia pela Escola Paulista de Medicina, Brasil.
- (3) Professor titular e chefe do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
- (4) Professora titular de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
- (5) Médica patologista do Laboratório Histolab, Novo Hamburgo, Brasil.
- (6) Acadêmicos da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.



## RESUMO

A alta incidência de câncer esofágico no norte do Irã foi associada ao consumo de ópio e exposição às nitrosaminas. A dietilnitrosamina (DEN) possui potencial estabelecido de produzir câncer experimental em esôfago e fígado. Avaliou-se por histopatologia o efeito da administração oral de morfina e DEN na carcinogênese esofágica e hepática em 176 ratos, durante 23 semanas, divididos em grupos: **Morf**: morfina; **Den**: DEN; **Den+morf**: DEN e morfina numa mesma solução; **Den/morf**: DEN e morfina em diferentes soluções e dias. **Morf** não promoveu neoplasias. Encontraram-se maiores incidências neoplásicas: a) no esôfago, **Den** em relação à **Den/morf** e **Den+morf** (71,1%, 55,8% e 50,0%); b) no fígado, **Den** e **Den/morf** em relação à **Den+morf** (73,8%, 81,4% e 40,9%); c) maior incidência de neoplasia hepática do que esofágica em **Den/morf** (81,4% e 55,8%). Diferentes doses de DEN foram ingeridas entre os grupos **Den**, **Den/morf** e **Den+morf**, respectivamente 2,9, 2,8 e 2,3 mg/kg/dia. Estes resultados mostram que a morfina não promoveu a carcinogênese esofágica e pode ter estimulado o metabolismo hepático de primeira passagem do carcinógeno.

**Unitermos:** carcinoma epidermóide do esôfago, carcinogênese esofágica, nitrosaminas, morfina.

## INTRODUÇÃO

O câncer de esôfago está entre os dez mais freqüentes no mundo e, se for considerado o impacto social nas regiões endêmicas, o problema se torna um verdadeiro flagelo para aquelas populações. Constatada uma íntima correlação entre doença e hábitos regionais, ou seja, com o modo de vida dessas pessoas<sup>1</sup>, observa-se que a origem do câncer esofágico está associada a fatores diferentes em cada região<sup>2,3</sup>.

A alta incidência de câncer esofágico foi associada ao hábito do consumo de ópio

em regiões de alta incidência no norte do Irã<sup>4-6</sup> e à exposição às nitrosaminas na China, principalmente através da dieta<sup>7-10</sup>.

As razões para a associação entre ópio e câncer de esôfago não são conhecidas, porém experimentos mostraram que uma dose de sulfato de morfina, o principal alcalóide do ópio, causou alquilação do DNA aumentada no esôfago e diminuída no fígado em ratos que receberam dietilnitrosamina (DEN) após a morfina. A DEN, uma nitrosamina, é considerada uma das substâncias com maior potencial de produzir câncer no esôfago e fígado de ratos e camundongos<sup>11,12</sup>, e a alquilação do DNA constitui-se numa conhecida alteração precursora da carcinogênese provocada pela DEN nestes órgãos. Desta forma, a morfina causaria diminuição da carcinogênese hepática e aumento da esofágica por influenciar no metabolismo hepático da DEN. Uma vez sugerido que observações feitas em ratos poderiam ser imputadas ao homem<sup>11</sup>, estas seriam possíveis evidências metabólicas, num experimento agudo, para a associação entre ópio e câncer de esôfago em ratos e, por extensão, em humanos.

No presente estudo, foi oferecido DEN na água de beber para ratos durante três dias em cada uma das 23 semanas, os quais foram comparados a grupos que ingeriram morfina simultaneamente ou não com DEN. Avaliou-se o efeito da administração crônica de morfina e DEN na carcinogênese esofágica e hepática.

## MÉTODOS

### Substâncias e animais

A DEN foi adquirida de SIGMA (St. Louis, MO, USA): N-0756, densidade – 0,95 g/ml. O Sulfato de morfina foi adquirido de CRISTÁLIA (Itapira, SP, Brasil): DCB 0856.03-7, densidade - 10 mg/ml. As ratas Wistar (176) com iniciais 185-215g foram obtidas do Biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul – FEPPS.

Água, alimento (Nuvilab CR1, baseado em critérios do National Research Council e National Institute of Health – USA) e substâncias diluídas foram trocados 3 vezes por semana, quando foram medidas as quantidades ingeridas de cada solução. Todos os animais receberam cuidados humanos e os protocolos foram aprovados pela Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do GPPG-HCPA (Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

### **Protocolo Experimental**

Em Experimento Comparativo de Múltiplos Grupos 176 ratas foram divididas em grupos com 44 animais e ingeriram: **Morf.** morfina; **Den:** DEN; **Den+morf.** DEN + morfina numa mesma solução; **Den/morf.** DEN e morfina em diferentes soluções e dias. A solução de morfina foi ingerida durante quatro dias por semana no grupo **Den/morf** e três nos demais grupos, enquanto que a DEN foi ingerida durante três dias por semana nos respectivos grupos. A dose estimada de 5mg/kg/dia foi utilizada para morfina e DEN. Os animais foram pesados no início, aos três meses e antes da eutanásia que ocorreu aos 161 dias (23 semanas). Esôfagos e fígados foram ressecados e imediatamente colocados em formalina tamponada a 10% até a análise.

### **Análise histopatológica**

O esôfago foi examinado em toda sua extensão por ser enrolado sobre si mesmo (tipo “rocambole”) e foram retiradas 3 amostras representativas do fígado. Os cortes foram examinados em hematoxilina-eosina (HE), em microscópio óptico comum, por patologistas que desconheciam o grupo de origem do espécimen. Considerou-se a lesão de maior gravidade em cada peça.

Os esôfagos foram classificados como<sup>13</sup>: 1) histologia normal; 2) hiperplasia; 3) esofagite; 4) papiloma; 5) displasia de baixo grau; 6) displasia de alto grau (incluindo

carcinoma *in situ*); 7) carcinoma invasor: da mucosa, da muscular da mucosa e da submucosa (Figura 1A e 1B). Foram consideradas neoplasias malignas a displasia de alto grau e o carcinoma invasor, sendo denominadas de lesões neoplásicas esofágicas ou CA esofágico.

Os fígados foram classificados como<sup>14</sup>: 1) histologia normal, 2) focos de células claras, 3) nódulos neoplásicos, 4) carcinoma hepatocelular (Figura 1C e 1D). Foram considerados neoplasias malignas os focos de células claras, os nódulos neoplásicos e o carcinoma hepatocelular, sendo denominados de lesões neoplásicas hepáticas ou CA hepático.

A análise de variáveis quantitativas foi feita através da ANOVA com um critério de classificação e localização das diferenças pelo teste de Tukey. Entre as variáveis categóricas, os grupos foram comparados por qui-quadrado com as diferenças localizadas entre os grupos pelo procedimento de post-hoc proposto por Zar. O nível de significância adotado foi de  $\alpha = 0,05$ .

## RESULTADOS

Não foram observadas alterações de conduta dos ratos secundárias à ingestão de morfina. Houve duas mortes não programadas aos 31 e 74 dias de experimento, ambas no grupo **Den**. Não foi realizada análise histopatológica em 13 espécimens esofágicos e em 3 hepáticos: 2 devido às mortes não programadas e os demais por material deficiente para análise. Portanto, 163 esôfagos e 173 fígados foram submetidos ao exame histológico.

### Análise histopatológica

A morfina ingerida de forma isolada (**Morf**) não induziu carcinogênese significativa em nenhum dos órgãos analisados (Tabela 1).

A incidência de lesões neoplásicas esofágicas foi maior no grupo **Den** (71,1%) em relação a todos os demais grupos ( $p < 0,001$ ). Esta incidência foi similar entre os dois grupos que ingeriram DEN e morfina (**Den+morf** 50,0% e **Den/morf** 55,8%) (Tabela 1).

A incidência de lesões neoplásicas hepáticas foi menor no grupo que ingeriu DEN e morfina simultaneamente numa mesma solução (**Den+morf** 40,9%) do que nos outros que ingeriram o carcinógeno (**Den/morf** 81,4% e **Den** 73,8%) ( $p < 0,001$ ) (Tabela 1).

O possível efeito da morfina sobre o metabolismo de primeira passagem hepático da DEN pode ser observado na Tabela 1. Os grupos **Den** e **Den+morf** apresentaram incidência semelhante de lesões esofágicas e hepáticas, enquanto que o **Den/morf** apresentou um percentual maior de lesões hepáticas do que esofágicas ( $p = 0,013$ ).

A histologia esofágica foi normal na imensa maioria dos animais do grupo **Morf** (95,0%), em contraste com os grupos que ingeriram DEN que foram normais em somente 2,6% no **Den**, 16,7% no **Den+morf** e 14,0% no **Den/morf**. O grupo **Den** causou uma maior incidência de alterações, com tendência a lesões de maior desestruturação epitelial do que os grupos tratados também com morfina (**Den+morf** e **Den/morf**) (Tabela 2).

Quase a totalidade dos animais do grupo **Morf** apresentou histologia hepática normal (97,7%), o que não ocorreu com os grupos que ingeriram DEN. Nestes, a histologia foi normal em 26,2% no **Den**, 59,1% no **Den+morf** e 18,2% no **Den/morf**. Embora o grupo **Den/morf** tenha apresentado maior incidência de alterações, os 3 casos de carcinoma hepatocelular ocorreram no grupo **Den** (Tabela 3).

### Dosagem das substâncias

A dose ingerida baseou-se na quantidade de solução semanal ingerida, no peso dos animais e na concentração das substâncias no líquido oferecido aos animais. A dose média ingerida foi inferior à estimada de 5 mg/kg/dia em todos os grupos.

Entre os grupos expostos ao carcinógeno, todos ingeriram doses diferentes de DEN entre si (**Den**: 2,9 mg/kg/dia, **Den+morf**: 2,3 mg/kg/dia, **Den/morf**: 2,8 mg/kg/dia) ( $p < 0,001$ ). Entre os grupos que ingeriram morfina (**Morf**: 2,5 mg/kg/dia; **Den+morf**: 2,3 mg/kg/dia; e **Den/morf**: 2,4 mg/kg/dia), o **Den+morf** ingeriu menos morfina do que os outros grupos ( $p < 0,001$ ) (Tabela 1).

### DISCUSSÃO

Os compostos nitrosos apresentam-se na dieta ou no ambiente em doses bem inferiores àquelas necessárias para desenvolver câncer, por isso a grande preocupação é com a sua exposição crônica. Os nitratos carcinogênicos estão presentes na dieta (principalmente em conservantes, corantes e aromatizantes alimentares), no tabaco, em bebidas alcoólicas (cerveja, *whisky* e licores), na exposição ocupacional (indústria da borracha, pesticidas, cosméticos e curtimento do couro), e na higiene pessoal e doméstica (cosméticos, xampus e detergentes)<sup>12,15-17</sup>. Foi estabelecido seu potencial hepatotóxico e carcinogênico, tanto em seres humanos como em animais<sup>18-20</sup> e descrito que as nitrosaminas produziam a alquilação do DNA em tecidos humanos *in vitro*<sup>12</sup>. A partir desses estudos, foi sugerido que as nitrosaminas poderiam estar relacionadas ao câncer de esôfago no homem<sup>9,10,19,21-23</sup>.

A descoberta de que as nitrosaminas apresentam um organotropismo bem definido permitiu o desenvolvimento de modelos de estudo de câncer em diversos órgãos. Vários autores utilizaram-se do modelo de carcinogênese esofágica e hepática induzida pela DEN

em camundongos e ratos, mostrando graus variados de incidência neoplásica conforme a dose e o tempo de duração de seus estudos<sup>13,18,24-29</sup>. O conhecimento de que os compostos N-nitrosos exibem atividade biológica similar em tecidos animais e humanos, sugere que as observações feitas em ratos poderiam ser extrapoladas ao homem<sup>11,21</sup>.

A incidência do câncer de esôfago é influenciada por diferentes fatores nas diversas áreas endêmicas do mundo. Na Europa e Estados Unidos da América é relacionado com a exposição ao álcool e tabaco, associados ou não<sup>30,31</sup>, no sul do Brasil com o consumo de "mate" quente<sup>32</sup>, e no norte do Irã foi associado por epidemiologistas com o fumo do ópio e a ingestão de resíduos do cachimbo de ópio (*sukhteh*)<sup>4</sup>. Experimentos mostraram que o etanol altera a farmacocinética das nitrosaminas<sup>33-36</sup>. Desta forma, elas são mais expostas ao tecido esofágico, sendo capazes de induzir câncer de esôfago em animais<sup>33-37</sup>. Estes estudos aumentaram ainda mais as suspeitas de que a exposição às nitrosaminas seria um importante fator neste tipo de câncer no homem. Ribeiro Pinto<sup>11</sup> mostrou que a morfina, o principal alcalóide do ópio, também modifica a farmacocinética e distribuição da DEN de forma similar ao etanol. Isto reforça a hipótese de que estas duas substâncias possuem uma base comum na influência sobre a carcinogênese esofágica: seus efeitos na farmacocinética das nitrosaminas às quais o homem está exposto.

A dose de 5 mg/kg/dia de DEN utilizada neste estudo durante três dias por semana, foi baseada nos estudos de Rubio<sup>25</sup> e Ribeiro Pinto<sup>11</sup>. O primeiro autor administrou DEN na concentração de 0,04 ml/litro de água de beber (7 mg/kg/dia), durante três dias por semana, e promoveu tumores esofágicos após períodos de 4 e 6 meses em camundongos (1 e 3 tumores/cm de mucosa esofágica, respectivamente), com baixa mortalidade. Ribeiro Pinto<sup>11</sup> demonstrou a alquilação dos DNAs hepático e esofágico com 3 mg/kg/dose de DEN. Outros autores confirmam o poder carcinogênico destas doses: Gibel<sup>24</sup> provocou câncer esofágico em 30% e 56% dos ratos com as respectivas doses de 2,5 e 10 mg/kg/dia e Schmähl<sup>18</sup>

provocou carcinomas hepatocelulares em 92% dos ratos de seu experimento, no período de  $138 \pm 10$  dias, utilizando doses entre 5 e 7,5 mg/kg/dia de DEN, ingeridas diariamente.

Em relação à morfina, foi demonstrado que uma dose única de 5 mg/kg aumentou a alquilação do DNA esofágico de ratos em 90% e diminuiu a do hepático em 10%, quando administrada 45 minutos previamente a uma única dose de DEN. Tais resultados não se alteraram significativamente com o aumento das doses de sulfato de morfina para 10 e 20 mg/kg <sup>11</sup>. No presente estudo, optou-se pela utilização de 5 mg/kg/dia de sulfato de morfina que não causaria alterações da atividade dos animais e provocaria as alterações farmacocinéticas referidas previamente <sup>11</sup>.

A dose ingerida pelos animais no experimento foi substancialmente inferior à dose estimada. Embora as carcinogêneses esofágica e hepática sejam reconhecidamente dose-dependentes de DEN, Rubio *et al.* <sup>25,38</sup> descreveram que o tempo transcorrido seria também de grande importância na formação de tumores em esôfagos de camundongos. Segundo estes autores, clones de células esofagianas seriam “programadas” à carcinogênese em estágios precoces do tratamento com a DEN, e que grande número de tumores ocorreriam em intervalos maiores mesmo após poucas doses de DEN. Enquanto animais tratados por três meses apresentaram Índice Tumoral (IT) = 0,9, animais tratados por três meses e mantidos vivos por quatro meses adicionais, com uma dieta livre de carcinógeno, apresentaram IT cinco vezes maior (IT = 4,6) <sup>38</sup>. No presente estudo, desenvolveu-se no grupo **Den** uma percentagem de animais acometidos por lesões neoplásicas esofágicas superior à estimada no início do estudo (obtida = 71%; estimada = 30%), a despeito das doses ingeridas terem sido 59% das esperadas neste grupo. A partir disto, pode-se inferir que tanto o tempo transcorrido de 23 semanas quanto as doses realmente ingeridas de DEN foram adequados para provocar os efeitos carcinogênicos esperados nos dois órgãos avaliados com mortalidade praticamente nula.



A dose ingerida de morfina variou entre 2,3 e 2,5 mg/kg/dia, apenas 48% da estimada de 5 mg/kg/dia. Estas doses equivalem a 170 mg/dia no homem, semelhantes às utilizadas em analgesia na medicina ocidental, tornando-as comparáveis a desta população de usuários crônicos de morfina. Por outro lado, a dose é possivelmente inferior às relatadas na população de adictos do norte do Irã, que recebiam 3 gramas diárias de ópio<sup>4</sup>. Por esta razão, provavelmente não traduzem validade para esta população, na qual foi primeiramente descrita a relação entre ópio e câncer de esôfago<sup>39</sup>.

Não há referência na literatura de estudos experimentais que tenham avaliado os efeitos carcinogênicos diretos ou indiretos da administração crônica da morfina sobre a mucosa esofágica.

Com o intuito ético de diminuir a eutanásia desnecessária de animais, foi constituído um grupo controle de ingestão de água com oito ratos. Este grupo apresentou análises macro e microscópica normais no presente estudo, a exemplo de centenas de animais que utilizaram a mesma fonte de água em outros trabalhos da Instituição<sup>29</sup>. Este grupo foi excluído da análise, pois o número de oito animais provocou forte assimetria dos dados, prejudicando a adequada análise estatística.

Entre os animais expostos somente à DEN, 71% apresentaram lesões neoplásicas esofágicas e 73% hepáticas, incidências semelhantes às de outros autores<sup>18,24,27,40</sup>. Entre os grupos expostos somente à morfina, não foram encontradas neoplasias esofágicas, porém uma lesão (2,3%) pré-neoplásica hepática se desenvolveu em um animal do grupo **Morf**, um foco de células claras. Bannasch<sup>14</sup> afirma que estas lesões podem ocorrer nos animais controles, com incidência tão baixa quanto a ocorrência natural de carcinoma hepatocelular.

Houve incidência maior de lesões neoplásicas esofágicas nos animais que ingeriram somente o carcinógeno (71,1%) ( $p < 0,001$ ) em relação aos dois grupos que ingeriram DEN e morfina (**Den+morf** e **Den/morf**). Estes dois grupos apresentaram incidência neoplásica

semelhante entre si (50% e 55,8%) (Tabela 1). Apesar das doses de DEN terem sido diferentes entre os grupos *Den*, *Den/morf* e *Den+morf* (2,9, 2,8 e 2,3 mg/kg/dia) ( $p < 0,001$ ), observou-se uma relativa correspondência entre elas e a incidência de neoplasias esofágicas: o grupo que ingeriu mais carcinógeno apresentou maior incidência de neoplasia. Estes achados sugerem que a morfina não exerceria um efeito carcinogênico indutor sobre a mucosa esofágica.

A incidência de lesões neoplásicas hepáticas não encontrou correspondência com a dose ingerida do carcinógeno. Os grupos *Den* e *Den/morf* apresentaram incidências similares entre si, e maiores do que *Den+morf* (73,8%, 81,4% e 40,9%) ( $p < 0,001$ ), apesar das doses de DEN terem sido diferentes entre todos os grupos (2,9, 2,8 e 2,3 mg/kg/dia) ( $p < 0,001$ ) (Tabela 1). Observa-se que *Den* ingeriu uma dose significativamente maior do carcinógeno do que *Den/morf*, mas foi acometido por 73,8% de neoplasias em comparação com 81,4% do outro grupo. Apesar das incidências não serem significativamente diferentes, estes resultados poderiam expressar algum efeito da morfina sobre a carcinogênese hepática. Permanece a questão: se as doses de carcinógeno fossem similares, haveria uma significativa maior incidência de neoplasias no grupo *Den/morf* em relação a *Den*? Os dados não permitem concluir se a morfina exerceria efeito sobre a carcinogênese hepática.

O mecanismo das mudanças produzidas pela morfina não é claro, mas é provável a participação do sistema enzimático citocromo P450<sup>11</sup>. Embora tratamentos crônicos ou subagudos de ratos machos adultos com morfina tenham diminuído os níveis de alguns P450s, doses elevadas de morfina entre 5 e 20 mg/kg/dia administradas a ratos, por quatro dias ou mais, induziram outros P450s como os subgrupos 1A2, 2B1 e 2E1<sup>42</sup>. O P450 2E1 realiza uma parcela substancial do metabolismo hepático da DEN no rato<sup>43</sup>. A morfina, além de ser metabolizada pelo P450 hepático<sup>11,42</sup>, atua como agente indutor deste P450 e poderia influenciar no metabolismo de primeira passagem hepática da DEN, tanto estimulando quanto atenuando a ativação do carcinógeno. A morfina, administrada de forma

isolada, interrompida (três dias por semana) e crônica induziria semanalmente o subgrupo 2E1 da enzima P450 hepática, mantendo-o ativado e livre para o momento em que o carcinógeno fosse ingerido. Assim, a DEN seria largamente metabolizada no fígado, tornando-se localmente ativa e capaz de provocar alta incidência de carcinoma neste órgão. Por ter sido amplamente metabolizada no fígado, haveria menor biodisponibilidade hemática para outros órgãos que também possuíssem P450 como o esôfago, com conseqüente menor ativação local e capacidade de formação de carcinomas neste órgão. Doses reconhecidamente carcinogênicas de DEN como as oferecidas ao grupo *Den/morf*, poderiam ter se utilizado deste mecanismo metabólico da pré-ativação pela morfina para provocar um significativo maior percentual de neoplasias hepáticas do que esofágicas, respectivamente 81,4 e 55,8% (Tabela 1). Através deste mesmo mecanismo poderia ter se formado uma lesão hepática pré-maligna no grupo *Morf*, no qual carcinógenos naturais seriam metabolizados mais facilmente ao encontrarem um subgrupo enzimático previamente ativado.

Ao ser ofertado DEN e morfina simultaneamente, poderia haver a indução e utilização do P450 2E1 hepático pela morfina, mantendo este P450 "ocupado" no momento em que o carcinógeno realiza seu metabolismo de primeira passagem, caracterizando um fenômeno competitivo entre as duas substâncias. Dependendo do grau de competição em nível hepático, a biodisponibilidade hemática de DEN estaria inalterada ou mesmo aumentada com conseqüente metabolização e carcinogênese também inalteradas ou aumentadas no esôfago. Este poderia ter sido o fenômeno metabólico ocorrido no grupo *Den+morf*, no qual observou-se resultados estatisticamente similares de 40,9% de neoplasias hepáticas e 50% de esofágicas (Tabela 1). Estes achados sugerem que a morfina poderia estimular o metabolismo hepático da DEN em exposição crônica quando as substâncias fossem ingeridas de forma intercalada. Esta hipótese baseia-se em achados indiretos de incidência neoplásica em achados histológicos, e necessita de novos estudos com aferições metabólicas diretas para conclusões mais definitivas.

Neste modelo experimental, concluímos que a morfina não apresentou efeito indutor sobre a carcinogênese esofágica induzida pela ingestão de dietilnitrosamina. Observa-se que a morfina pode ter estimulado o metabolismo hepático de primeira passagem do carcinógeno.

## AGRADECIMENTOS

- À Fundação Estadual de Proteção e Pesquisa em Saúde – FEEPS - pela disponibilização do biotério e dos animais utilizados nesta pesquisa.
- Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, através do seu Fundo de Incentivo à Pesquisa, e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela disponibilização de recursos financeiros para a realização desta pesquisa.

Formatados: Marcadores e numeração

## REFERÊNCIAS

1. Zhu JQ, Xiao Y, Liu ZQ, Chen JS, Guo ZL. The effects of Chinese tea on the methylation of DNA by the esophageal carcinogen N-nitrosomethylbenzylamine. *Biomed Environ Sci* 1991;4:225-31.
2. Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer* 1996;69:225-35.
3. Ghadirian P, Vobecky J, Vobecky JS. Factors associated with cancer of the oesophagus: an overview. *Cancer Detect Prev* 1988;11:225-34.
4. Hewer T, Rose E, Ghadirian P, Castegnaro M, Malaveille C, Bartsch H, et al. Ingested mutagens from opium and tobacco pyrolysis products and cancer of the oesophagus. *Lancet* 1978;2:494-6.
5. Malaveille C, Friesen M, Camus AM, Garren L, Hautefeuille A, Béréziat JC, et al. Mutagens produced by the pyrolysis of opium and its alkaloids as possible risk factors in cancer of the bladder and oesophagus. *Carcinogenesis* 1982;3:577-85.
6. Ghadirian P, Stein GF, Gorodetzky C, Roberfroid MB, Mahon GA, Bartsch H, et al. Oesophageal cancer studies in the Caspian littoral of Iran: some residual results, including opium use as a risk factor. *Int J Cancer* 1985;35:593-7.
7. Wu Y, Chen J, Ohshima H, Pignatelli B, Boreham J, Li J, et al. Geographic association between urinary excretion of N-nitroso compounds and oesophageal cancer mortality in China. *Int J Cancer* 1993;54:713-9.
8. Cheng KK, Day NE, Duffy SW, Lam TH, Fok M, Wong J. Pickled vegetables in the aetiology of oesophageal cancer in Hong Kong Chinese. *Lancet* 1992;339:1314-8.
9. Lin K, Shen ZY, Lu SH, Wu YN. Intake of volatile N-nitrosamines and their ability to exogenously synthesize in the diet of inhabitants from high-risk area of esophageal cancer in southern China. *Biomed Environ Sci* 2002; 15:277-82.
10. Lin K, Shen W, Shen Z, Wu Y, Lu S. Dietary exposure and urinary excretion of total N-nitroso compounds, nitrosamino acids and volatile nitrosamine in inhabitants of high- and low-risk areas for esophageal cancer in southern China. *Int J Cancer* 2002; 102:207-11.
11. Ribeiro Pinto LF, Swann PF. Opium and oesophageal cancer: effect of morphine and opium on the metabolism of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in the rat. *Carcinogenesis* 1997;18:365-9.
12. Lijinsky W. Chemistry and biology of N-nitroso compounds. Cambridge: Cambridge University Press; 1992. (Cambridge Monographs on Cancer Research)
13. Rubio CA. Epithelial lesions antedating oesophageal carcinoma. I. Histologic study in mice. *Pathol Res Pract* 1983;176:269-75.
14. Bannasch P, Becker FF, Busey W, Farber E, Firminger HI, Garner FM, Gössner W, et al. Report of a workshop on classification of specific hepatocellular lesions in rats. *Cancer Research* 1975; 35:3214-3223.

Formatados: Marcadores e numeração

15. Ender F, Havre GN, Madsen R, Ceh L, Helgebostad A. Studies on conditions under which N-nitrosodimethylamine is formed in herring meal produced from nitrite-preserved herring. The risk of using nitrite uncritically as a preservative agent. *Z Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd* 1967;22:181-9.
16. Cheng KK. The etiology of esophageal cancer in Chinese. *Semin Oncol* 1994;21:411-5.
17. Siddiqi MA, Tricker AR, Kumar R, Fazili Z, Preussmann R. Dietary sources of N-nitrosamines in a high-risk area for oesophageal cancer - Kashmir, India. *IARC Sci Publ* 1991;105:210-3.
18. Schmähel D, Preussmann R, Hamperl H. Leberkrebs-erzeugende wirkung von diäthylnitrosamin nach oraler gabe bei ratten. *Naturwissenschaften* 1960;47:89.
19. Bartsch H, Ohshima H, Pignatelli B, Calmels S. Human exposure to endogenous N-nitroso compounds: quantitative estimates in subjects at high risk for cancer of the oral cavity, oesophagus, stomach and urinary bladder. *Cancer Surv* 1989;8:335-62.
20. Pérez YS, Legleu CC, Cuellar CG, Carreón JP, García SH, Neyoy CG, et al. Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* 2005; 217:25-32.
21. Archer MC. Mechanisms of action of N-nitroso compounds. *Cancer Surv* 1989;8:241-50.
22. Forman D. Are nitrates a significant risk factor in human cancer? *Cancer Surv* 1989;8:443-58.
23. Lu SH, Chui SX, Yang WX, Hu XN, Guo LP, Li FM. Relevance of N-nitrosamines to oesophageal cancer in China. *IARC Sci Publ* 1991;105:11-7.
24. Gibel W. Experimentelle untersuchungen zur zynkarzinogenese beim ösophaguskarzinom. *Arch Geschwulstforsch* 1967;30:181-9.
25. Rubio CA, Liu FS, Chejfec G, Sveander M. The induction of esophageal tumors in mice: dose and time dependency. *In Vivo* 1987;1:35-8.
26. Baker JR, Mason MM, Yerganian G, Weisburger EK, Weisburger JH. Induction of tumors of the stomach and esophagus in inbred Chinese hamsters by oral diethylnitrosamine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974;146:291-3.
27. Reuber MD. Carcinomas of the esophagus in rats ingesting diethylnitrosamine. *Eur J Cancer* 1975;11:97-9.
28. Reuber MD. Histopathology of preneoplastic and neoplastic lesions of the esophagus in BUF rats ingesting diethylnitrosamine. *J Natl Cancer Inst* 1977;58:313-21.
29. Gurski RR, Schirmer CC, Krueel CR, Komlos F, Krueel CD, Edelweiss MI. Induction of esophageal carcinogenesis by diethylnitrosamine and assessment of the promoting effect of ethanol and N-nitrososonornicotine: experimental model in mice. *Dis Esophagus* 1999;12:99-105.
30. Blot WJ. Esophageal cancer trends and risk factors. *Semin Oncol* 1994;21:403-10.

31. Tuyns AJ, Castegnaro M, Toussaint G, Walker EA, Griçute LL, Le Talaer JY, et al. Research on the etiological factors of oesophageal cancer in the West of France. *Bull Cancer* 1980;67:15-28.
32. De Barros SG, Ghisolfi ES, Luz LP, Barlem GG, Vidal RM, Wolff FH, Magno VA, et al. [High temperatura "mate" infusión drinking in a population at risk for squamous cell carcinoma of the esophagus]. *Arq Gastroenterol* 2000; 37:25-30.
33. Anderson LM, Chhabra SK, Nerurkar PV, Souliotis VL, Kyrtopoulos SA. Alcohol-related cancer risk: a toxicokinetic hypothesis. *Alcohol* 1995;12:97-104.
34. Swann PF. Effect of ethanol on nitrosamine metabolism and distribution. Implications for the role of nitrosamines in human cancer and for the influence of alcohol consumption on cancer incidence. *IARC Sci Publ* 1984;57:501-12.
35. Swann PF. The possible role of nitrosamines in the link between alcohol consumption and esophageal cancer in man. *Toxicol Pathol* 1984;12:357-60.
36. Swann PF, Coe AM, Mace R. Ethanol and dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine metabolism and disposition in the rat. Possible relevance to the influence of ethanol on human cancer incidence. *Carcinogenesis* 1984;5:1337-43.
37. Aze Y, Toyoda K, Furukawa F, Mitsumori K, Takahashi M. Enhancing effect of ethanol on esophageal tumor development in rats by initiation of diethylnitrosamine. *Carcinogenesis* 1993;14:37-40.
38. Rubio C, Munck-Wikland E, Fagerberg J, Strander H, Kuylenstierna R, Krueel C. Further studies on the carcinogenic-free interval following exposure in experimental esophageal tumorigenesis. *In Vivo* 1993;7:81-4.
39. Dowlatshahi K, Miller RJ. Role of opium in esophageal cancer: a hypothesis. *Cancer Res* 1985;45:1906-7.
40. Mandard AM, Marnay J, Herlin P, Elie H, Tuyns AJ, Le Talaer JY. Cancer of the esophagus induced in the Wistar rat by ethyl-N-butyl-nitrosamine. *Bull Cancer* 1984;71:419-24.
41. Cochin J, Axelrod J. Biochemical and pharmacological changes in the rat following chronic administration of morphine, nalorphine and normorphine. *J Pharmacol Exp Ther* 1959;(125):105-10.
42. Rane A, Liu Z, Henderson CJ, Wolf CR. Divergent regulation of cytochrome P450 enzymes by morphine and pethidine: a neuroendocrine mechanism? *Mol Pharmacol* 1995;47:57-64.
43. Yoo JS, Ishizaki H, Yang CS. Roles of cytochrome P450IIE1 in the dealkylation and denitrosation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in rat liver microsomes. *Carcinogenesis* 1990;11:2239-43.

Formatados: Marcadores e numeração

Tabela 1 - Incidências neoplásicas e doses das substâncias estratificadas por grupos de tratamento

	<i>Morf</i>	<i>Den</i>	<i>Den+morf</i>	<i>Den/morf</i>	<i>P</i>
<b>CA esofágico</b>	n = 40 0 (0,0) <sup>a</sup>	n = 38 27 (71,1) <sup>c</sup>	n = 42 21 (50,0) <sup>b</sup>	n = 43 24 (55,8) <sup>b</sup>	< 0,001
<b>CA hepático</b>	n = 44 1 (2,3) <sup>a</sup>	n = 42 31 (73,8) <sup>c</sup>	n = 44 18 (40,9) <sup>b</sup>	n = 43 35 (81,4) <sup>c</sup>	< 0,001
<b>Dose DEN</b>	-	2,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>c</sup>	< 0,001
<b>Dose Morfina</b>	2,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	-	2,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	< 0,001

Dados são expressos em número (percentual) de casos positivos ou em média ± desvio padrão de mg/kg/dia. Letras-índice distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Grupo **Morf**: ingeriu morfina; **Den**: dietilnitrosamina (DEN); **Den+morf**: DEN e morfina numa mesma solução; **Den/morf**: DEN e morfina em diferentes soluções e dias. CA esofágico: lesões consideradas pré-malignas (displasias de alto grau) e malignas (carcinomas epidermóides) no exame histopatológico. CA hepático: lesões consideradas pré-malignas (focos de células claras, nódulos displásicos) e malignas (carcinomas hepatocelulares) no exame histopatológico. "a": solução não fornecida para ingestão aos respectivos grupos.



Tabela 2 - Frequência relativa dos achados na microscopia esofágica estratificada por grupos de tratamento

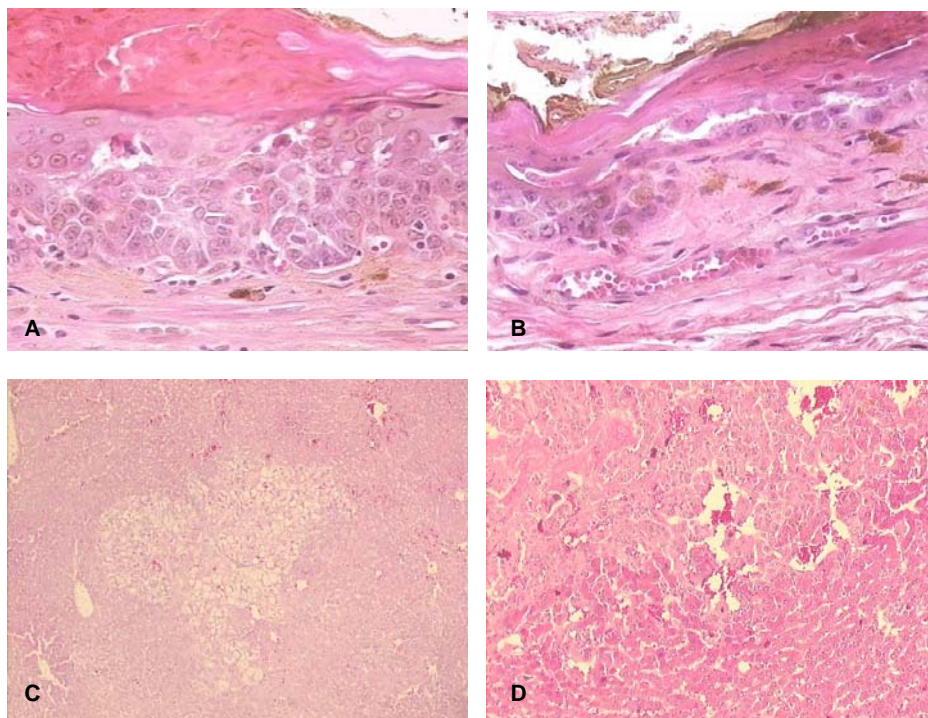
	<i>Morf</i> (n = 40)	<i>Den</i> (n = 38)	<i>Den+morf</i> (n = 42)	<i>Den/morf</i> (n = 43)	P
<b>Normal</b>	38 (95,0)	1 (2,6)	7 (16,7)	6 (14,0)	< 0,001
<b>Hiperplasia</b>	0 (0,0)	2 (5,3)	4 (9,5)	1 (2,3)	0,166
<b>Esofagite</b>	0 (0,0)	2 (5,3)	4 (9,5)	3 (7,0)	0,283
<b>Papiloma</b>	1 (2,5)	0 (0,0)	1 (2,4)	0 (0,0)	0,572
<b>Displasia de Baixo grau</b>	1 (2,5)	6 (15,8)	5 (11,9)	9 (20,9)	0,084
<b>Displasia de Alto grau</b>	0 (0,0)	19 (50,1)	19 (45,2)	18 (41,9)	< 0,001
<b>Carcinoma Invasor</b>	0 (0,0)	8 (21,0)	2 (4,8)	6 (14,0)	< 0,001
<i>Mucosa</i>	0 (0,0)	6 (15,8)	2 (4,8)	4 (9,3)	0,051
<i>Muscular da mucosa</i>	0 (0,0)	1 (2,6)	0 (0,0)	2 (4,7)	0,314
<i>Submucosa</i>	0 (0,0)	1 (2,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,346

Dados são expressos em número (percentual) de casos. Grupo *Morf.* ingeriu morfina; *Den.* dietilnitrosamina (DEN); *Den+morf.* DEN e morfina numa mesma solução; *Den/morf.* DEN e morfina em diferentes soluções e dias.

**Tabela 3 - Frequência relativa dos achados na microscopia hepática estratificada por grupos de tratamento**

	<i>Morf</i> (n = 44)	<i>Den</i> (n = 42)	<i>Den+morf</i> (n = 44)	<i>Den/morf</i> (n = 43)	P
<b>Normal</b>	43 (97,7)	11 (26,2)	26 (59,1)	8 (18,6)	< 0,001
<b>Focos de células claras</b>	1 (2,3)	25 (59,5)	8 (18,2)	28 (65,1)	< 0,001
<b>Nódulos neoplásicos</b>	0 (0,0)	3 (7,1)	10 (22,7)	7 (16,3)	0,005
<b>Carcinoma hepatocelular</b>	0 (0,0)	3 (7,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,023

Dados são expressos em número (percentual) de casos. Grupo *Morf.* ingeriu morfina; *Den.* dietilnitrosamina (DEN); *Den+morf.* DEN e morfina numa mesma solução; *Den/morf.* DEN e morfina em diferentes soluções e dias.



**Figura 1 -** (A) HE 200x, displasia de alto grau em esôfago de animal do grupo **Den+morf**: células discarióticas acometendo mais da metade do epitélio escamoso, sem invadir a membrana basal, (B) HE 200x, carcinoma epidermóide invasor que atinge a muscular da mucosa em esôfago de animal do grupo **Den+morf**, (C) HE 40 x, foco de células claras em fígado de animal do grupo **Den**, (D) HE 100x, carcinoma hepatocelular em animal do grupo **Den**.

**10 PAPER - MORPHINE DOES NOT PROMOTE  
ESOPHAGEAL CARCINOGENESIS IN RATS  
EXPOSED TO DIETHYLNITROSAMINE**

**MORPHINE DOES NOT PROMOTE ESOPHAGEAL CARCINOGENESIS IN RATS  
EXPOSED TO DIETHYLNITROSAMINE**

**MORFINA NÃO PROMOVE CARCINOGENÊSE ESOFÁGICA EM RATOS EXPOSTOS A  
DIETILNITROSAMINA**

**AUTHORS:**

**Carlos Frota Dillenburg (1)**

**Cleber Dario Pinto Kruehl (2)**

**Carlos Thadeu Cerski (3)**

**Maria Isabel Edelweiss (4)**

**Tiago Luís Dedavid e Silva (5)**

**André Silvio Schier (5)**

**Address for correspondence:**

**Carlos Frota Dillenburg**

Av. Dr. Maurício Cardoso, 833/504

93.510-250

Novo Hamburgo – RS – Brasil

[carlos.dillenburg@terra.com.br](mailto:carlos.dillenburg@terra.com.br)

Phone: 51 / 9986-0979

Phone/fax: 51 / 3594-6922

- (1) Doctorate Degree in the Post-Graduate Program in Medicine: Surgery; Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil
- (2) Co-Professor of the School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil; Surgical Doctor degree from the Paulista School of Medicine, Brazil
- (3) Main Professor and Head of the Pathological Department, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.
- (4) Main Professor of the Pathological Department, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.
- (5) Medical Students from the Medical School of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** the high incidence of esophageal cancer in the north of Iran has been associated to the consumption of opium and exposure to nitrosamines. Diethylnitrosamine (DEN) has an established potential of producing experimental cancer in the esophagus and liver.

**AIM:** to evaluate by histopathology the effect of oral administration of morphine and DEN during 23 weeks on the hepatic and esophageal carcinogenesis on 176 rats.

**METHODS:** we divided the rats into the following groups: **Morph:** morphine; **Den:** DEN; **Den+morph:** DEN and morphine in the same solution; **Den/morph:** DEN and morphine in different solutions and days.

**RESULTS:** **Morph** did not promote neoplasias. The highest neoplastic incidents were found: a) in the esophagus, **Den** in relation to **Den/morph** and **Den+morph** (71.1%, 55.8%, and 50.0%); b) in the liver, **Den** and **Den/morph** in relation to **Den+morph** (73.8%, 81.4%, and 40.9%); c) higher incident of hepatic neoplasia than esophageal in **Den/morph** (81.4% and 55.8%). Different doses of DEN were ingested among the groups **Den**, **Den/morph**, and **Den+morph**, respectively 2.9, 2.8, and 2.3 mg/kg/day.

**CONCLUSIONS:** these results show that the morphine did not promote esophageal carcinogenesis and may have stimulated the hepatic metabolism of the first pass of the carcinogen.

**Headings:** epidermoid carcinoma of the esophagus, esophageal carcinogenesis, nitrosamines, morphine.

## RESUMO

**RACIONAL:** a alta incidência de câncer esofágico no norte do Irã foi associada ao consumo de ópio e exposição às nitrosaminas. A dietilnitrosamina (DEN) possui potencial estabelecido de produzir câncer experimental em esôfago e fígado.

**OBJETIVO:** avaliar por histopatologia o efeito da administração oral de morfina e DEN na carcinogênese esofágica e hepática em ratos.

**MÉTODOS:** durante 23 semanas, 176 ratos ingeriram diferentes soluções, sendo divididos em grupos: **Morf.** morfina; **Den:** DEN; **Den+morf.** DEN e morfina numa mesma solução; **Den/morf.** DEN e morfina em diferentes soluções e dias.

**RESULTADOS:** **Morf** não promoveu neoplasias. Encontramos maiores incidências neoplásicas: a) no esôfago, **Den** em relação à **Den/morf** e **Den+morf** (71,1%, 55,8% e 50,0%); b) no fígado, **Den** e **Den/morf** em relação à **Den+morf** (73,8%, 81,4% e 40,9%); c) maior incidência de neoplasia hepática do que esofágica em **Den/morf** (81,4% e 55,8%). Diferentes doses de DEN foram ingeridas entre os grupos **Den**, **Den/morf** e **Den+morf**, respectivamente 2,9, 2,8 e 2,3 mg/kg/dia.

**CONCLUSÕES:** estes resultados mostram que a morfina não promoveu a carcinogênese esofágica e pode ter estimulado o metabolismo hepático de primeira passagem do carcinógeno.

**Descritores:** carcinoma epidermóide do esôfago, carcinogênese esofágica, nitrosaminas, morfina.

## INTRODUCTION

Esophageal cancer is among the ten most frequent in the world and if we consider the social impact on the endemic regions, the problem becomes a severe scourge for those populations. An intimate correlation has been seen between sickness and regional habits, meaning the way people live<sup>(43)</sup>, and it has been shown that the origin of esophageal cancer is associated with different factors in each region<sup>(16,26)</sup>.

The high incidence of esophageal cancer has been associated with the consumption of opium habit in high-incidence regions in the north of Iran<sup>(15,19,24)</sup> and with the exposure to nitrosamines in China, mainly through their diet<sup>(9,21,22,41)</sup>.

The reasons for the association between opium and cancer of the esophagus are not known, but trials show that a dose of morphine sulfate, the main alkaloid of opium, caused an alkylation increase in the DNA in the esophagus and a decrease in the liver in rats that received diethylnitrosamine (DEN) after the morphine. DEN, a nitrosamine, is considered one of the substances with the highest potential for producing cancer in the esophagus and liver of rats and mice<sup>(20,31)</sup>, and the alkylation of the DNA constitutes a known alteration precursory to the carcinogenesis provoked by DEN in these organs. This way the morphine would cause a lowering of the hepatic carcinogenesis and an increase of the esophageal by influencing the hepatic metabolism of DEN. Once suggested that the observations made in rats could be imputed to man<sup>(31)</sup>, these would be possible metabolic evidences, in an acute trial, for the association between opium and cancer of the esophagus in rats and therefore, by extension, in humans.

In the present study, we offered DEN in the rat's drinking water for three days during each one of the 23 weeks, and compared with the groups that consumed morphine simultaneously or not with DEN. We evaluated the effect of the chronic administration of morphine and DEN on the hepatic and esophageal carcinogenesis.



## METHODS

We purchased the DEN from SIGMA (St. Louis, MO, USA): N-0756, density – 0.95 g/ml, and the morphine sulfate from CRISTÁLIA (Itapira, SP, Brazil): DCB 0856.03-7, density - 10 mg/ml. We obtained the 176 Wistar rats, ranging from 185-215g, from Bioterio of the State Foundation of Health Protection and Research in Rio Grande do Sul – FEPPS. Water, food (Nuvilab CR1, based on criteria from the National Research Council and National Institute of Health – USA), and the diluted substances were changed 3 times a week at which time we measured the quantities ingested of each solution. All of the animals received human care and the protocols were approved by the Scientific Commission and the Health Research and Ethics Commission of GPPG-HCPA (the Research and Post-Graduate Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

In a Comparative Study of Multiple Groups, we divided 176 rats into groups with 44 animals and they ingested: **Morph**: morphine; **Den**: DEN; **Den+morph**: DEN + morphine in the same solution; **Den/morph**: DEN and morphine in different solutions and days. The rats ingested morphine solution during four days a week in the **Den/morph** group and three in the other groups, while the DEN was ingested during three days a week in the respective groups. We used the estimated doses of 5 mg/kg/day for morphine and DEN. The animals were weighed in the beginning, at three months, and before euthanasia, which occurred at 161 days (23 weeks). We dried esophaguses and livers and immediately placed them in 10% buffered formalin until analysis.

We examined the esophagus in its entire extension since it wraps around itself (like a jellyroll) and removed three samples to represent the liver. Pathologists that were unaware of the group of origin of the specimen, examined the sections in hematoxylin-eosin (HE) under

a common light microscope. We considered always the lesion of higher grade of alteration of each piece.

We classified the esophaguses as<sup>(32)</sup> 1) normal histology, 2) hyperplasia, 3) esophagitis, 4) papilloma, 5) low-grade dysplasia, 6) high-grade dysplasia (including carcinoma *in situ*), and 7) invasive carcinoma: of the mucosa, of the muscularis of mucosa, and of the sub-mucosa (Figure 1A and 1B). We considered malignant neoplasias the high-grade dysplasia and invasive carcinoma, and called them neoplastic esophageal lesions or esophageal CA.

We classified the livers as<sup>(5)</sup> 1) normal histology, 2) focus of clear cells, 3) neoplastic nodules, and 4) hepatocellular carcinoma (Figure 1C and 1D). We considered malignant neoplasias the focus of clear cells, the neoplastic nodules, and the hepatocellular carcinoma, and called them neoplastic hepatic lesions or hepatic CA.

The quantitative variables was analysed by ANOVA with a criterion of classification and the differences localized by the Tukey Test. Among the categorical variables, we compared the groups by chi-square with the differences located among the groups by the post-hoc procedure proposed by Zar. The significance level adopted was  $\alpha = 0.05$ .

## RESULTS

We did not observe changes in conduct of the rats subordinate to the ingestion of morphine. There were two non-programmed deaths at 31 and 74 days of the trial, both of them in the **Den** group. Histopathologic analysis was not carried out in 13 esophageal specimens and in 3 hepatic: 2 due to non-programmed deaths and the others due to lack of material for the analysis. Therefore, we submitted 163 esophaguses and 173 livers to the histological exam.

The morphine ingested in isolated form (**Morph**) did not induce significant carcinogenesis in any of the organs analyzed (Table 1).

The incidence of neoplastic esophageal lesions was larger in the **Den** group (71.1%) in relation to the other groups ( $p < 0.001$ ). This incidence was similar between the two groups that ingested DEN and morphine (**Den+morph** 50.0% and **Den/morph** 55.8%) (Table 1).

The incidence of neoplastic hepatic lesions was less in the group that ingested DEN and morphine simultaneously in the same solution (**Den+morph** 40.9%) than in the others that ingested the carcinogen (**Den/morph** 81.4% and **Den** 73.8%) ( $p < 0.001$ ) (Table 1).

The possible effect of the morphine on the metabolism of first hepatic pass of the DEN may be observed in Table 1. The **Den** and **Den+morph** presented a similar incidence of esophageal and hepatic lesions while the **Den/morph** presented a higher percentage of hepatic lesions than esophageal ones ( $p = 0.013$ ).

The esophageal histology was normal for the vast majority of the animals of the **Morph** group (95.0%), in contrast with the groups that ingested DEN, which were normal in only 2.6% of the **Den**, 16.7% of the **Den+morph**, and 14.0% of the **Den/morph**. The **Den** group caused a greater incidence of alterations, with a tendency to lesions of greater epithelial destructuring than the groups treated also with morphine (**Den+morph** and **Den/morph**) (Table 2).

Almost all of the animals of the **Morph** group presented a normal hepatic histology (97.7%), which did not occur with the groups that ingested DEN. In these, the histology was normal in 26.2% of the **Den**, 59.1% of the **Den+morph**, and 18.2% of the **Den/morph**. Though the **Den/morph** group represented greater incidence of changes, the 3 cases of hepatocellular carcinoma occurred in the **Den** group (Table 3).

The dose ingested was based on the quantity of weekly solution ingested, on the

animal's weight, and on the concentration of the substances in the liquid offered the animals. The average dose ingested was inferior to the estimate of 5 mg/kg/day in all the groups.

Among the groups exposed to the carcinogen, they all ingested different doses of DEN among themselves (**Den**: 2.9 mg/kg/day, **Den+morph**: 2.3 mg/kg/day, **Den/morph**: 2.8 mg/kg/day) ( $p < 0.001$ ). From the groups that ingested morphine (**Morph**: 2.5 mg/kg/day; **Den+morph**: 2.3 mg/kg/day; and **Den/morph**: 2.4 mg/kg/day), the **Den+morph** group ingested less morphine than the other groups ( $p < 0.001$ ) (Table 1).

## DISCUSSION

The nitrate compounds are presented in the diet or in the environment in doses much below those necessary to develop cancer, and for this reason the biggest concern is with chronic exposure. The carcinogenic nitrates are present in the diet (mainly in food preservatives, colorings, and flavorings), in tobacco and alcoholic beverages (beer, whisky, and liquors), through occupational exposure (rubber, pesticide, cosmetic, and leather tanning industries), and in personal and domestic hygiene products (cosmetics, shampoos, and detergents)<sup>(6,13,20,36)</sup>. Their hepatotoxic and carcinogenic potential has been established both in humans as well as in animals<sup>(6,27,35)</sup> and described that the nitrosamines produce the alkylation of the DNA in human tissues *in vitro*<sup>(20)</sup>. Based on these studies, it has been suggested that nitrosamines could be related to cancer of the esophagus in man<sup>(2,14, 21,22,23)</sup>.

The discovery that nitrosamines present a well-defined organotropism allowed the development of study models of cancer in various organs. Many authors used the model of esophageal and hepatic carcinogenesis induced by DEN in mice and rats and showed various levels of neoplastic incidence depending on the dose and time of duration of their studies<sup>(4,17,18,29,30,32,34,35)</sup>. The knowledge that the N-nitroso compounds show similar biological

activity in animal and human tissues would suggest that the observations made in rats could be extrapolated to man<sup>(2,31)</sup>.

The incidence of cancer of the esophagus is influenced by different factors in the various endemic areas of the world. In Europe and United States it is related with the exposure to alcohol and tobacco, associated or not<sup>(7,40)</sup>, in the South of Brazil with the consumption of hot matte tea<sup>(11)</sup>, and in the north of Iran it has been associated by epidemiologists with the smoking of opium and the ingestion of opium pipe residues (*sukhteh*)<sup>(19)</sup>. Experiments show that ethanol alters the pharmacokinetics of the nitrosamines<sup>(1,37,38,39)</sup>. It causes higher exposure of nitrosamines to the esophageal tissue and capable of inducing cancer of the esophagus in animals<sup>(1,3,37,38,39)</sup>. Ribeiro Pinto<sup>(31)</sup> showed that morphine, opium's main alkaloid, also changes the pharmacokinetics and distribution of DEN in a way similar to ethanol. This reinforces the hypothesis that these two substances have a common base in their influence on esophageal carcinogenesis: their effects on pharmacokinetics from the nitrosamines to which man is exposed.

The dose of 5 mg/kg/day of DEN used in this study during three days a week was based on the studies of Rubio<sup>(34)</sup> and Ribeiro Pinto<sup>(31)</sup>. The first author administered DEN in the concentration of 0.04 ml/liter of drinking water (7 mg/kg/day) during three days a week, which promoted esophageal tumors after periods of 4 and 6 months in mice (1 and 3 tumors/cm of esophageal mucous, respectively), with low mortality. Ribeiro Pinto<sup>(31)</sup> demonstrated the alkylation of the hepatic and esophageal DNAs with 3 mg/kg/dose of DEN. Other authors confirm the carcinogenic power of these doses: Gibel<sup>(17)</sup> provoked esophageal cancer in 30% and 56% of the rats with the respective doses of 2.5 and 10 mg/kg/day, and Schmähl<sup>(35)</sup> provoked hepatocellular carcinomas in 92% of the rats of his trial in a period of  $138 \pm 10$  days using doses between 5 and 7.5 mg/kg/day of DEN, ingested daily.

In relation to morphine, it has been demonstrated that a single dose of 5 mg/kg increased the alkylation of the esophageal DNA of rats by 90% and lowered the hepatic by

10% when administrated 45 minutes previously to a single dose of DEN. These results do not change significantly with the increase of the doses of morphine sulfate from 10 and 20 mg/kg<sup>(31)</sup>. In the present study, we used 5 mg/kg/day of morphine sulfate, which would not cause changes in the activity of the animals and provoke the pharmacokinetic changes referred to above<sup>(31)</sup>.

The dose ingested by the animals in this study was substantially lower to the dose estimated. Though the esophageal and hepatic carcinogenesis are known to be dependent on the dose of DEN, Rubio et al.<sup>(33,34)</sup> described that the time elapsed would also be of great importance in the formation of tumors in the esophagus of mice. According to these authors, clones of esophageal cells would be "programmed" for carcinogenesis in early stages of the treatment with DEN, and that a large number of tumors would occur in longer intervals even after only a few doses of DEN. While animals treated for three months presented a Tumor Index (TI) = 0.9, animals treated for three months and maintained alive for four additional months, with a carcinogen-free diet, presented a TI that was five times higher (TI = 4.6)<sup>(33)</sup>. In this present study, a percentage of animals affected by esophageal neoplastic lesions higher than that estimated in the beginning of the study was developed in the **Den** group (obtained = 71%; estimated = 30%), despite the doses ingested were only 59% of that expected in this group. Based on this, it can be inferred that both the time elapsed of 23 weeks as well as the doses actually ingested of DEN were enough to provoke the carcinogenic effects expected in the two organs evaluated with practically no mortality.

The dose ingested of morphine varied between 2.3 and 2.5 mg/kg/day, which is only 48% of the estimated 5 mg/kg/day. These doses are equivalent to 170 mg/day for man, which are similar to the levels used in analgesics in occidental medicine and making them comparable to this population of chronic users of morphine. On the other hand, the dose is possibly inferior to those reported in the population of addicts in the north of Iran, who received 3 grams of opium daily<sup>(19)</sup>. For this reason, it most likely does not apply to this

population where the relation between opium and cancer of the esophagus was first described<sup>(12)</sup>.

With the ethical intention of lowering the unnecessary euthanasia of animals, a control group with eight rats was created, which ingested only water. This group presented a normal macro and microscopic analysis in the present study, the same of hundreds of animals that used the same source of water in other research from this Institution<sup>(18)</sup>. This group was excluded from the analysis since the number of eight animals caused a strong asymmetry in the data, jeopardizing an adequate statistical analysis.

Among the animals exposed only to DEN, 71% presented esophageal neoplastic lesions and 73% hepatic, which are incidents similar to the other authors<sup>(17,29,25,35)</sup>. Among the groups exposed only to morphine, esophageal neoplasias were not found, but only one pre-neoplastic hepatic lesion (2.3%) was developed in one animal group of **Morph**, a focus of clear cells. Bannasch<sup>(6)</sup> affirms that although these lesions can occur in control animals, the incidence is low, as is the incidence of naturally occurring hepatocellular carcinoma.

There was a higher incidence of esophageal neoplastic lesions in the animals that ingested only the carcinogenic (71.1%) ( $p < 0.001$ ) in relation to the two groups that ingested DEN and morphine (**Den+morph** and **Den/morph**). These two groups presented a neoplastic incidence similar between themselves (50% and 55.8%) (Table 1). Even though the doses of DEN were different among the groups of **Den**, **Den/morph**, and **Den+morph** (2.9, 2.8, and 2.3 mg/kg/day) ( $p < 0.001$ ), a relative correspondence could be seen between them and the incidence of esophageal neoplasias: the group that ingested more carcinogen present a greater incidence of neoplasia. These results suggest that the morphine does not exert an inductive carcinogenic effect on the esophageal mucosa.

The incidence of neoplastic hepatic lesions did not have a correspondence with the dose ingested of the carcinogen. The **Den** and **Den/morph** groups presented incidences

similar between themselves and higher than *Den+morph* (73.8%, 81.4%, and 40.9%) ( $p < 0.001$ ), even though the doses of DEN were different among all the groups (2.9, 2.8, and 2.3 mg/kg/day) ( $p < 0.001$ ) (Table 1). Notice that *Den* ingested a significantly larger dose of the carcinogen than *Den/morph*, but suffered from 73.8% of neoplasias in comparison to 81.4% of the other group. Despite the incidence not being significantly different, these results could express some effect of the morphine on the hepatic carcinogenesis. A question still remains: if the doses of carcinogen were similar, would there be a significantly higher incidence of neoplasias in the *Den/morph* group in relation to the *Den* group? The data does not allow us to make conclusions if the morphine would exert an effect on the hepatic carcinogenesis.

The mechanism of changes produced by the morphine is not clear, but the participation of the enzymatic cytochrome P450 system is probable<sup>(31)</sup>. Though chronic or sub-acute treatment of adult male rats with morphine have lowered the levels of some P450s, elevated doses of morphine between 5 and 20 mg/kg/day administered to rats for four or more days induced other P450s such as sub-groups 1A2, 2B1, and 2E1<sup>(28)</sup>. The P450 2E1 carries out a substantial part of the hepatic metabolism of the DEN in the rat<sup>(42)</sup>. The morphine is not only metabolized by the hepatic P450<sup>(28,31)</sup>, but it also acts as an inductive agent of this P450 and could have an influence on the metabolism of the DEN's first hepatic pass, which would stimulate and attenuate the activation of the carcinogen. Morphine, when administered in an isolated, non-continual (three days a week), and chronic way, could induce weekly the 2E1 sub-group of the hepatic enzyme P450, maintaining it active and free for the moment when the carcinogen is ingested. This way, the DEN would be mostly metabolized in the liver, causing it to be locally active and capable of provoking a high incidence of carcinoma in this organ. If it is mostly metabolized in the liver, there would be less hematic bioavailability for other organs that also have P450 such as the esophagus, and consequently a lower local activation and capacity to form carcinomas in this organ. Doses of DEN known to be carcinogenic such as those offered to the *Den/morph* group could have



been utilized by this metabolic mechanism of pre-activation by the morphine and promote a significantly higher percentage of hepatic neoplasias than esophageal, respectively 81.4 and 55.8% (Table 1).

When offered DEN and morphine simultaneously, the induction and utilization of the hepatic P450 2E1 by the morphine could occur, keeping this P450 "occupied" at the time in which the carcinogen does its metabolism of the first pass, thus characterizing a competitive phenomenon between the two substances. Depending on the level of competition at the hepatic level, the hepatic bioavailability of DEN would be unaltered or even increased and consequently an unaltered or increased metabolism and carcinogenesis in the esophagus. This could have been the metabolic phenomenon that occurred in the **Den+morph** group when statistically similar results were seen of 40.9% of hepatic neoplasias and 50% of esophageal neoplasias (Table 1). These results suggest that the morphine could stimulate the hepatic metabolism of DEN in chronic exposure when the substances are ingested in an interspersed way. This hypothesis is based on indirect results of neoplastic incidence in histological results and needs new studies with direct metabolic measurement in order to reach more definite conclusions.

We concluded that morphine did not present an inductive effect on the esophageal carcinogenesis induced by the ingestion of diethylnitrosamine in this experimental model. We suppose that the morphine may have stimulated the hepatic metabolism of the first pass of the carcinogen.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

- The State Foundation of Health Protection and Research – FEPPS, for them making the biotério available as well as for the animals used in this study.
- The Post-Graduate Research Group of the Hospital de Clínicas in Porto Alegre through its Research Support Fund and the Post-Graduate Program in Medicine: Surgery, from the Federal University of Rio Grande do Sul, for them making the financial resources available to carry out this study.
- Claudia Helena Werlang Dillenburg, Pathological Physician of the Histolab Laboratory, Novo Hamburgo, Brazil, for the participation on pathological analysis.
- Giancarlo Marafon, Medical Student from the Medical School of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, for the great help during the study.

## REFERENCES

1. Anderson LM, Chhabra SK, Nerurkar PV, Souliotis VL, Kyrtopoulos SA. Alcohol-related cancer risk: a toxicokinetic hypothesis. *Alcohol* 1995;12:97-104.
2. Archer MC. Mechanisms of action of N-nitroso compounds. *Cancer Surv* 1989;8:241-50.
3. Aze Y, Toyoda K, Furukawa F, Mitsumori K, Takahashi M. Enhancing effect of ethanol on esophageal tumor development in rats by initiation of diethylnitrosamine. *Carcinogenesis* 1993;14:37-40.
4. Baker JR, Mason MM, Yerganian G, Weisburger EK, Weisburger JH. Induction of tumors of the stomach and esophagus in inbred Chinese hamsters by oral diethylnitrosamine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974;146:291-3.
5. Bannasch P, Becker FF, Busey W, Farber E, Firminger HI, Garner FM, Gössner W, et al. Report of a workshop on classification of specific hepatocellular lesions in rats. *Cancer Research* 1975; 35:3214-3223.
6. Bartsch H, Ohshima H, Pignatelli B, Calmels S. Human exposure to endogenous N-nitroso compounds: quantitative estimates in subjects at high risk for cancer of the oral cavity, oesophagus, stomach and urinary bladder. *Cancer Surv* 1989;8:335-62.
7. Blot WJ. Esophageal cancer trends and risk factors. *Semin Oncol* 1994;21:403-10.
8. Cheng KK. The etiology of esophageal cancer in Chinese. *Semin Oncol* 1994;21:411-5.
9. Cheng KK, Day NE, Duffy SW, Lam TH, Fok M, Wong J. Pickled vegetables in the aetiology of oesophageal cancer in Hong Kong Chinese. *Lancet* 1992;339:1314-8.
10. Cochin J, Axelrod J. Biochemical and pharmacological changes in the rat following chronic administration of morphine, nalorphine and normorphine. *J Pharmacol Exp Ther* 1959;(125):105-10.
11. De Barros SG, Ghisolfi ES, Luz LP, Barlem GG, Vidal RM, Wolff FH, Magno VA. [High temperature "mate" infusion drinking in a population at risk for squamous cell carcinoma of the esophagus]. *Arq Gastroenterol* 2000; 37:25-30.
12. Dowlatshahi K, Miller RJ. Role of opium in esophageal cancer: a hypothesis. *Cancer Res* 1985;45:1906-7.
13. Ender F, Havre GN, Madsen R, Ceh L, Helgebostad A. Studies on conditions under which N-nitrosodimethylamine is formed in herring meal produced from nitrite-preserved herring. The risk of using nitrite uncritically as a preservative agent. *Z Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd* 1967;22:181-9.
14. Forman D. Are nitrates a significant risk factor in human cancer? *Cancer Surv* 1989;8:443-58.
15. Ghadirian P, Stein GF, Gorodetzky C, Roberfroid MB, Mahon GA, Bartsch H, Day NE. Oesophageal cancer studies in the Caspian littoral of Iran: some residual results,

- 
- including opium use as a risk factor. *Int J Cancer* 1985;35:593-7.
16. Ghadirian P, Vobecky J, Vobecky JS. Factors associated with cancer of the oesophagus: an overview. *Cancer Detect Prev* 1988;11:225-34.
17. Gibel W. Experimentelle untersuchungen zur zynkarzinogenese beim ösophaguskarzinom. *Arch Geschwulstforsch* 1967;30:181-9.
18. Gurski RR, Schirmer CC, Krueel CR, Komlos F, Krueel CD, Edelweiss MI. Induction of esophageal carcinogenesis by diethylnitrosamine and assessment of the promoting effect of ethanol and N-nitrososornicotine: experimental model in mice. *Dis Esophagus* 1999;12:99-105.
19. Hewer T, Rose E, Ghadirian P, Castegnaro M, Malaveille C, Bartsch H, Day NE. Ingested mutagens from opium and tobacco pyrolysis products and cancer of the oesophagus. *Lancet* 1978;2:494-6.
20. Lijinsky W. Chemistry and biology of N-nitroso compounds. Cambridge: Cambridge University Press; 1992. (Cambridge Monographs on Cancer Research)
21. Lin K, Shen ZY, Lu SH, Wu YN. Intake of volatile N-nitrosamines and their ability to exogenously synthesize in the diet of inhabitants from high-risk area of esophageal cancer in southern China. *Biomed Environ Sci* 2002; 15:277-82.
22. Lin K, Shen W, Shen Z, Wu Y, Lu S. Dietary exposure and urinary excretion of total N-nitroso compounds, nitrosamine acids and volatile nitrosamine in inhabitants of high- and low-risk areas for esophageal cancer in southern China. *Int J Cancer* 2002; 102:207-11.
23. Lu SH, Chui SX, Yang WX, Hu XN, Guo LP, Li FM. Relevance of N-nitrosamines to oesophageal cancer in China. *IARC Sci Publ* 1991;105:11-7.
24. Malaveille C, Friesen M, Camus AM, Garren L, Hautefeuille A, Béréziat JC, Ghadirian P, Day NE, Bartsch H. Mutagens produced by the pyrolysis of opium and its alkaloids as possible risk factors in cancer of the bladder and oesophagus. *Carcinogenesis* 1982;3:577-85.
25. Mandard AM, Marnay J, Herlin P, Elie H, Tuyns AJ, Le Talaer JY. Cancer of the esophagus induced in the Wistar rat by ethyl-N-butyl-nitrosamine. *Bull Cancer* 1984;71:419-24.
26. Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer* 1996;69:225-35.
27. Pérez YS, Legleu CC, Cuellar CG, Carreón JP, García SH, Neyoy CG. Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* 2005; 217:25-32.
28. Rane A, Liu Z, Henderson CJ, Wolf CR. Divergent regulation of cytochrome P450 enzymes by morphine and pethidine: a neuroendocrine mechanism? *Mol Pharmacol* 1995;47:57-64.
29. Reuber MD. Carcinomas of the esophagus in rats ingesting diethylnitrosamine. *Eur J Cancer* 1975;11:97-9.

30. Reuber MD. Histopathology of preneoplastic and neoplastic lesions of the esophagus in BUF rats ingesting diethylnitrosamine. *J Natl Cancer Inst* 1977;58:313-21.
31. Ribeiro Pinto LF, Swann PF. Opium and oesophageal cancer: effect of morphine and opium on the metabolism of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in the rat. *Carcinogenesis* 1997;18:365-9.
32. Rubio CA. Epithelial lesions antedating oesophageal carcinoma. I. Histologic study in mice. *Pathol Res Pract* 1983;176:269-75.
33. Rubio CA, Munck-Wikland E, Fagerberg J, Strander H, Kuylenstierna R, Krueel C. Further studies on the carcinogenic-free interval following exposure in experimental esophageal tumorigenesis. *In Vivo* 1993;7:81-4.
34. Rubio CA, Liu FS, Chejfec G, Sveander M. The induction of esophageal tumors in mice: dose and time dependency. *In Vivo* 1987;1:35-8.
35. Schmähl D, Preussmann R, Hamperl H. Leberkrebs-erzeugende wirkung von diäthylnitrosamin nach oraler gabe bei ratten. *Naturwissenschaften* 1960;47:89.
36. Siddiqi MA, Tricker AR, Kumar R, Fazili Z, Preussmann R. Dietary sources of N-nitrosamines in a high-risk area for oesophageal cancer - Kashmir, India. *IARC Sci Publ* 1991;105:210-3.
37. Swann PF. Effect of ethanol on nitrosamine metabolism and distribution. Implications for the role of nitrosamines in human cancer and for the influence of alcohol consumption on cancer incidence. *IARC Sci Publ* 1984;57:501-12.
38. Swann PF. The possible role of nitrosamines in the link between alcohol consumption and esophageal cancer in man. *Toxicol Pathol* 1984;12:357-60.
39. Swann PF, Coe AM, Mace R. Ethanol and dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine metabolism and disposition in the rat. Possible relevance to the influence of ethanol on human cancer incidence. *Carcinogenesis* 1984;5:1337-43.
40. Tuyns AJ, Castegnaro M, Toussaint G, Walker EA, Griciute LL, Le Talaer JY. Research on the etiological factors of oesophageal cancer in the West of France. *Bull Cancer* 1980;67:15-28.
41. Wu Y, Chen J, Ohshima H, Pignatelli B, Boreham J, Li J, Campbell TC, Peto R, Bartsch H. Geographic association between urinary excretion of N-nitroso compounds and oesophageal cancer mortality in China. *Int J Cancer* 1993;54:713-9.
42. Yoo JS, Ishizaki H, Yang CS. Roles of cytochrome P450IIE1 in the dealkylation and denitrosation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in rat liver microsomes. *Carcinogenesis* 1990;11:2239-43.
43. Zhu JQ, Xiao Y, Liu ZQ, Chen JS, Guo ZL. The effects of Chinese tea on the methylation of DNA by the esophageal carcinogen N-nitrosomethylbenzylamine. *Biomed Environ Sci* 1991;4:225-31.

**Table 1 – Neoplastic incidences and doses of the substances broken down by treatment group**

	<i>Morph</i>	<i>Den</i>	<i>Den+morph</i>	<i>Den/morph</i>	<b>P</b>
<b>Esophageal CA</b>	n = 40 0 (0.0) <sup>a</sup>	n = 38 27 (71.1) <sup>c</sup>	n = 42 21 (50.0) <sup>b</sup>	n = 43 24 (55.8) <sup>b</sup>	< 0.001
<b>Hepatic CA</b>	n = 44 1 (2.3) <sup>a</sup>	n = 42 31 (73.8) <sup>c</sup>	n = 44 18 (40.9) <sup>b</sup>	n = 43 35 (81.4) <sup>c</sup>	< 0.001
<b>DEN dose</b>	-	2.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.8 ± 0.1 <sup>c</sup>	< 0.001
<b>Morphine dose</b>	2.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	-	2.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	< 0.001

Data is expressed in numbers (percentages) of positive cases or as an average ± standard deviation of mg/kg/day. Distinct letters-index represent statistically significant differences among the groups. **Morph** group: ingested morphine; **Den**: diethylnitrosamine (DEN); **Den+morph**: DEN and morphine in the same solution; **Den/morph**: DEN and morphine in different solutions and days. Esophageal CA: lesions considered pre-malignant (high-level dysplasias) and malignant (epidermoid carcinomas) in the histopathologic exam. Hepatic CA: lesions considered pre-malignant (nidi of clear cells, displastic nodules), and malignant (hepatocellular carcinomas) in the histopathologic exam. "-": Solution not provided for ingestions to the respective groups.

Table 2 – Relative frequency of the results from the esophageal microscopy broken down by treatment groups

	<i>Morph</i> (n = 40)	<i>Den</i> (n= 38)	<i>Den+morph</i> (n = 42)	<i>Den/morph</i> (n = 43)	P
<b>Normal</b>	38 (95.0)	1 (2.6)	7 (16.7)	6 (14.0)	< 0.001
<b>Hyperplasia</b>	0 (0.0)	2 (5.3)	4 (9.5)	1 (2.3)	0.166
<b>Esophagitis</b>	0 (0.0)	2 (5.3)	4 (9.5)	3 (7.0)	0.283
<b>Papilloma</b>	1 (2.5)	0 (0.0)	1 (2.4)	0 (0.0)	0.572
<b>Low-grade Dysplasia</b>	1 (2.5)	6 (15.8)	5 (11.9)	9 (20.9)	0.084
<b>High-grade Dysplasia</b>	0 (0.0)	19 (50.1)	19 (45.2)	18 (41.9)	< 0.001
<b>Invasive Carcinoma</b>	0 (0.0)	8 (21.0)	2 (4.8)	6 (14.0)	< 0.001
<i>Mucous</i>	0 (0.0)	6 (15.8)	2 (4.8)	4 (9.3)	0.051
<i>Muscle of mucous</i>	0 (0.0)	1 (2.6)	0 (0.0)	2 (4.7)	0.314
<i>Sub-mucous</i>	0 (0.0)	1 (2.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.346

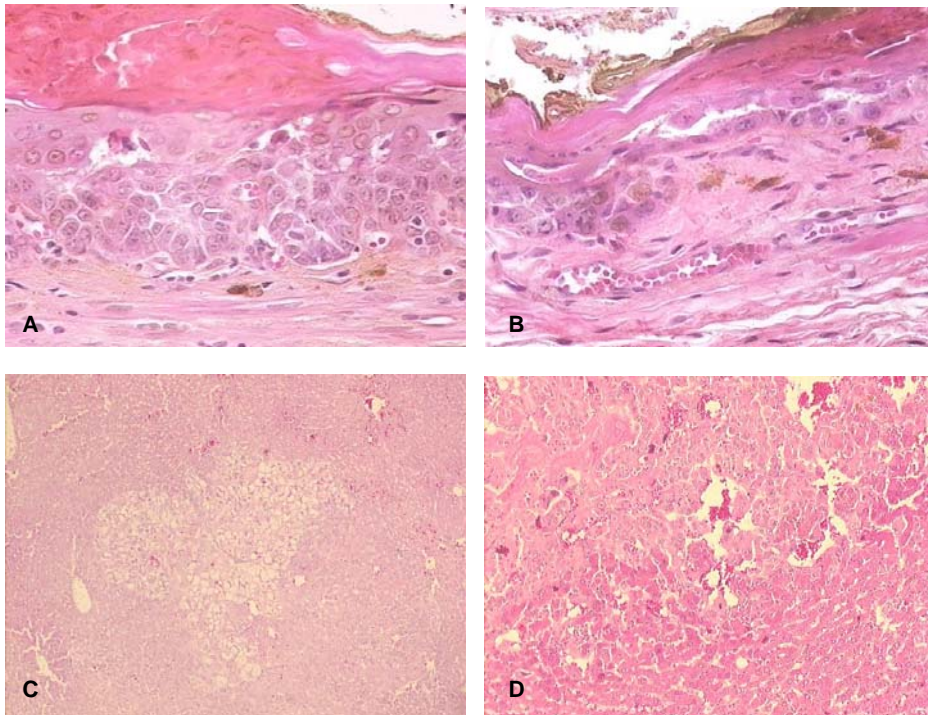
Data is expressed in numbers (percentage) of cases. Morph Group: ingested morphine; *Den*: diethylnitrosamine (DEN); *Den+morph*: DEN and morphine in the same solution; *Den/morph*: DEN and morphine in different solutions and days.

**Table 3 – Relative frequency of the results from the hepatic microscopy broken down by treatment groups**

	<i>Morph</i> (n = 44)	<i>Den</i> (n= 42)	<i>Den+morp</i> <i>h</i> (n = 44)	<i>Den/morp</i> <i>h</i> (n = 43)	<b>P</b>
<b>Normal</b>	43 (97.7)	11 (26.2)	26 (59.1)	8 (18.6)	< 0.001
<b>Focus of clear cells</b>	1 (2.3)	25 (59.5)	8 (18.2)	28 (65.1)	< 0.001
<b>Neoplastic nodules</b>	0 (0.0)	3 (7.1)	10 (22.7)	7 (16.3)	0.005
<b>Hepatocellular carcinoma</b>	0 (0.0)	3 (7.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.023

Data is expressed in numbers (percentage) of cases. *Morph* Group: ingested morphine; *Den*: diethylnitrosamine (DEN); *Den+morph*: DEN and morphine in the same solution; *Den/morph*: DEN and morphine in different solutions and days.





**Figure 1 -** (A) HE 200x, high-grade dysplasia in esophagus of animal in the *Den+morph* group, dyskaryotic cells affecting more than half of the squamous epithelium, without invading the base membrane, (B) HE 200x, invasive epidermoid carcinoma that affects the muscularis of mucosa in the esophagus of animal in the *Den+morph* group, (C) HE 40 x, focus of clear cells in liver of animal in the *Den* group, (D) HE 100x, hepatocellular carcinoma in animal of the *Den* group.

## **ANEXOS**

**ANEXO A - Ração completa para camundongos e ratos nuvilab CR1**

(baseado em critérios do National Research Council e National Institute of Health – USA)

**Composição básica:** carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico, aminoácido.

**Níveis de garantia:** umidade ..... (máx.) 12,5%  
proteína bruta..... (mín.) 22,0%  
extrato etéreo..... (mín.) 4,0%  
matéria fibrosa..... (máx.) 8,0%  
matéria mineral..... (máx.) 10,0%  
cálcio (Ca)..... (mín.) 1,4%  
fósforo (P)..... (mín.) 0,8%

**Enriquecimento por kg de ração:** vitamina A (12.000 UI);  
vitamina D3 (1.800 UI);  
vitamina K3 (3 mg);  
vitamina E (30,00 mg);  
vitamina B1 (5,0 mg);  
vitamina B2 (6,0 mg);  
vitamina B6 (7,0 mg);  
vitamina B12 (20,0 mcg);  
niacina (60,0 mg);  
ácido pantotênico (20,0 mg);  
ácido fólico (1,0 mg);  
biotina (0,05 mg);  
colina (600,0 mg);  
antioxidante (100 mg);  
metionina (300 mg);  
ferro (Fe) (50 mg);  
manganês (Mn) (60 mg);  
zinco (Zn) (60 mg);  
cobre (Cu) (10mg);  
cobalto (Co) (1,5 mg);  
lisina (100,0 mg).

**ANEXO B – Protocolos de avaliação****B.1 Esôfago - Protocolo de avaliação**

Rato nº \_\_\_\_\_

Código: \_\_\_\_\_

Fotos ( ) sim ( ) não

Peso I: \_\_\_\_\_

Peso II: \_\_\_\_\_

Peso III: \_\_\_\_\_

**MACROSCOPIA**

COMPRIMENTO DO ESÔFAGO: \_\_\_\_\_ CM

NÚMERO DE TUMORES: \_\_\_\_\_

ÍNDICE TUMORAL ESOFÁGICO DE RUBIO: \_\_\_\_\_

**MICROSCOPIA****Fotos ( ) sim ( ) não**

esôfago normal

( ) sim ( ) não

hiperplasia epitelial

( ) sim ( ) não

esofagite

( ) sim ( ) não

papiloma

( ) sim ( ) não

displasia de baixo grau

( ) sim ( ) não

displasia de alto grau (inclui CA *in situ*)

( ) sim ( ) não

carcinoma epidermóide invasor

mucosa

( ) sim ( ) não

muscular da mucosa

( ) sim ( ) não

submucosa

( ) sim ( ) não

**Outras lesões:****Observações:**

**B.2 Fígado - Protocolo de avaliação**

Rato nº \_\_\_\_

Código: \_\_\_\_\_

**MACROSCOPIA**

Peso do fígado: \_\_\_\_

Fotos ( ) sim ( ) não

Medida: \_\_\_\_ x \_\_\_\_ x \_\_\_\_ cm (3 eixos maiores)

Amostragem:

Presença de tumor:

\_\_\_\_ lesões, localizadas no(s) segmento(s):

( ) A ( ) B ( ) C ( ) D

amostras tumorais retiradas dos segmentos

( ) A ( ) B ( ) C ( ) D

amostras não tumorais retiradas dos segmentos

( ) A ( ) B ( ) C ( ) D

**Obs.:** 2 amostras tumorais e 1 amostra não tumoral do mesmo fígado ou  
1 amostra tumoral e 2 amostras não tumorais do mesmo fígado.

Ausência de tumor: ( ) amostras dos segmentos A, B e C

**MICROSCOPIA**

Fotos ( ) sim ( ) não

fígado normal

( ) sim ( ) não

focos de células claras

( ) sim ( ) não

nódulos neoplásicos

( ) sim ( ) não

carcinoma hepatocelular

( ) sim ( ) não

Outras lesões:

Observações:

## ANEXO C - Achados de macroscopia estratificados por grupos de tratamento

	Número de tumores	Comprimento dos esôfagos	Índice Tumoral Esofágico
<b>Morf</b>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	6,68 ± 0,38 <sup>b,a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
<b>Den</b>	0,98 ± 1,47 <sup>a</sup>	6,92 ± 0,54 <sup>b</sup>	0,13 ± 0,20 <sup>a</sup>
<b>Den+morf</b>	0,20 ± 0,55 <sup>b</sup>	6,77 ± 0,41 <sup>b</sup>	0,03 ± 0,08 <sup>b</sup>
<b>Den/morf</b>	0,41 ± 0,95 <sup>a,b</sup>	6,95 ± 0,51 <sup>b</sup>	0,06 ± 0,13 <sup>b</sup>

Dados são expressos em média ± desvio padrão de número de tumores, centímetros de esôfago ou índice de tumores esofágicos. Letras-índice distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Grupo **Morf**: ingeriu morfina; **Den**: dietilnitrosamina (DEN); **Den+morf**: DEN e morfina numa mesma solução; **Den/morf**: DEN e morfina em diferentes soluções e dias. Índice Tumoral Esofágico de Rubio (IT) - número de lesões esofágicas / comprimento do esôfago (cm); letras-índice distintas representam diferenças estatisticamente significativas.

## ANEXO D - Dose das substâncias ingeridas (mg/kg/dia) durante as 23 semanas

	Grupos que ingeriram DIETILNITROSAMINA			Grupos que ingeriram SULFATO DE MORFINA		
	<i>Den</i>	<i>Den+morf</i>	<i>Den/morf</i>	<i>Morf</i>	<i>Den+morf</i>	<i>Den/morf</i>
Semana 1	3,41	3,16	3,16	2,35	3,16	1,88
Semana 2	3,18	2,99	3,10	2,36	2,99	2,25
Semana 3	3,26	2,81	2,97	2,52	2,81	1,80
Semana 4	3,20	2,33	3,03	2,58	2,33	2,35
Semana 5	3,16	3,04	3,04	3,13	3,04	2,34
Semana 6	3,11	3,12	3,12	2,42	3,12	2,12
Semana 7	2,97	3,02	3,02	2,14	3,02	2,19
Semana 8	3,28	2,67	2,67	2,13	2,67	2,34
Semana 9	2,82	2,42	2,42	2,14	2,42	2,21
Semana 10	2,48	2,54	2,54	1,93	2,54	2,27
Semana 11	2,63	2,57	2,57	1,97	2,57	2,25
Semana 12	2,00	1,90	1,90	1,53	1,90	2,25
Semana 13	2,21	2,02	1,93	3,21	2,02	2,34
Semana 14	3,00	1,66	2,90	2,75	1,66	3,16
Semana 15	2,64	1,96	3,09	3,44	1,96	2,94
Semana 16	2,98	2,27	3,55	2,52	2,27	3,11
Semana 17	3,24	2,85	3,04	2,36	2,85	2,95
Semana 18	3,31	2,85	2,71	2,30	2,85	2,70
Semana 19	3,22	2,17	2,75	2,78	2,17	2,70
Semana 20	3,00	2,11	2,94	2,02	2,11	2,70
Semana 21	2,54	2,19	2,75	3,04	2,19	2,49
Semana 22	2,50	2,45	2,44	2,84	2,45	2,84
Semana 23	2,30	2,53	2,75	2,70	2,53	2,07
<b>MÉDIA*</b>	<b>2,94 ±0,31<sup>a</sup></b>	<b>2,30 ±0,13<sup>b</sup></b>	<b>2,80 ±0,11<sup>c</sup></b>	<b>2,48 ±0,20<sup>a</sup></b>	<b>2,30 ±0,13<sup>b</sup></b>	<b>2,44 ±0,12<sup>a</sup></b>

Dados são expressos em média ou em média ± desvio padrão de mg/kg/dia. Letras-índice distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Grupo *Morf.* ingeriu morfina; *Den*: dietilnitrosamina (DEN); *Den+morf*: DEN e morfina numa mesma solução; *Den/morf*: DEN e morfina em diferentes soluções e dias.