

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA**

RUVER MENDES MORAES

**INDUÇÃO DE CARCINOGENESE ESOFÁGICA POR
DIETILNITROSAMINA E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA COX-2
ASSOCIADA À LESÃO TÉRMICA: MODELO EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS**

Porto Alegre

2005

RUVER MENDES MORAES

**INDUÇÃO DE CARCINOGENESE ESOFÁGICA POR
DIETILNITROSAMINA E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA COX-2
ASSOCIADA À LESÃO TÉRMICA: MODELO EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Professor Orientador: Cleber Dario Pinto Kruel
Professor Orientador: Luis Felipe Ribeiro Pinto

Porto Alegre

2005

*À minha mulher Sandra, pela paciência e suporte.
Ao meu pai Rui e madrasta Arlete, pela base e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Cleber Dario Pinto Krueel, pela confiança, paciência e orientações fundamentais para a conclusão deste projeto.

Ao Professor Doutor Luis Felipe Ribeiro Pinto, pelo apoio e compartilhamento de seu vasto conhecimento em uma área tão fascinante quanto complexa.

Ao meu colega de mestrado e, agora, Mestre, Miguel Angelo Martins de Castro Junior, que, com seu dinamismo e parceria, acelerou a conclusão do projeto.

À Professora Doutora Maria Isabel Edelweiss, pela colaboração valiosa.

Aos mestrandos e doutorandos do Laboratório de Toxicologia e Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), especialmente, ao Davy, pelo convívio breve, porém muito proveitoso.

À Professora Doutora Roseli de Oliveira Mollerke, médica veterinária, responsável pela Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que sempre se demonstrou disponível às solicitações do experimento.

Aos funcionários da Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), especialmente, nas figuras do Marcos e Eduardo, pelo zelo e competência no cuidado com o animais e solicitude nos experimentos.

Ao Grupo de Pós-Graduação e Pesquisa (GPPG) do HCPA, pelo suporte técnico e estatístico.

Ao meu amigo e colega William Dalpra, por sua disposição em ouvir e por seus comentários pertinentes e encorajadores.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	6
REVISÃO DA LITERATURA	7
1 REVISÃO DA LITERATURA	8
1.1 CÂNCER DE ESÔFAGO	8
1.1.1 Epidemiologia	8
1.1.2 Etiologia e Fatores de Risco.....	10
1.1.3 Quadro Clínico e Diagnóstico.....	12
1.1.4 Estadiamento e Prognóstico.....	13
1.1.5 Tratamento cirúrgico	15
1.1.6 Tratamento multidisciplinar e CEE	16
1.2 QUIMIOPREVENÇÃO	19
1.2.1 Quimioprevenção: Conceito e perspectivas	19
1.2.2 Evidências epidemiológicas.....	21
1.2.3 Mecanismos de ação: carcinogênese	22
1.3 CARCINOGENESE ESOFÁGICA: FUNDAMENTOS	24
1.3.1 O Ciclo Celular	24
1.3.2 Sinalização celular	26
1.3.3 Apoptose	27
1.3.4 Oncogenes e genes supressores tumorais.....	28
1.3.5 Alterações moleculares no CEE	30
1.3.6 Eicosanóides	32
1.3.7 COX-2 e carcinogênese	35
1.3.8 COX-2 e câncer de esôfago	38
1.4 CARCINOGENESE EXPERIMENTAL EM CEE.....	40
1.4.1 Nitrosaminas	40
1.4.2 Citocromo P450	41
1.4.3 Lesão térmica e câncer de esôfago	43
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA	45

ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	57
RESUMO.....	58
INTRODUÇÃO.....	59
MATERIAL E MÉTODOS.....	62
RESULTADOS.....	78
DISCUSSÃO.....	85
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	92
REFERÊNCIAS.....	92
ARTIGO EM INGLÊS.....	97
ABSTRACT.....	98
INTRODUCTION.....	99
METHODS.....	101
MATERIALS.....	102
RESULTS.....	104
DISCUSSION.....	110
CONCLUSION.....	116
REFERENCES.....	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Incidência bruta mundial de Câncer de Esôfago (homens), em casos por 100 mil....	9
Figura 2 - Taxas brutas de incidência de neoplasia maligna de esôfago por 100 mil (homens) estimadas para 2003	10
Figura 3 - Fatores de risco para câncer de esôfago.....	12
Figura 4 - Sistema de estadiamento <i>tumor-node-metastasis</i> (TNM) para carcinoma de esôfago.....	15
Figura 5 - Modelo do processo carcinogênico em múltiplos estágios.....	24
Figura 6 - O ciclo celular. Os tempos são relativos.....	25
Figura 7 - Alterações moleculares no CEE	32
Figura 8 - Principais rotas de formação de prostanóides.....	34
Figura 9 - Mecanismo de ação dos AINES. O AINE, em amarelo, impede a acoplação do ácido araquidônico para primeira reação. A membrana do reticulo endoplasmático está representada em azul.	37

Revisão da Literatura

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 CÂNCER DE ESÔFAGO

1.1.1 Epidemiologia

Tomado em escala mundial, o câncer de esôfago ocupa a oitava posição como neoplasia maligna mais freqüente, apresentando distribuição geográfica variável (1). No litoral Cáspio do Irã, nas províncias do norte da China (o “cinturão asiático”, incluindo, Japão e Índia) e em Transkei, na África do Sul, encontram-se as mais altas incidências, superando os 100 casos por 100 mil habitantes/ano (2,3,4,5). Em Linxian, província de Henan, China, o câncer de esôfago é considerado endêmico (Figura 1) (2). Analisando-se os dois tipos histológicos predominantes - o carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) e o adenocarcinoma (ADE) – notam-se incidências diferenciadas, não apenas entre regiões, mas também entre etnias de uma mesma área (1,2). Nos países em desenvolvimento, o CEE ainda é o tipo histológico predominante em 93% dos casos (5). Nos últimos anos, entretanto, houve um aumento da incidência de adenocarcinoma nos países ocidentais desenvolvidos, passando este a ser o tipo histológico mais freqüente nestes locais (2). Nos EUA, há aproximadamente 30 anos, o ADE representava em torno 15% das neoplasias de esôfago, porém, entre 1976 e 1990, a incidência aumentou em mais de 350%, um incremento de 10% ao ano, o mais rápido de todos os tipos de câncer (6). Atualmente, é encontrado em mais de 50% dos casos, acontecendo o mesmo em outros países industrializados como o Reino Unido, Escandinávia, França, Suíça, Austrália e Nova Zelândia (6).

Com relação à etnia, nos EUA, os afro-descendentes apresentam proporção de 6:1 para o CEE em relação aos caucasianos, relação quase invertida quando se trata do adenocarcinoma (4:1). Esta neoplasia é mais freqüente entre os 50 e 70 anos de idade, com predomínio no sexo masculino na razão de 3:1 (2,3,4)

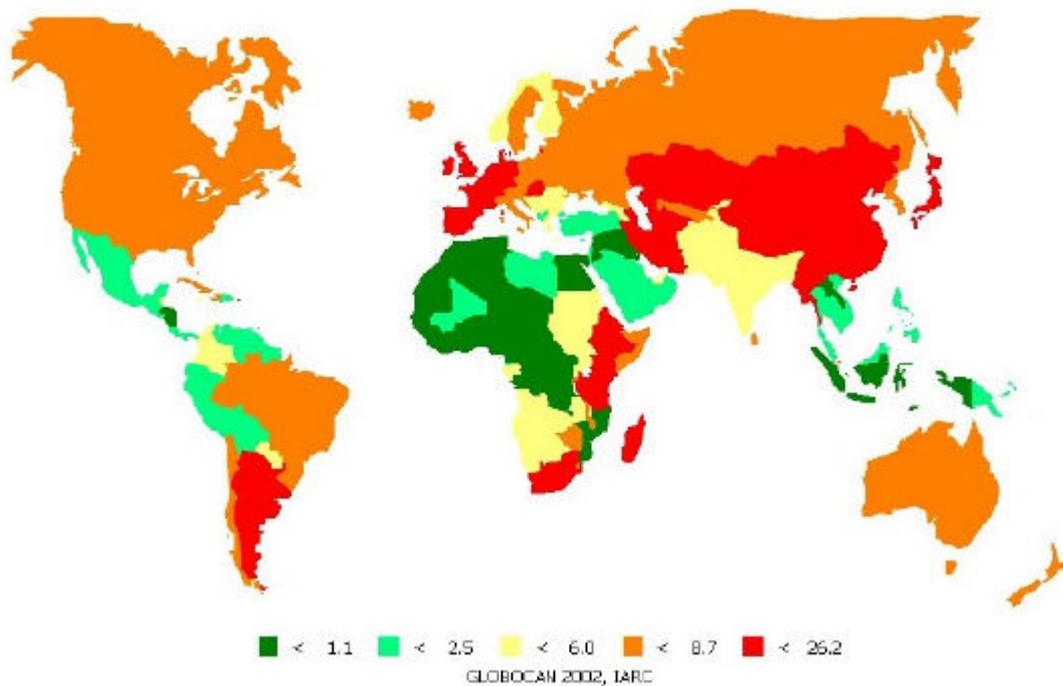


Figura 1 - Incidência bruta mundial de Câncer de Esôfago (homens), em casos por 100 mil

Fonte: Globocan (2002, IARC)

No Brasil, as neoplasias são a segunda causa de morte, seguindo as doenças do aparelho circulatório. Dentre as neoplasias, o carcinoma de esôfago foi a sexta causa de óbitos por câncer em 2000, atrás das neoplasias de pulmão, estômago, mama, cólon e próstata (7). A maior incidência está na região Sul, com 17,86 casos por 100 mil habitantes, aproximadamente, 76% maior que a nacional, de 10,14 casos por 100 mil (Figura 2). Nesta região, o Rio Grande do Sul é o estado de maior incidência com 22,32 casos por 100 mil habitantes/ano – considerada uma zona de incidência média – e taxa de mortalidade estimada

de 16,21 mortes/100 mil habitantes em 2003, a segunda causa de morte por câncer em homens no estado (7,8,9).

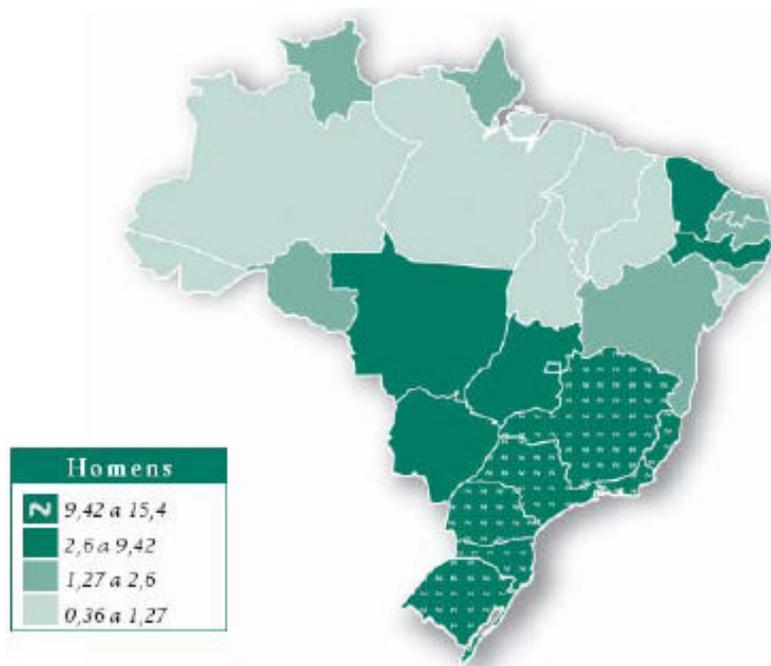


Figura 2 - Taxas brutas de incidência de neoplasia maligna de esôfago por 100 mil (homens) estimadas para 2003
Fonte: Ministério da Saúde (7)

1.1.2 Etiologia e Fatores de Risco

Vários fatores nutricionais e carcinógenos potenciais estão associados à etiologia do CEE: álcool, tabaco, zinco, nitrosaminas, micotoxinas, desnutrição e deficiências vitamínicas (Figura 3). Outros fatores de risco incluem as cáries e higiene oral precária, cirurgia gástrica prévia e ingestão crônica de bebidas e alimentos quentes (3, 4, 10). No Rio Grande do Sul, o hábito de consumir o mate (uma infusão da erva *Ilex paraguayensis*) em altas temperaturas (aproximadamente 70°C) configura-se como um co-fator de risco para o CEE neste estado (11). Na supracitada província chinesa de Linxian, a alta incidência de CEE está diretamente relacionada as nitrosaminas e inversamente relacionada ao consumo de roboflavina, ácido nicotínico, magnésio e zinco (6). No ocidente, no entanto, o álcool e o tabaco são os

principais fatores de risco para o CEE, atuando de forma sinérgica (6). O efeito do álcool associado ao tabaco é multiplicativo, sendo que o risco relativo para tabagistas severos é de 10 vezes em relação aos não-tabagistas, diminuindo consideravelmente após dez anos de cessação do consumo; no ADE, o efeito é aditivo, com risco relativo 2 a 3 vezes maior, mantendo-se alto até 30 anos após a cessação do hábito de fumar (6).

A acalásia é considerada uma doença esofágica que predispõe a degeneração neoplásica, associada a um aumento da incidência de carcinoma do tipo epidermóide, sendo endêmica no centro-oeste brasileiro. Caracteriza-se por aumento da pressão basal do esfíncter esofágico inferior, relaxamento incompleto deste à deglutição e aperistalse no corpo do esôfago. Acredita-se que a estase prolongada de resíduos alimentares, acompanhada de esofagite, seja o fator determinante no aparecimento de câncer nestes pacientes (12,13). Afiguram-se ainda como fatores de risco a esofagite actínica (pós-irradiação para tratamento de neoplasia como câncer de mama e linfomas), queimaduras cáusticas, Síndrome de Plummer-Vinson, leucoplaquia, tilose (única síndrome familiar reconhecida como predisponente ao CEE), divertículo esofágico (pelo mesmo mecanismo da acalásia) e mucosa gástrica ectópica (4, 14).

A doença do refluxo gastro-esofágico (DRGE) é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento do esôfago de Barrett (EB), e este para o adenocarcinoma de esôfago (6). O EB é uma condição clínico-patológica na qual o epitélio pavimentoso estratificado não-queratinizado do esôfago distal é substituído por um epitélio colunar metaplásico, caracterizado pela presença de células calciformes (5). Nos EUA, a DRGE acomete até 40% da população, mas apenas 10% desta desenvolve esôfago de Barrett (2). Sintomas recorrentes de refluxo estão associados a um risco 7,7 vezes maior para o ADE, sendo que maior frequência, intensidade e duração aumentam o risco para até 43,5 vezes (2). Fatores de risco

específicos para a progressão do EB ao ADE incluem: hérnia hiatal de pelo menos 3 cm de extensão, extensão do EB e a presença de displasia. Ainda, uma exposição aumentada aos ácidos biliares (refluxo alcalino) pode exacerbar a lesão na mucosa esofágica e promover o processo neoplásico (2). Vários estudos têm correlacionado obesidade ao risco aumentado de ADE e diminuído de CEE. O mecanismo seria por aumento da pressão intra-abdominal promovendo a DRGE. Por outro lado, há estudos mostrando menos risco para câncer de esôfago pela presença de *Helicobacter pylori*, mas risco aumentado para câncer gástrico. O *H.pylori* protegeria para ADE porque promove acloridria, com menos produção ácida e refluxo (2).

<i>Consumo de:</i>	Condições predisponentes
Tabaco	Tilose
Álcool	Lesão Cáustica
<i>Consumo deficiente de:</i>	Acalasia
Frutas	Esôfago de Barrett
Carne fresca	Divertículo esofágico
Riboflavina	<i>Outras exposições:</i>
Beta-caroteno	Asbesto
Vitamina C e A	Radiação ionizante
Magnésio	Bebidas Quentes
Vegetais	Localização: Oriente Médio,
Peixe fresco	África do Sul, norte da China,
Niacina	sul da Rússia, Índia
Vitaminas do complexo B	
Zinco	

Figura 3 - Fatores de risco para câncer de esôfago

Fonte: Adaptado de Orringer (4)

1.1.3 Quadro Clínico e Diagnóstico

O quadro clínico mais frequentemente associado ao carcinoma de esôfago caracteriza-se por disfagia progressiva e perda de peso (2). Sinais e sintomas tardios, sugestivos de irrissecabilidade, são: rouquidão (envolvimento do nervo laríngeo recorrente esquerdo), dor abdominal (envolvimento de linfonodos do tronco celíaco e/ou carcinomatose peritoneal), dor

nas costas e dor óssea persistente, soluços e afecções respiratórias, como tosse e pneumonia aspirativa (sugestivos de fístula esôfago-brônquica) (3, 15). Devido à elasticidade da parede esofágica, pelo menos 75% da circunferência do órgão deve estar envolvida pela neoplasia antes de surgir a sensação de dificuldade de deglutir.

O diagnóstico é sugerido por um exame contrastado do esôfago (Rx do Esôfago Estômago e Duodeno - REED) e confirmado por esofagoscopia com biópsia ou citologia (3,15). A acurácia da citologia por escovado esofágico, isoladamente, está entre 85 e 97% e da biópsia entre 83 e 90% (4). O escovado deve ser obtido antes da biópsia, sendo que a combinação de ambos os métodos atinge 99% de acurácia diagnóstica (2). Se ainda assim uma lesão estenótica mantém-se sem diagnóstico, a biópsia por aspiração com agulha fina orientada por eco-endoscopia está indicada (4). Programas de *screening* em massa utilizando REED, endoscopia e citologia esfoliativa não apresentam boa relação custo/benefício em países ocidentais, onde a incidência relativa é baixa (4). Situação diferente é observada em países como China e Japão, com regiões de alta incidência (vide Figura 1).

1.1.4 Estadiamento e Prognóstico

Uma vez confirmado o diagnóstico histopatológico, o estadiamento prossegue a partir dos dados levantados na anamnese/exame físico iniciais e testes laboratoriais, além de uma radiografia do tórax (2). Especial atenção deve ser dada a existência de linfonodos cervicais supraclaviculares. Qualquer linfonodo suspeito deve ser puncionado com agulha fina e analisado para excluir doença metastática (2).

No processo de estadiamento clínico, são utilizadas as tomografias computadorizadas (TC) de mediastino e abdômen (ou ecografia abdominal), a eco-endoscopia, a fibrobroncoscopia, e, por vezes, laparoscopia ou laparotomia. Recentemente, a tomografia por emissão de pósitrons (*PET scan*) com fluorodeoxiglicose vem sendo utilizada, apresentando maior acurácia que a tomografia convencional em detectar metástases a distância (86% contra 62%) (2).

O sistema de estadiamento mais utilizado é o *Tumor-Node-Metastasis* (TNM) do *American Joint Committee on Cancer*. É, em essência, um sistema de estadiamento patológico baseado no exame da peça cirúrgica, onde o grau de invasão tumoral é considerado (Figura 4) (4).

O carcinoma de esôfago é notório por seu comportamento biológico agressivo, infiltrando-se localmente e envolvendo linfonodos adjacentes, além de apresentar disseminação hematogênica importante. A falta de uma camada serosa no esôfago tende a favorecer a progressão local. Tumores do terço superior e médio tendem a envolver a árvore traqueobrônquica, a aorta e o nervo laríngeo recorrente esquerdo, enquanto tumores do terço inferior podem invadir o diafragma, o pericárdio e o estômago. A drenagem linfática mediastinal extensa, que se comunica com a cadeia cervical e abdominal, é a responsável pelas metástases mediastinais, supraclaviculares e celíacas, presentes em 75% dos pacientes ao diagnóstico. Metástases hepáticas e pulmonares são freqüentes, sendo bastante desanimador o prognóstico para o tumor invasivo: sobrevivida geral em 5 anos para tumores tratados, de 5 a 12% para o carcinoma epidermóide e 0 a 7% para o adenocarcinoma, dependendo da série (4).

DEFINIÇÃO DO TNM	
TUMOR PRIMÁRIO (T)	
Tx	Tumor primário não pode ser acessado (citologia positiva porém sem evidência endoscópica ou radiológica)
T0	Sem evidência do tumor primário (após tratamento com quimio-radioterapia)
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor invade lamina própria ou submucosa, mas não atravessa
T2	Tumor invade muscular própria
T3	Tumor invade adventícia
T4	Tumor invade estruturas adjacentes (aorta, árvore traqueobrônquica, corpos vertebrais, pericárdio)
LINFONODOS REGIONAIS (N)	
Nx	Linfonodos regionais não podem ser acessados
N0	Sem metástases linfonodais
N1	Metástases em linfonodos regionais
METÁSTASES A DISTÂNCIA(M)	
Mx	Presença de metástases distantes não podem ser acessadas
M0	Sem metástases a distância
M1	metástases a distância

ESTADIAMENTO			
ESTÁGIO 0	Tis	N0	M0
ESTÁGIO I	T1	N0	M0
ESTÁGIO IIA	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
ESTÁGIO IIB	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
ESTÁGIO III	T3	N1	M0
	T4	qualquer N	M0
ESTÁGIO IV	qualquer T	qualquer N	M1

Figura 4 - Sistema de estadiamento tumor-node-metastasis (TNM) para carcinoma de esôfago

Fonte: Adaptado de Sabiston (4)

1.1.5 Tratamento cirúrgico

A esofagectomia mantém-se como o tratamento padrão para tumores confinados ao esôfago e região para-esofágica (2,14,16). Este procedimento foi concebido pela primeira vez por Billroth, em 1871, mas foi Czerny, em 1877, que realizou a primeira ressecção de um tumor de esôfago cervical com sucesso em uma pessoa (17). Atualmente, as duas abordagens mais utilizadas para a ressecção curativa são a esofagectomia transtorácica e a transhiatal (2,14), sendo esta última a mais empregada nos países ocidentais (2). Existe controvérsia se a ressecção em bloco com dissecação linfonodal estendida confere alguma vantagem no

tratamento curativo e sobrevida (2), o que influencia na abordagem cirúrgica. As vantagens da abordagem transtorácica incluem: melhor visualização, acesso e ressecção de doença mediastinal dos dois terços superiores do esôfago, além de evitar dissecação às cegas de tumores dos terços superiores (2,4). A taxa de ressecabilidade está entre 60 e 90%, mortalidade pós-operatória entre 1,4 a 23% e a sobrevida geral em 5 anos de 10 a 25% (2,18). As vantagens da esofagectomia transhiatal incluem: menos agressão cirúrgica, por não realizar toracotomia; menor morbidade relacionada a deiscência de anastomose intratorácica, visto que a anastomose cervical é mais facilmente controlada, raramente, sendo causa de mediastinite; ausência de suturas intra-abdominais e intratorácicas (4,19). A mortalidade operatória varia de 1 a 4% e a taxa de sobrevida geral em 5 anos de 20 a 25% (2).

Apesar de argumentos válidos favorecendo uma ou outra abordagem, dois ensaios clínicos randomizados e uma meta-análise concluíram que não existe diferença significativa entre esofagectomia transhiatal e transtorácica com relação à morbidade, mortalidade operatória e sobrevida em 5 anos (2,20).

1.1.6 Tratamento multidisciplinar e CEE

O CEE é uma doença agressiva, ainda com um prognóstico reservado, apesar dos avanços técnicos alcançados na sua abordagem cirúrgica. Isto se deve, em parte, à sua evolução inicial insidiosa, pelo que a maioria dos pacientes apresenta doença avançada no momento do diagnóstico (18). Mesmo em pacientes com tumores potencialmente ressecáveis o tratamento cirúrgico isolado tem índices de sucesso limitado (21). O tratamento ideal, tanto para pacientes com tumores ressecáveis e potencialmente curáveis quanto para aqueles com tumores localmente avançados, continua em aberto (16). A ressecção cirúrgica continua

sendo, porém, a principal modalidade terapêutica para CEE não-metastático. Independente do estágio, o paciente é beneficiado pela cirurgia apenas se a ressecção macro e microscópica for completa, ressecção esta denominada R0 (16). Em um estudo com 500 pacientes submetidos à esofagectomia transtorácica, aqueles com ressecção R0 apresentaram sobrevida, em 5 anos, de 29%, contrastando com aqueles com doença microscópica (R1) ou macroscópica (R2) residual, com 0% de sobrevida (22). Steiz e col. recomendam o tratamento cirúrgico para os pacientes com estágios I e II (TNM – T1 ou T2 qualquer N), ou seja, doença localizada, e também como opção para tumores que se estendem além da parede esofágica (T3) ou envolvendo linfonodos (N1) (localmente avançado) (23). Não o recomendam, porém, para tumores envolvendo órgãos mediastinais (T4) ou metastáticos (M1).

Dada a alta frequência de doença localmente avançada associada à presença de micrometástases, quase sempre existente antes de qualquer tentativa de ressecção, resultando em recidiva local e sistêmica após a esofagectomia, vêm se observando crescente interesse em abordagens multidisciplinares como a quimioterapia neo-adjuvante ou adjuvante, radioterapia ou rádio e quimioterapia combinadas, no intuito de proporcionar novas possibilidades terapêuticas para pacientes com CEE (18). A base teórica para tais abordagens está fundamentada na atividade independente de cada modalidade terapêutica: radioterapia focando a massa tumoral principal, e quimioterapia agindo tanto tumor primário quanto na doença micrometastática. Como a toxicidade de cada método tende a ser diferente, haveria um somatório de suas atividades anti-tumorais sem a adição de seus efeitos tóxicos. Haveria também um efeito sinérgico total maior do que o esperado pela simples adição de efeitos individuais, com a quimioterapia tornando o tumor mais sensível à radioterapia ou vice-versa ou, talvez, ambas possibilidades (24).

O tratamento neo-adjuvante objetiva induzir a diminuição do estágio tumoral, aumentar as taxas de ressecção completa, eliminar as potenciais metástases sistêmicas e fundamentalmente aumentar a sobrevida em longo prazo (16, 25). Na série de Slater e colaboradores (26), 36% dos pacientes submetidos à rádio e quimioterapia neo-adjuvante apresentaram diminuição de estágio e o CEE foi mais responsivo do que o adenocarcinoma (taxa de 57% de resposta para CEE *versus* 31% para adenocarcinoma). Da mesma forma, 43% dos pacientes com CEE tinham resposta completa contra somente 8% daqueles com adenocarcinoma. Assim, é provável que a rádio e quimioterapia neo-adjuvantes diminuam o estágio de alguns pacientes com carcinoma epidermóide ou adenocarcinoma.

A experiência com tratamento neo-adjuvante para pacientes com doença localmente avançada é limitada. Alguns estudos fase II indicam que a rádio e quimioterapia pré-operatórias podem levar a uma marcada diminuição do estágio tumoral em um significativo número de pacientes, permitindo a ressecção completa do tumor. Fink e colaboradores (27), estudando pacientes com doença localmente avançada submetidos a tratamento neo-adjuvante, verificaram que mais de 70% dos pacientes com CEE localmente avançado na carena ou acima tiveram ressecção completa do tumor. O tratamento neo-adjuvante, comparado com a ressecção primária isolada, significou melhora no prognóstico nos pacientes deste estudo. Entretanto, o ganho no prognóstico foi limitado aos pacientes que tinham remissão objetiva do tumor e posterior ressecção completa. Nos outros pacientes, o tratamento neo-adjuvante esteve associado a uma significativa morbi-mortalidade, sem nenhuma melhora no prognóstico.

Apesar do grande número de estudos em fases II e III disponíveis na literatura, avaliando a neoplasia em diferentes estágios, o papel do tratamento neo-adjuvante ainda não está claro. Em conjunto, estes estudos preliminares têm sugerido que o tratamento neo-

adjuvante pode melhorar a sobrevida tanto no carcinoma epidermóide como no adenocarcinoma (16, 23, 28,29).

1.2 QUIMIOPREVENÇÃO

1.2.1 Quimioprevenção: Conceito e perspectivas

Em um esforço para melhorar o prognóstico dos tumores do trato gastro-intestinal (TGI), a quimioprevenção - abordagem farmacológica para suspender ou reverter a carcinogênese (30, 31) - vem sendo intensamente estudada, notadamente no adenocarcinoma de cólon, e, mais recentemente, também no câncer de esôfago.

A validade da quimioprevenção como uma abordagem séria e prática contra o câncer vem sendo consubstanciada por ensaios clínicos, notadamente no campo do câncer de mama (31). O estudo mais definitivo, com o tamoxifen, envolveu mais de 13000 mulheres com risco relativamente alto de desenvolver carcinomas mamários, livres de câncer invasivo detectável quando entraram para o estudo. O tamoxifen reduziu a incidência da neoplasia no grupo tratado em 49% ($p < 0,00001$), e ainda foi efetivo em mulheres com história de carcinoma lobular *in situ* (redução de 56%) ou hiperplasia atípica (86%) (32). Apesar do aumento da incidência de câncer endometrial no grupo tratado, não houve morte relacionada a este, detectado em seu estágio inicial, e a relação custo/benefício foi aceitável.

Por sua vez, ensaios clínicos utilizando o beta-caroteno, substância abundantemente encontrada em frutas e vegetais, falharam em demonstrar qualquer benefício deste na prevenção do câncer em geral, do câncer de pulmão em particular e de doenças cardiovasculares (33). Estes estudos são um exemplo dos resultados obtidos quando se

desenham ensaios clínicos antes de serem observados dados experimentais sobre mecanismos de ação e sua avaliação em modelos animais para embasar a aplicação em seres humanos (31). No caso do beta-caroteno, virtualmente, inexistiam informações de estudos em animais que indicassem propriedades preventivas para qualquer neoplasia. A decisão de utilizar o beta-caroteno foi baseada em estudos epidemiológicos, e, mesmo nestes estudos, não havia evidência direta de que era esta substância, e não outras, igualmente, encontradas em frutas e vegetais, a responsável por possíveis benefícios (31).

Do exposto, conclui-se que os estudos epidemiológicos, apesar de constituírem um importante ponto de partida observacional, não são base suficiente para a escolha de um novo agente a ser estudado em ensaios clínicos de quimioprevenção (31). Um conhecimento adequado dos mecanismos de ação em todos os níveis – molecular, celular, tissular e orgânico - e desenhos experimentais em modelos animais são passos fundamentais e necessários antes dos estudos em humanos.

Partindo destas premissas, novos agentes estão em fase de intensos estudos, entre eles, os inibidores seletivos da ciclooxigenase-2 (COX-2). A relação desta enzima com a quimioprevenção e sua aplicação no CEE estão ligadas ao crescente interesse na aspirina e em outros antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) para a prevenção do câncer colo-retal. Isso se deve à convergência dos dados de estudos epidemiológicos demonstrando os efeitos da aspirina e dos AINEs na redução do risco desta, estudos em ciências básicas, implicando a COX-2 na carcinogênese colo-retal e de outras neoplasias (entre estas, a de esôfago), e ensaios clínicos com o uso de AINEs em pacientes com polipose adenomatosa familiar (PAF) (31).

1.2.2 Evidências epidemiológicas

Kune e col. foram os primeiros a observar que o uso regular de aspirina ou AINEs estava associado a um risco reduzido de desenvolver adenocarcinoma colo-retal (34). Este estudo de caso-controle com base populacional realizou pareamento de 715 pacientes com diagnóstico de câncer colo-retal em 727 controles estratificados por sexo e idade. Utilizando-se de regressão logística, o risco relativo (RR) encontrado para o desenvolvimento de câncer de cólon foi de 0,53 para usuários de aspirina e 0,77 para usuários de outros AINEs ($P < 0,001$ e $P = 0,06$, respectivamente) (35). Outros estudos epidemiológicos que se seguiram também observaram a associação do uso regular de aspirina/AINEs com a redução da incidência de mortes por câncer colo-retal e de pólipos adenomatosos, comparados a não-usuários (36). Tomados em conjunto a redução de risco está entre 30 e 50%.

Corley et al. realizaram uma revisão sistemática e meta-análise de estudos observacionais que avaliaram a associação entre o uso de aspirina/AINE e câncer de esôfago (37). No total, foram avaliados 9 estudos que, em conjunto, totalizaram 1.813 casos de câncer de esôfago. Em ambos os tipos histológicos mais comuns, pacientes com qualquer exposição tanto a aspirina quanto a AINEs apresentaram uma redução de 43% de chance de desenvolver câncer de esôfago (Razão de Chances [RC] 0,57; intervalo de confiança [IC] de 95%, 0,47-0,71; teste para homogeneidade, $P = 0,38$). Tomando-se como base a dose, o uso freqüente de aspirina/AINE foi associado com uma redução de 46% de chance de desenvolver câncer (RC=0,54; IC 0,43-0,67; homogeneidade, $P = 0,13$), contrastando com o uso intermitente, de 18% (RC=0,82; IC 0,67-0,99; homogeneidade, $P = 0,43$). Não houve diferença de proteção quando avaliados os tipos histológicos isoladamente (possível em 4 estudos), e a aspirina apresentou fator de proteção maior que os outros AINEs quando estudados separadamente (50% *versus* 25%, respectivamente).

Apesar dos resultados animadores observados, os autores destes trabalhos ressaltam as limitações de análises baseadas em estudos observacionais, inerentes ao modelo, o que torna impossível a determinação definitiva de uma associação causal, fazendo-se imprescindível outra linha de pesquisa voltada aos mecanismos de ação e à experimentação em modelos animais.

1.2.3 Mecanismos de ação: carcinogênese

Nos últimos 25 anos, um grande esforço no combate ao câncer foi empreendido, e - ainda que a mortalidade relacionada a várias neoplasias malignas não tenha sofrido impacto significativo - observou-se um imenso aumento no conhecimento dos mecanismos pelos quais células e tecidos normais transformam-se em células neoplásicas (30). A partir deste conhecimento, o câncer passou a ser considerado como o estágio final de um processo patológico crônico, caracterizado por uma diferenciação celular e tecidual anormal (31). Este processo, que eventualmente leva ao câncer invasivo e metastático, denomina-se carcinogênese.

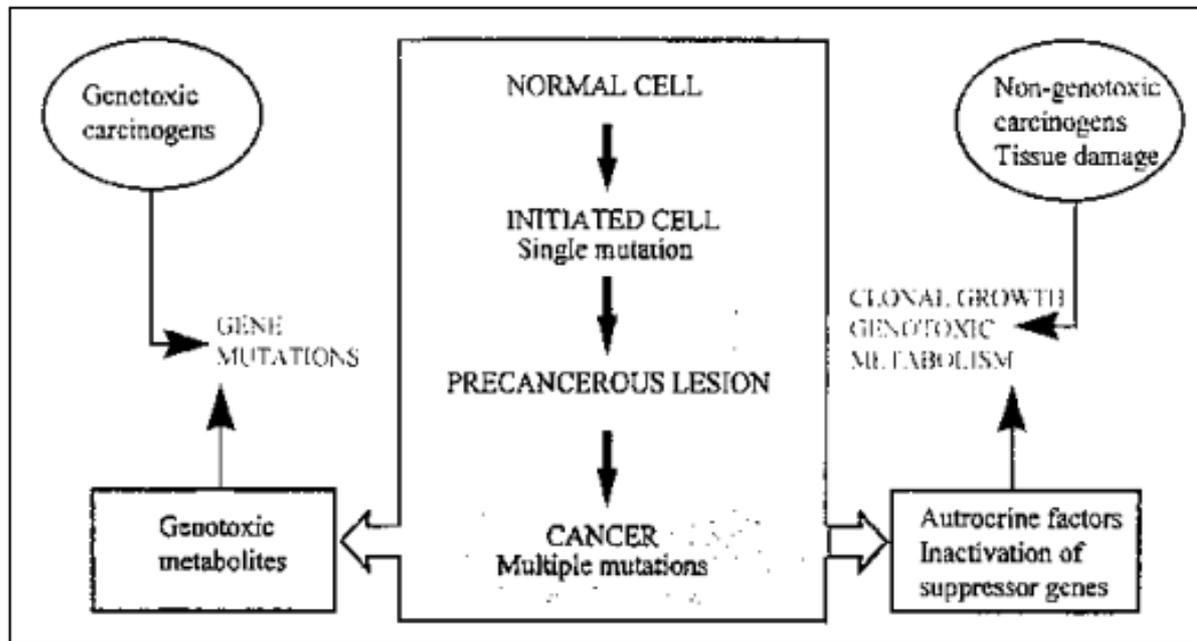
O desenvolvimento de um tumor maligno envolve complexas interações entre agentes exógenos (ambientais) e endógenos (genéticos, hormonais, imunológicos). Conforme observações clínicas e em modelos experimentais, a carcinogênese processa-se em etapas, muitas vezes, superpostas, começando com uma única mutação em um proto-oncogene, ou em um gene supressor tumoral, em uma única célula (38). A este primeiro evento mutagênico denomina-se iniciação. A célula iniciada pode permanecer indetectável por longos períodos, a menos que passe por um processo de seleção e expansão clonal, ao que se denomina promoção tumoral. A promoção tumoral requer uma constante perturbação da homeostasia

celular, dando às células iniciadas vantagens seletivas, visto que respondem mais facilmente a estímulos mitóticos e/ou menos a estímulos antimitóticos e à sinalização citotóxica das células vizinhas normais. A expansão clonal das células iniciadas possibilita alterações genéticas adicionais. Estes danos genéticos acumulados correlacionam-se com mudanças morfológicas, levando a lesões pré-neoplásicas, pré-malignas e malignas, processo denominado progressão tumoral. Durante este processo, o desenvolvimento de uma instabilidade genômica desempenha um papel importante, aumentando a frequência de mutações (Figura 5).

Em modelos experimentais, cada uma destas etapas pode ser induzida por agentes ambientais - a iniciação e a progressão por carcinógenos genotóxicos, e a promoção por carcinógenos não-genotóxicos (38). Os carcinógenos genotóxicos ligam-se covalentemente ao DNA, causando substituições de bases, deleções ou adições e quebra da cadeia: são, portanto, mutagênicos (30). Os carcinógenos não-genotóxicos aceleram o processo tumorigênico por mecanismos complexos que normalmente envolvem o estímulo e a proliferação celular.

Alterações epigenéticas (não-mutagênicas) também contribuem para a carcinogênese através da alteração da expressão do gene e diferenciação celular, e não da seqüência de bases nucleotídicas, sendo a metilação do DNA um dos mecanismos mais observados (39).

É interessante ressaltar, ainda, que a promoção tumoral primeiramente leva a tumores benignos. Entretanto, uma porcentagem destas lesões irá progredir inevitavelmente para tumores malignos, mesmo na ausência de estímulo genotóxico adicional devido à ativação endógena de rotas metabólicas deletérias (etapa da progressão) (38).



Nota: Explicação no texto

Figura 5 - Modelo do processo carcinogênico em múltiplos estágios

1.3 CARCINOGENESE ESOFÁGICA: FUNDAMENTOS

1.3.1 O Ciclo Celular

O ciclo de divisão celular é o modo fundamental pelo qual os organismos se propagam e pelo qual a homeostasia do tecido normal se mantém (40). Compreende uma seqüência complexa de eventos que garante a transmissão correta, para as células filhas, de uma cópia completa do genoma (41). Tradicionalmente, é dividido em quatro fases, detalhadas a seguir.

Na fase S (Síntese), ocorre a replicação do DNA, enquanto a divisão nuclear e celular ocorre na fase M (Mitose). No intervalo desta, estão as fases G1 e G2 (G de *gap*). Na fase G1, ocorre síntese de RNA e proteína; e, na fase G2, a célula sintetiza proteínas importantes para reorganização de sua cromatina e para a mitose. Além destas fases, muitas células adultas mantêm-se em um estágio quiescente chamado G0, permanecendo metabolicamente ativas. A progressão de uma fase para outra é controlada pela ativação e inativação seqüencial de uma

família de proteínas reguladoras altamente conservadas: as quinases dependentes de ciclinas (CDK, *cyclin-dependent kinases*). A ativação das CDK depende da ligação com outra proteína reguladora, a ciclina. O princípio básico de regulação do ciclo é a cascata de fosforilação/desfosforilação, síntese, degradação e controle por proteínas inibidoras (CKI, *CDK inhibitory proteins*) destas proteínas-chave. Estas proteínas controlam uma seqüência precisa de eventos e formam uma rede intra e extracelular complexa, que coordena não apenas a proliferação, mas também a quiescência, a diferenciação e a morte celular (41).

Existem dois pontos chaves de checagem na progressão do ciclo celular de células em proliferação: o G1/S e o G2/M. A progressão através do início até o meio de G1 é dependente das CDK4 e 6, associadas as ciclinas da classe D: D1, D2 ou D3. Da fase G1 tardia até a fase S é necessária a ativação seqüencial da CDK2 pela ciclina E e pela ciclina A, respectivamente. A ativação subsequente da CDK1 pela ciclina B é fundamental para a transição da fase G2 para fase M (Figura 6).

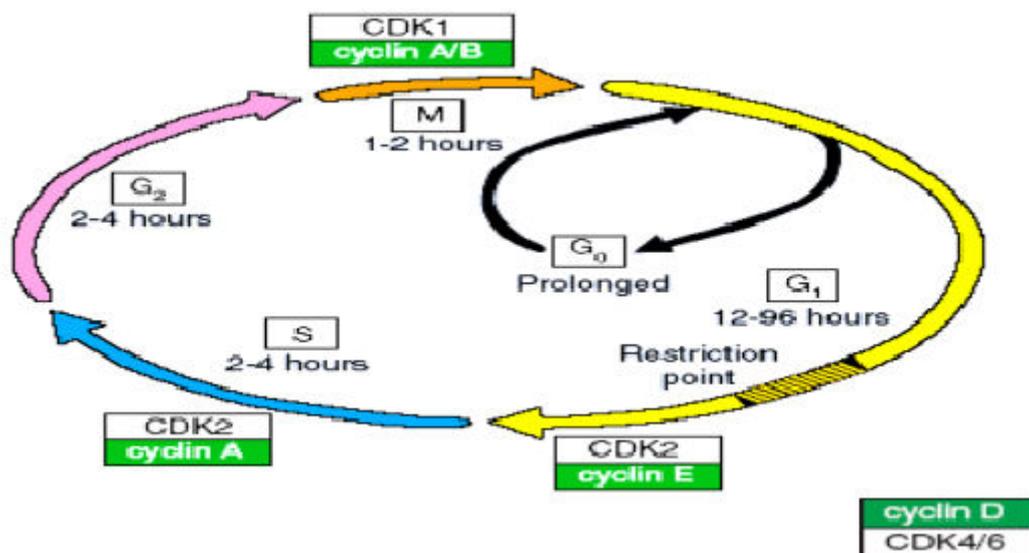


Figura 6 - O ciclo celular. Os tempos são relativos

Fonte: Israels (42).

Existem duas famílias de CKIs: a CIP/KIP e a INK4 (40, 41,42). As quatro proteínas INK conhecidas (p15INK4B, p16INK4A, p18INK4C e p19INK4D) ligam-se e inibem seletivamente as CDK4 e CDK6. Os três membros da família CIP/KIP (p21CIP1, p27KIP1 e p57KIP2) interagem com todos os complexos CDK-ciclinas conhecidos, e são consideradas CKIs universais.

1.3.2 Sinalização celular

As bilhões de células do organismo comunicam-se entre si através de várias moléculas sinalizadoras, incluindo proteínas, oligopeptídios, aminoácidos, nucleotídeos, esteróides, derivados de ácidos graxos e até moléculas gasosas, como óxido nítrico e monóxido de carbono (40). Uma vez sintetizadas e liberadas pela célula, as moléculas sinalizadoras agem de forma autócrina, parácrina ou endócrina (40). As informações trocadas modulam funções que vão desde a manutenção de seu contato com as células vizinhas até respostas celulares mais complexas, como proliferação, apoptose e diferenciação (43). As moléculas sinalizadoras, também chamadas de ligantes, ligam-se a proteínas específicas, os receptores, expressos na membrana plasmática ou no citoplasma das células alvo. A interação ligante-receptor provoca alterações conformacionais no receptor, conduzindo o sinal gerado pela molécula sinalizadora através da membrana celular. Este sinal é propagado pelo citoplasma até o núcleo, geralmente, com a participação dos chamados segundos mensageiros (Cálcio iônico, AMP cíclico, inositol-1-4-5-trifosfato, dicilglicerol), onde, por intermédio de proteínas efetoras (proteínas quinase e fosfatases), promove alteração na resposta celular (43).

Na carcinogênese, as mutações nos oncogenes frequentemente envolvem genes que codificam fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento e proteínas de

sinalização intracelular. Quando os componentes desta cascata de sinalização estão mutados, o sinal que antes era transitório e regulado, torna-se constante, gerando um fenótipo aberrante.

1.3.3 Apoptose

A apoptose é um mecanismo geneticamente programado, cujas células são fisiologicamente eliminadas ao atingirem o fim de seu ciclo vital ou sofrerem danos no seu DNA, não passíveis de reparo (40).

Muitos estímulos podem ativar o processo apoptótico, em especial, o dano ao genoma. Proteínas com função de sensores da homeostasia celular, ligados à cascata apoptótica, reconhecem estes estímulos. Entre estes sensores, encontram-se receptores de membrana citoplasmática, que necessitam de ligantes, e proteínas intracelulares que detectam um meio desfavorável à sobrevivência ou um dano irreparável. Exemplos do primeiro tipo são os receptores FasR e TNF-R1 (tumor necrosis factor receptor). O exemplo mais importante dos sensores intracelulares é a proteína p53. Cada um destes caminhos converge para um mecanismo comum efetor da apoptose, representado pela cascata das caspases.

As caspases, ou cystein aspartate proteases, são enzimas proteolíticas sintetizadas como pró-enzimas inativas, altamente preservadas filogeneticamente, que, uma vez ativadas, clivam seus substratos protéicos após resíduos de ácido aspártico levando à morte celular por apoptose. Existem 14 caspases conhecidas, cada qual com funções que podem sobrepor-se às outras. O efeito geral da ativação das caspases é a suspensão do ciclo celular, desabilitação dos mecanismos de reparo e homeostáticos, início da separação das células de suas estruturas

adjacentes, desmonte de seus componentes estruturais e marcação da célula para ser fagocitada por células vizinhas ou macrófagos (40,44).

Nas células tumorais, os mecanismos antiapoptóticos encontram-se freqüentemente ativados, permitindo a progressão tumoral (44). O mecanismo mais comumente encontrado nestas células é o aumento no nível de expressão dos genes da família BCL-2, que codificam proteínas antiapoptóticas (BCL-2, BCL-xL, MCL-1 e BCL-W). Contribui também a inibição da expressão dos genes que codificam proteínas pró-apoptóticas (BAX, BAK, BID, BIM)(40). Portanto, o equilíbrio de expressão entre as proteínas pró e antiapoptóticas determina ativação ou inibição deste mecanismo (40).

1.3.4 Oncogenes e genes supressores tumorais

Os oncogenes são formas alteradas dos proto-oncogenes, genes envolvidos no controle da proliferação celular, que podem diferir tanto na estrutura quanto na função da proteína codificada pelo seu homólogo normal e que estão envolvidos no processo de transformação maligna (45). A mutação de um único alelo de um proto-oncogene é suficiente para iniciar a proliferação celular (40). Já foram identificados mais de 100 genes deste grupo, e podem ser subdivididos em outros grupos baseando-se nas propriedades funcionais dos seus produtos protéicos: fatores de crescimento celular (ex. platelet-derived growth factor beta - PDGF β); receptores tirosina-quinase (ex. ERBB-1, ERBB-2); proteínas transdutoras de sinal (ex. superfamília RAS); fatores de transcrição (ex. c-MYC); e proteínas antiapoptóticas (ex. BCL-2).

Os genes supressores tumorais codificam proteínas que, através da regulação dos pontos de restrição, inibem o prosseguimento do ciclo celular caso o DNA esteja danificado. Além desta classe de proteínas, estão inclusas as que estão envolvidas no processo de reparo do DNA e as que promovem a apoptose em resposta às lesões não reparadas do DNA. Em contraste com o mecanismo de ação dos proto-oncogenes, onde as mutações ativadoras são dominantes, as mutações tumorigênicas são recessivas, afetando a função do gene somente quando os dois alelos estão inativados (40,45). Devido ao seu papel chave no controle do ciclo celular e na carcinogênese, os genes RB1 e TP53 e respectivas proteínas são destacados.

O mecanismo através do qual a proteína pRB inibe a progressão do ciclo celular envolve a interação, ou seqüestro, das famílias de proteínas transcricionais E2F (E2F1 a E2F5) e DP. Estas proteínas estão complexadas a zonas promotoras do DNA, responsáveis pela transcrição de outras proteínas importantes ao prosseguimento do ciclo, como a ciclina E, por exemplo. Na sua forma ativa hipofosforilada, o pRB liga-se fortemente às E2F, inibindo sua ação transcripcional, parando o ciclo celular na fase G1. A fosforilação da pRB pelas CDK4/6 dissocia esta proteína das E2F, permitindo a transcrição, continuando inativada até o fim do ciclo.

Já a p53 (proteína do gene TP53) monitora a integridade do genoma. Na presença de DNA danificado, o p53 interrompe o ciclo celular para permitir o reparo. Quando o dano ao genoma excede à capacidade de reparo, o p53 inicia o processo apoptótico induzindo a expressão de enzimas pró-apoptóticas, como a BAX. A importância da p53 nas respostas celulares aos danos no DNA é demonstrada pelo fato de que as mutações no seu gene decodificador TP53 são as alterações genéticas mais comumente encontradas em cânceres humanos (mais de 15 mil identificadas). A inativação da p53 leva a um aumento na proliferação celular, na frequência de mutações e na instabilidade genética, que são

características comuns a células tumorais (45). O mecanismo através do qual o p53 para o ciclo envolve a inibição da fosforilação do pRB, pelo o aumento da expressão da CKI p21, que inibe as CDKs 4,6 e 2 (46). As células que passam por um processo normal de replicação apresentam níveis baixos ou indetectáveis de p53.

1.3.5 Alterações moleculares no CEE

Há alguns anos, o estabelecimento de um modelo genético do câncer colo-retal não-familiar forneceu um parâmetro para o estudo e a elucidação das alterações genéticas de outros tipos de neoplasia. A análise molecular das lesões colônicas histologicamente alteradas nos vários estágios do desenvolvimento tumoral demonstrou um acúmulo paulatino de alterações genéticas, levando à progressão da doença. Entretanto, como esperado, o desenvolvimento do câncer nos diversos órgãos e tecidos se dá por alterações em diferentes grupos de genes ou loci, ainda que algumas características em comum possam ser compartilhadas. Por exemplo, a inativação do gene supressor tumoral TP53 é chave em quase todos os tipos de câncer, enquanto que a amplificação do oncogene N-MYC é uma característica do neuroblastoma (47).

O CEE também se desenvolve através de alterações genéticas graduais e sequenciais, porém, em um grupo diferente de genes. É possível que estas alterações façam paralelo e sejam responsáveis pelas transformações histopatológicas evolutivas do epitélio esofágico, características desta neoplasia (esofagite, atrofia, displasia leve, moderada e severa, carcinoma in situ e carcinoma invasivo).

Algumas das alterações genéticas já identificadas no CEE, independentemente da origem do paciente ou fator etiológico suposto, são: alterações na expressão dos genes supressores tumorais TP53 (por mutação) e RB1, e da proteína reguladora do ciclo celular ciclina D1, com conseqüente perda do controle do ponto de restrição G1/S; alterações em oncogenes com função na transdução de sinais, como o ERBB-1, EGFR e fator de transcrição c-MYC; aumento da COX-2 e iNOS (1,47,48). Estas e algumas outras alterações estão sumarizadas na tabela que segue (Tabela 3).

O acúmulo de p53 pode representar uma reação imediata aos fatores de estresse celular ou aos agentes genotóxicos, sendo funcional, ou ser conseqüência da mutação do TP53, levando a um aumento da concentração de uma proteína disfuncional, etapa inicial para a degeneração neoplásica do epitélio.

Para distinguir entre o aumento funcional e patológico desta proteína, Mandard e col. investigaram a expressão da p53 em peças de esofagectomia de seis pacientes com CEE. Em uma primeira etapa, foi constatado o aumento da expressão da p53, por imunohistoquímica, tanto em células neoplásicas como em células oriundas de epitélio esofágico com esofagite crônica, na mesma peça cirúrgica, mas distantes do foco principal da neoplasia. Em outra etapa, as células fortemente positivas para presença de p53 de ambos os tecidos foram manipuladas sob magnificação e selecionadas para amplificação (PCR) e seqüenciamento (Microarray) do TP53, encontrando-se alterações genéticas em ambos os tipos celulares (de esofagite e de carcinoma *in situ*). Estes achados indicam que a mutação do TP53 já pode estar presente no epitélio não envolvido por carcinoma, com importantes implicações para a prevenção e rastreamento desta neoplasia em populações de risco (47).

Na tilose, doença familiar de herança autossômica dominante, caracterizada por hiperkeratose palmo-plantar, observa-se a perda de heterozigidade na região cromossômica 17q 17q25. 2–25. Nesta doença, 90% dos pacientes apresentarão CEE aos 70 anos de idade. Ainda não se sabe qual o gene ou genes deste locus estaria implicado nesta forma de CEE, e se também estariam envolvidos no CEE esporádico (47).

Perda da heterozigidade 1p, 3p, 5q, 9, 11q, 13q, 17 and 18q
Perda de função de genes supressores tumorais Mutação do TP53 Metilação e/ou perda da p16 Diminuição da expressão da RB
Amplificação g�nica Ciclina D1 EGFR INT-2
Aumento da expressão iNOS COX-2 c-MYC Beta-catenina

Figura 7 - Altera es moleculares no CEE

Fonte: Stoner e Gupta (1)

1.3.6 Eicosanóides

Entre as rotas metabólicas alteradas no curso da carcinogênese, a biossíntese dos eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanes e leucotrienos), a partir do ácido araquidônico, parece desempenhar um papel importante. Um corpo crescente de evidências vem indicando

uma relação causal entre o desenvolvimento de câncer e a superexpressão anormal das enzimas formadoras de eicosanóides (ciclooxigenases 1 e 2, e lipooxigenases), em uma grande variedade de tumores humanos e em animais (49-52). Presentemente, os estudos vêm enfocando a enzima pró-inflamatória ciclooxigenase 2 (COX-2), cuja superexpressão vem sendo relacionada a eventos chaves na promoção tumoral, como a hiper-proliferação celular, a inibição da morte celular programada (apoptose) e a angiogênese tumoral. A COX-2 e demais enzimas formadoras de eicosanóides figuram como um dos mais atrativos alvos para a quimioprevenção do câncer.

Os eicosanóides (do grego eicosa=vinte) podem ser definidos como uma grande família de mediadores lipídicos derivados de membrana, e desempenham um papel chave na carcinogênese (38). A maioria dos eicosanóides deriva do ácido araquidônico (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoíco), um ácido graxo poliinsaturado oriundo da dieta ou da modificação do ácido linoleico e, como a maioria destes compostos, acha-se seqüestrado nas membranas celulares esterificado aos fosfolipídios (38,53). Somente após a liberação dos fosfolipídios, o ácido está disponível como substrato para modificações enzimáticas subseqüentes, o que acontece somente depois de estímulo. Portanto, os eicosanóides são produzidos conforme a demanda e sua disponibilidade está intimamente ligada à atividade das enzimas envolvidas na sua biossíntese. Estas enzimas podem ser classificadas dentro de quatro grupos principais: fosfolipases, responsáveis pela liberação do ácido araquidônico da membrana, após sinalização; prostaglandina endoperóxido sintetases ou ciclooxigenases (COX), que metabolizam o ácido araquidônico em prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanas); lipooxigenases (LOX), que formam os ácidos eicosatetraenoícos hidroxilados (HETEs), leucotrienos e outros; e as mono-oxigenases, controladas pelo citocromo p450, para epoxidação e hidroxilação do ácido araquidônico (Figura 8).

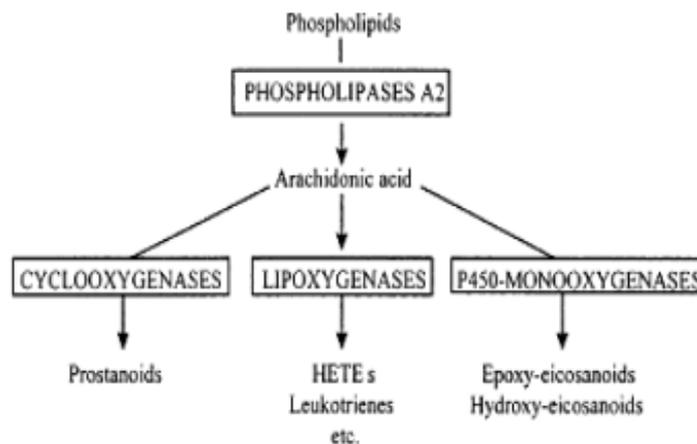


Figura 8 - Principais rotas de formação de prostanóides.

Nota: Explicações no texto.

Fonte: Marks (38)

No organismo humano, os eicosanóides são sintetizados em todos os tecidos e tipos celulares, e parecem estar envolvidos em grande parte dos processos fisiológicos, atuando de maneira similar a hormônios. Já foram identificados ao menos oito diferentes tipos de receptores para prostanóides e três para leucotrienos. Estes receptores possuem uma estrutura transmembrana de sete domínios (polímeros), que possibilitam interações com proteínas G e controlam a liberação de segundo-mensageiros, como o AMP-cíclico, que por sua vez intermedeiam muitos dos efeitos celulares dos eicosanóides (38).

Metabolicamente, os eicosanóides são instáveis, com raio de ação limitado, sendo considerados mediadores locais, também chamados de autacóides (hormônios tissulares). Este sistema de mediação pode ser considerado como um modulador fino do processamento e transdução da sinalização celular, colocado entre o meio extracelular e a maquinaria celular de processamento de sinalização (38).

Entre as múltiplas funções dos eicosanóides, o controle da reparação tecidual e dos mecanismos de defesa ganhou atenção. A síntese aumentada de eicosanóides representa uma

resposta do organismo a todo tipo de estímulo irritativo e/ou tóxico, sendo que o desajuste na produção destes mediadores pode levar a um aumento da liberação de hormônios com função deletéria e subprodutos altamente tóxicos e mutagênicos, tais como os radicais livres do oxigênio e peróxidos. Disto se depreende que os eicosanóides podem desempenhar um papel chave em todas as fases da carcinogênese, começando pela sua ativação/liberação por carcinógenos ambientais, com efeitos genotóxicos e promotores da progressão tumoral, estimulação de metástases e enfraquecimento dos mecanismos de defesa contra o câncer (38).

1.3.7 COX-2 e carcinogênese

A ciclooxigenase-2 (COX-2) é também denominada prostaglandina H₂ sintetase-2 (PGHS-2), principalmente em literatura americana. A COX-1 e COX-2 são isoformas de uma enzima que catalisa o primeiro estágio de oxidação do ácido araquidônico para a formação de prostanóides (vide Figura 8). Os eventos da cascata de formação das prostaglandinas foram inicialmente caracterizados com o que agora é conhecida como COX-1, antes que uma nova proteína com atividade semelhante fosse descoberta, com os trabalhos de Xie et al. e Kujubu et al. em 1991 (54, 55, 56). Uma diferença biológica fundamental entre estas duas isoformas é que a COX-1 está normalmente presente na maioria dos tipos celulares, sendo constitutiva (*house-keeping*), e a sua concentração mantém-se praticamente constante tanto em condições fisiológicas como patológicas. Por outro lado, a COX-2 é normalmente ausente na maioria das células, mas surge rapidamente (em 2-4h), em grande quantidade, em uma variedade de processos patológicos, freqüentemente inflamatórios. Estudos subsequentes demonstraram que o aumento na concentração da COX-2 era induzido por uma série de fatores de crescimento e mitógenos, e não apenas por um promotor tumoral e um oncogene viral, como nos trabalhos iniciais de Xie (1990) e Kujubu (1991), tornando esta isoforma particularmente

relevante nos processos de crescimento celular e na carcinogênese e, portanto, como alvo de fármacos voltados para a quimioprevenção.

Esta enzima é um dímero com duas subunidades idênticas, cada uma com dois sítios ativos separados. Duas pequenas projeções ligam a enzima fortemente à face interna da membrana do retículo endoplasmático liso ou da membrana nuclear. O sítio ativo ciclooxygenase situa-se profundamente dentro de um recesso na estrutura protéica voltada para a membrana, onde o ácido araquidônico, lipossolúvel, tem acesso para se transformar em prostaglandina G_2 (PGG_2). É neste nicho que atuam os AINEs (Figura 9). O sítio ativo peroxidase situa-se na superfície superior da enzima convertendo o peróxido da molécula previamente formada em um grupo hidroxila (PGH_2) (57).

É importante ressaltar que ambas as isoformas da enzima têm o mesmo produto, a PGH_2 . Esta prostaglandina é a precursora comum para a biossíntese de tromboxano A_2 , prostaciclina (PGI_2) e outras prostaglandinas (PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$), sendo outras as enzimas responsáveis pela formação destes compostos, que são os determinantes das respostas biológicas decorrentes da reação inicial das ciclooxygenases (54).

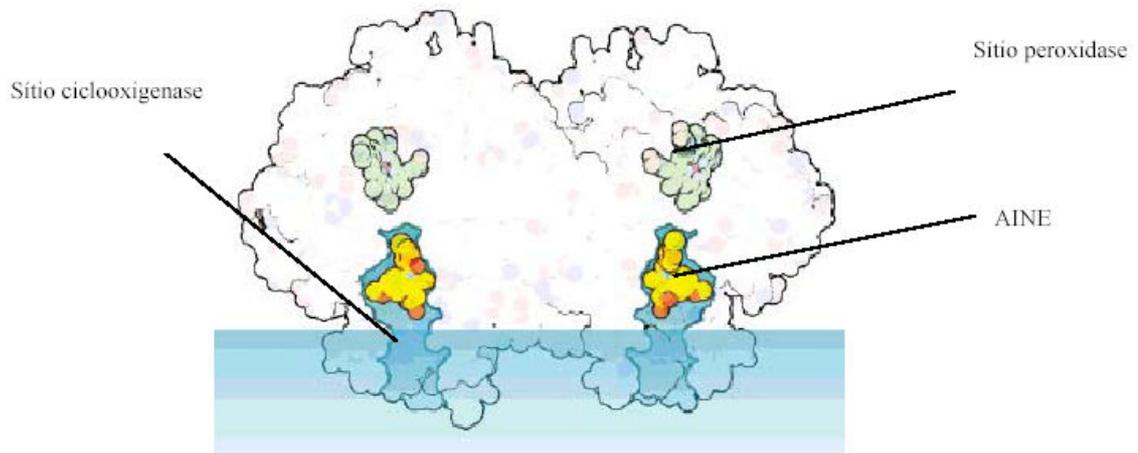


Figura 9 - Mecanismo de ação dos AINES. O AINE, em amarelo, impede a acoplação do ácido araquidônico para primeira reação. A membrana do retículo endoplasmático está representada em azul.

Fonte: Adaptado de Goodsell (57)

O aumento da expressão da COX-2 também pode ser induzido por influência de: oncogenes (*ras* e *scr*), interleucina-1 (IL-1), hipóxia, raios UV, *EGF*, TGF β e TNF α . A dexametasona, antioxidantes e proteínas supressoras tumorais, como a p53, podem suprimir a expressão desta enzima.

A correlação entre a promoção tumoral e resposta inflamatória indica que os processos hiper-proliferativos e inflamatórios estão envolvidos na tumorigênese. Entre os eicosanóides produzidos a partir do ácido araquidônico, a prostaglandina E2 (PGE2), sintetizada via COX-2, está entre os mediadores inflamatórios mais potentes (6), e é expressa na mucosa esofágica sob agressão. Receptores para PGE2 - EP1, EP2, EP3 e EP4 foram identificados em células calciformes de intestino delgado de ratos, por hibridização *in situ* (58). A ligação da PGE2 com seus receptores inicia uma cascata de sinalização mediada por receptores do subtipo proteína G e segundo-mensageiros (AMP-cíclico, Ca²⁺ e outros), induzindo o crescimento tumoral e metástases (6). Estimula ainda o gene *bcl-2*, envolvido na inibição da apoptose, e a

produção de interleucina-6 (IL-6), que está associada à invasão tumoral e aumento da síntese de haptoglobina, que, por sua vez, está associada à implantação e angiogênese tumoral (59).

1.3.8 COX-2 e câncer de esôfago

A observação que tumores em animais e em humanos contêm altas concentrações de prostaglandinas levou vários pesquisadores a tentar inibir o crescimento tumoral com drogas conhecidas por seu efeito inibidor da biossíntese endógena destas (60). Rubio, em 1986, demonstrou uma redução da proliferação tumoral em um modelo de carcinogênese de esôfago em camundongos com o uso de indometacina. Recentemente, Li e col. (61) demonstraram o efeito supressivo do JTE-522, um inibidor seletivo da COX-2, no nº e tamanho dos tumores de esôfago induzidos por N-nitrosometilbenzilamida (NMBA) em ratos, na dose de 9mg/kg (metade da LD50). Este modelo experimental de carcinogênese esofágica produziu um aumento de cinco vezes na expressão do RNAm da COX-2, detectado por RT-PCR semiquantitativo e de sete vezes na produção da PGE2 medida por ELISA, comparada à mucosa esofágica normal. Um dado importante verificado neste estudo é que a expressão da COX-2 aumentada não diminuiu com o inibidor JTE-522 (administrado nas doses de 3, 9 e 30mg/kg), embora a síntese da PGE2, o subproduto do ácido araquidônico mediado pela enzima, fosse significativamente diminuída ($P < 0,01$). Outro trabalho, realizado por Buttar e col. (62), demonstrou efeitos semelhantes na incidência tumoral em um modelo experimental de adenocarcinoma de esôfago em ratos, utilizando MF-Tricíclico, um inibidor seletivo, e sulindac, não-seletivo, da COX-2. Carlton e col. (63), em um modelo experimental com NMBA, não encontrou os mesmos resultados utilizando piroxicam, um potente inibidor não seletivo da COX-2, aventando a hipótese de outras vias metabólicas envolvidas na carcinogênese esofágica induzida por NMBA.

Estudos em humanos também demonstraram aumento da expressão da COX-2 em células de carcinoma epidermóide e adenocarcinoma. Zimmerman e col. (64) detectaram expressão de COX-2 citoplasmática, por imunohistoquímica, em 156 de 172 (91%) espécimes de CEE e em 21 de 27 (78%) dos ADE associados ao esôfago de Barrett. Análises com *western blotting* em algumas amostras confirmaram os achados, demonstrando aumento da expressão de COX-2 nas células tumorais em comparação com tecido epitelial esofágico normal. No mesmo trabalho, estudos *in vitro* com modelos celulares de CEE demonstraram que a expressão da COX-2 no nível do RNAm estava associada a altos níveis da proteína COX-2 e prostaglandina (PGE2 e 6-ceto-PGF1 α). Finalmente, este estudo demonstrou que o tratamento das células de CEE, que expressavam COX-2 com os inibidores da COX flusolida e NS-398, inibiu a síntese de prostaglandinas, suprimiu a atividade mitótica e proliferativa e induziu amplamente a apoptose (com a flusolida). Nos modelos celulares que não expressavam COX-2, nenhum desses efeitos foi observado.

Wilson e col. (65), em publicação anterior (1998), utilizaram o método de RT-PCR, detectando níveis elevados de COX-2 RNAm em 15 de 19 (79%) espécimes de metaplasia intestinal de Barrett, 2 em 2 (100%) de displasia e 5 em 5 (100%) de adenocarcinoma associado ao epitélio de Barrett. Níveis elevados de proteína COX-2, e os RNAm de óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e do *transforming growth factor- α* estavam presentes em proporções similares em tecidos de esôfago de Barrett e de adenocarcinoma.

Estes dois últimos estudos foram os primeiros a reportar que a expressão do gene e proteína COX-2 está elevada em larga proporção no CEE e no ADE (66). Mais recentemente, Shirvani e col. (67) encontraram resultados semelhantes para o ADE; e Shama e col. (68) para o CEE, sendo que, neste último, observou-se um aumento progressivo desde o tecido

esofágico normal até a displasia de alto grau (pré-maligna), com um leve declínio no carcinoma *in situ* e carcinoma avançado.

1.4 CARCINOGENESE EXPERIMENTAL EM CEE

1.4.1 Nitrosaminas

Embora diferentes fatores etiológicos, já mencionados, possam estar associados com o carcinoma epidermóide, somente as nitrosaminas são capazes de induzir tumores no esôfago de animais de experimentação (69). Adicionalmente, muitos estudos sugerem uma ação conjunta de alguns dos fatores etiológicos e das nitrosaminas, oferecendo bases para a compreensão multifatorial da gênese do carcinoma epidermóide. Por exemplo, foi demonstrado em estudos de carcinogênese experimental que a administração concomitante de etanol e nitrosaminas produz um aumento do número de tumores em esôfago de ratos (70, 71). O etanol agiria por inibir o metabolismo das nitrosaminas em outros tecidos que não o esôfago, levando assim a um aumento da concentração destas nitrosaminas neste tecido alvo (72,73). Experimentos feitos com ratos demonstraram também que o ópio e a morfina provavelmente agem de maneira semelhante ao etanol (74).

As nitrosaminas são os únicos compostos cancerígenos que comprovadamente são formados endogenamente (75), gerando, assim, uma exposição ubíqua a estes carcinógenos. Sua síntese endógena ocorre no estômago pela reação do ácido nitroso e de aminas secundárias.

As nitrosaminas são pré-carcinógenos, e, somente após uma reação de biotransformação, resultam em carcinógenos finais que irão reagir com o DNA. A

biotransformação de nitrosaminas gera compostos instáveis, com uma meia-vida curta e altamente reativos. Estes compostos reativos não conseguem escapar do local em que são formados, reagindo com várias macromoléculas, entre elas, o DNA (49). Existem diferentes posições no DNA capazes de sofrer ataques pelos produtos do metabolismo das nitrosaminas, mas a principal base pré-mutagênica formada é a O⁶-alquilguanina, que, durante a divisão celular, leva à incorporação errônea de timidina, ao invés de citosina, gerando assim uma mutação transicional de G-C:A-T. Quando esta mutação ocorre em certos codons de determinados genes responsáveis pelo crescimento celular (proto-oncogenes), como no caso do *ras*, ou de genes responsáveis pelo controle do crescimento celular (genes supressores de tumor), como no caso do *TP53*, estes genes podem perder suas respectivas funções, gerando, assim, uma perda do controle da proliferação celular (49). Portanto, a susceptibilidade do esôfago de ratos a nitrosaminas deve-se principalmente ao fato da conversão das nitrosaminas em carcinógenos finais ocorrer preferencialmente neste tecido (76,77).

1.4.2 Citocromo P450

Vários estudos demonstraram que as bases enzimáticas do metabolismo de nitrosaminas do esôfago de ratos são diferentes dos outros tecidos (73,74,78) devido à expressão somente no esôfago de enzimas CYP (Cytochrome P450) responsáveis pelo metabolismo destes compostos. Ribeiro e col. (79) mostraram recentemente que o esôfago e o fígado de ratos metabolizam a N-nitrosodietilamina com diferentes constantes cinéticas, sendo que o esôfago apresenta uma maior afinidade e atividade que o fígado. As CYP expressas no esôfago são diferentes daquelas expressas no fígado, o principal órgão envolvido no metabolismo de pré-carcinógenos (79). Foi demonstrado que o esôfago de ratos não expressa o CYP2E1, nem outros CYP normalmente expressos no fígado e que metabolizam

carcinógenos, como o CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2, e CYP3A. Porém, foi demonstrado que o CYP2A3 é expresso no esôfago, mas não no fígado de ratos (79). Através de experimentos de inibição com anticorpo anti-CYP2A e com compostos químicos, verificou-se que o CYP2A3 está envolvido com o metabolismo da N-nitrosodietilamina no esôfago de ratos (79), sugerindo que a expressão tecido-específica desta isoenzima é um dos motivos para o organotropismo de nitrosaminas pelo esôfago de ratos.

Foi analisada a expressão das principais enzimas CYP que metabolizam cancerígenos no esôfago de 50 pacientes sem problemas esofágicos (80), com amostras extraídas por endoscopia digestiva ou esofagectomia. Não foi detectada expressão dos CYP1A1, CYP1A2 e CYP3A4, alguns dos principais CYP presentes no fígado humano. Ribeiro e colaboradores (80) demonstraram que 61% dos pacientes analisados expressavam o CYP2A6, a forma humana equivalente ao CYP2A3 expresso no esôfago de ratos, com uma variação inter-individual bastante elevada (de 41 vezes entre aqueles que expressavam esta enzima), o que poderia acarretar uma maior susceptibilidade individual aos efeitos de compostos cancerígenos nestes pacientes, caso esta elevada expressão seja específica para o esôfago. O esôfago do camundongo expressa o CYP2A5, a isoforma equivalente ao CYP2A3 do rato, e ao CYP2A6 humano. A expressão no rato do CYP2A3, no camundongo do CYP2A5 e no homem do CYP2A6 (ortólogo ao CYP2A3), demonstram que o rato e o camundongo podem ser bons modelos experimentais para o estudo de formas para prevenir a ativação de nitrosaminas pelo esôfago humano.

A razão para a diferença individual quanto à expressão do CYP2A6 pode ser de origem ambiental, pois diversos compostos a que se está exposto podem levar ao aumento da expressão de enzimas CYP, seja por um aumento da transcrição do seu gene, ou através da estabilização protéica. Experimentos recentes realizados por Ribeiro e colaboradores

demonstraram que diferentes classes de indutores de enzimas CYP são capazes de levar a um aumento de transcrição do CYP2A3 em ratos. Porém, a maior indução ocorreu no esôfago e após a administração de 3-metilcolantreno, um hidrocarboneto policíclico aromático presente na fumaça do cigarro, sugerindo que a regulação em humanos do CYP2A6 no esôfago possa ser tecido específica.

Normalmente, processos inflamatórios tendem a diminuir a expressão de enzimas CYP. Porém, o CYP2A5 é induzido por estes processos no fígado de camundongos (80), e existem indícios de que o CYP2A6 humano também seja regulado de forma semelhante. Portanto, a inflamação no esôfago, causada pela lesão térmica provocada pela ingestão de bebidas quentes, pode fazer com que ocorra um aumento na expressão do CYP2A6 no esôfago humano, fazendo com que estes pacientes atuem nitrosaminas com maior eficiência.

1.4.3 Lesão térmica e câncer de esôfago

A ingestão do chimarrão é um hábito arraigado no povo do sul do Brasil, sobretudo no Rio Grande do Sul, do Uruguai e da Argentina. Este hábito muito difundido no interior é hoje também urbano. A bebida é obtida através da infusão de água quente em folhas de erva-mate trituradas. A erva-mate é obtida das folhas de uma planta nativa da América do Sul denominada *Ilex paraguayensis*. Normalmente, é colocada e servida em uma “cuia” (*crecencia cotaje*), misturada à água quente e sorvida através de uma bomba sugadora.

O hábito do chimarrão deglutido em altas temperaturas – acima de 70° C – foi citado como possível fator etiológico do carcinoma de esôfago por Victora et al. em estudo epidemiológico (81). Na verdade, acredita-se que o modo pelo qual o chimarrão contribui no

desenvolvimento do CEE depende das lesões térmicas causadas na mucosa esofágica, facilitando a ação das substâncias carcinógenas (82). Rolón et al., em estudo de caso-controle, analisando a ingestão de mate (erva-mate) com água quente e água fria no Paraguai, identificou a alta temperatura com que a bebida é ingerida, e não a quantidade ou duração, como um importante fator de risco para o câncer de esôfago nesta população (83). Pelo contrário, a *Ilex paraguayensis* apresenta quantidades apreciáveis de flavonóides, compostos polifenólicos largamente encontrados em frutas e vegetais, e estes, por sua vez, estão sendo pesquisados por suas propriedades citoprotetoras e quimiopreventivas (84). Yang et al. (85), em estudo de carcinogênese experimental de cólon em camundongos, evidenciaram um aumento no índice apoptótico naqueles que receberam suplemento alimentar de quercetina e rutina (ambos da classe dos flavonóides) em comparação aos que receberam dieta padrão. A questão que se levanta é se a *Ilex paraguayensis* teria propriedades citoprotetoras na mucosa esofágica, e se estas estariam sendo anuladas pela alta temperatura em que é ingerida.

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

1. Stoner GD, Gupta A. Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogen* 2001;22(11):1737-46.
2. Koshy M, Esiashvilli N, Landry JC, Thomas Jr CR, Matthews RH. Multiple Management Modalities in Esophageal Cancer: Epidemiology, Presentation and Progression, Work-up, and Surgical Approaches. *The Oncologist* 2004;9:137-46.
3. Pellegrini CA, Way LW. Esophagus & Diaphragm: Tumor of the Esophagus - 2. Carcinoma of the Esophagus in Way LW. *Curr Surg Diagn & Treat* 1994;10:434-38.
4. Orringer MB. Tumor of the Esophagus. In: Sabiston DC Jr, Lyerly HK, eds. *Text Book of Surgery: The Biological Basis of Modern Surgical Practice*. 15th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1997:744-58.
5. Pinto LF, Albano RM, Guimarães DP. Câncer de Esôfago e Estômago. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Atheneu; 2004:155-64.

6. Chen X, Yang CS. Esophageal adenocarcinoma: a review and perspectives on the mechanism of carcinogenesis and chemoprevention. *Carcinogen* 2001;22:1119-29.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: INCA; 2003.
8. Kruel C, Gurski R, Golbert L, Da Luz L, Ferreira M. Effect of thermal injury and the oral administration of diethylnitrosamine in the development of esophageal tumor in mice. In: Peracchia A, Rosati R, Bonavina L, Fumagalli U, Bona S, Chella B. *Recent advances in Diseases of the esophagus*. Bologna: Monduzzi, 1997:37-40.
9. Coral RP, Gabiatti G. Carcinoma epidermóide de esôfago. In: Rohde L. *Rotinas em cirurgia digestiva*. São Paulo: Artmed, 2005; 12:91-5.
10. Thomas CR. Biology of esophageal cancer and the role of combined modality therapy in *Surgical Clinics of North America: Surg of the Esophag* 1997; 77(5):1139-67.
11. de Barros SG, Ghisolfi ES, Luz LP, Barlem GG, Vidal RM, Wolff FH, et al. High temperature “mate” infusion drinking in a population at risk for squamous cell carcinoma of esophagus. *Arq Gastroenterol* 2000;37(1):25-20.
12. Eulálio JMR, Chaves CP, Renteri JM. Distúrbios da motilidade esofagiana. In: Vieira OM, Chaves CP, Manso JEF, Eulálio JMR. *Clínica Cirúrgica: fundamentos teóricos e práticos*. São Paulo: Atheneu, 2000;1:169-81.
13. Manso JEF, Refeneti RA, Sayeg FA. Câncer de esôfago. In: Vieira OM, Chaves CP, Manso JEF, Eulálio JMR. *Clínica Cirúrgica: fundamentos teóricos e práticos*. São Paulo: Atheneu, 2000;1:193-98.

14. Enzinger PC, Mayer RJ. Medical progress: Esophageal cancer. *N Engl J Med* 2003; 349(23):2241-52.
15. De Meester SR, Cooper JD. Esophagus-IV Esophageal carcinoma. In: Doherty GM, Baumann DS, Creswell LL, Goss JA, Lairmore TC. *The Washington Manual of Surgery*; 1997:189-91.
16. Ruol A. Multimodality treatment for non-metastatic cancer of the thoracic esophagus. *Dis Esophagus*; 1996; 9(Suppl 1):39-55.
17. Watson A. Esophagogastrectomy for Carcinoma. In: Nyhus LM, Baker RJ. *Mastery of Surgery*. 3. ed. Boston: Little Brown and Co, 1992; 1:541-50.
18. Visbal AL, Allen MS, Miller DL, Deschamps C, Trastek VF, Pairolero PC. Ivor Lewis esophagogastrectomy for esophageal cancer. *Ann Thorac Surg* 2001; 71:1803-8.
19. Nguyen NT, Roberts PF, Follette DM, Lau D, Lee J, Urayama S, et al. Evaluation of minimally invasive surgical staging for esophageal cancer. *Am J Surg* 2001; 182:702-6.
20. Goldminc M, Maddern G, Le Prise E, Meunier B, Campion JP, Launois B. Oesophagectomy by a transhiatal approach or thoracotomy: a prospective randomized trial. *Br J Surg* 1993; 80:367-70.
21. Stein HJ, Sandler A, Fink U, Siewert JR. Multidisciplinary approach to esophageal and gastric cancer. *Surg Clin N Am* 2000; 80(2):659-82.

22. Ellis Jr FH. Standard resection for cancer of the esophagus and cardia. *Surg Oncol Clin North Am* 1999; 8:279-94.
23. Seitz JF, Sarradet A, François E, Jacob JH, Ollivier JMP Rougier P, et al. Carcinoma of the oesophagus. *Br J Cancer* 2001; 84(Suppl 2):61-4.
24. Mathew G, Jamieson GG. Neoadjuvant therapy for oesophageal cancer. *Br J Surg* 1997; 84:1185-7.
25. Forastiere AA, Heitmiller RF, Keinberg L. Multimodality therapy for esophageal cancer. *Chest* 1997; 112:195S-200S.
26. Slater MS, Holland J, Faigel DO, Sheppard BC, Deveney CW. Does neoadjuvant chemoradiation downstage esophageal carcinoma? *Am J Surg* 2001; 181:440-4.
27. Fink U, Stein HJ. Treatment of esophageal cancer. *N Eng J Med* 1999; 340(21):1685-6.
28. Swisher SG, Carmach HE, Hunt KK, Doty JE, Zinner MJ, et al. The role of neoadjuvant therapy in surgically resectable esophageal cancer. *Arch Surg* 1996; 131:819-25.
29. Kane III JM, Shears LL, Ribeiro U, Clark MR, Peterson M, et al. Is esophagectomy following upfront chemoradiotherapy safe and necessary? *Arch Surg* 1997; 132:481-6.
30. Chemoprevention Working Group. Prevention of cancer in the next millennium: Report of the Chemoprevention Working Group to the American Association for Cancer Research. *Cancer Res* 1999; 59:4743-58.

31. Sporn MB, Nanjoo S. Chemoprevention of cancer. *Carcinogen* 2000; 21:525-30.
32. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, et al. Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst*, 1998;90:1371-88.
33. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin a on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996; 334:1150-5.
34. Shiff SJ, Rigas B. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs and Colorectal Cancer: Evolving Concepts of Their Chemopreventive Actions. *Gastroenterol* 1997; 113:1992-8.
35. Kune GA, Kune S, Watson LF. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. *Cancer Res*, 1988; 48:4399-404.
36. Thun MJ. NSAID use and decreased risk of gastrointestinal cancers. *Gastroenterol Clin North Am* 1996; 25:333-48.
37. Corley DA, Kerlikowske K, Verma R, Buffler P. Protective association of aspirin/NSAIDs and esophageal cancer: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterol* 2003; 124:47-56.
38. Marks F, Müller-Decker K, Fürstenberger G. A causal relationship between unscheduled eicosanoid signaling and tumor development: cancer chemoprevention by inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Toxicol* 2000; 153:11-26.

39. Raino CA, Esteves LICV, Rogatto SR. Mecanismos epigenéticos do câncer. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Atheneu; 2004:87-96.
40. Ko TC, Evers BM. Molecular and cell biology. In: Sabiston DC Jr, Lyerly HK, eds. *Text Book of Surgery: The Biological Basis of Modern Surgical Practice*. 15th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2001:13-27.
41. Tajara EH. Ciclo celular. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Atheneu; 2004:65-76.
42. Israels ED, Israels LG. The Cell Cycle. *The Oncologist* 2000; 5:510-13.
43. Rocha AB, Regner A. Transdução de sinais. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Atheneu; 2004:77-85.
44. Barcinski MA. Morte celular. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Atheneu; 2004:57-63.
45. Silva RLA. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Atheneu; 2004:29-42.
46. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *The Oncologist* 1999; 4:332-9.
47. Mandard AM, Hainaut P, Hollstein M. Genetic steps in the development of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Mut Research*, 2000; 462:335-42.
48. McCabe ML, Dlamini Z. The molecular mechanisms of oesophageal cancer. *Int Immunopharmacol*, 2005; 5:1113-30.

49. Ristamäki A, Honkanen N, Jänkälä H, Sipponen P, Härkönen M. Expression of Cyclooxygenase-2 in Human Gastric Carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57:1276-80.
50. Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, et al. COX-2 Is Expressed In Human Pulmonary, Colonic and Mammary Tumors. *Cancer* 2000; 12:2637-45.
51. Hosomi Y, Yokose T, Hirose Y, Nakajima R, Nagai K, Nishiwaki Y, et al. Increased cyclooxygenase 2 (COX-2) expression occurs frequently in precursor lesions of human adenocarcinoma of lung. *Lung Cancer* 2000; 30:73-81.
52. Sales KJ, Katz AA, Howard B, Soeters RP, Millar RP, Jabbour HN. Cyclooxygenase Is Up-regulated in Cervical Carcinomas: Autocrine/paracrine Regulation of Cyclooxygenase-2, Prostaglandin E Receptors, and Angiogenic Factors by Cyclooxygenase-1. *Cancer Res* 2002; 62:424-32.
53. Eberhart CE, Dubois RN. Eicosanoid and the Gastrointestinal Tract. *Gastroenterol* 1995; 109:285-302.
54. Bakhle YS. COX-2 and cancer: a new approach to an old problem. *Br J Pharmacol* 2001; 134:1137-50.
55. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS 10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 1991; 266:12866-72.

56. Xie W, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2692-6.
57. Goodsell D. The molecular perspective: Cyclooxygenase-2. *The Oncologist* 2000; 5:169-71.
58. Northey A, Denis D, Cirino M, Kathleen MM, Nantel F. Cellular distribution of prostanoid EP receptors mRNA in the rat gastrointestinal tract. *Prostaglandins other Lipid Media* 2000; 62:145-56.
59. Fosslie E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplásica. *Ann Clin Lab Sci*, 2000; 30:3-21.
60. Rubio CA. Further Studies on the Therapeutic Effect of Indometacin on Esophageal Tumors. *Cancer* 1986; 58:1029-31.
61. Li Z, Shimada Y, Kawabe A, Sato F, Maeda M, Komoto I, et al. Supression of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats by JTE-522, a selective COX-2 inhibitor. *Carcinogen* 2001; 22(4):547-51.
62. Buttar NS, Wang KK, Leontovich O, Westcott JY, Pacifico RJ, Anderson MA, et al. Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma by COX-2 inhibitors in an animal model of Barrett's esophagus. *Gastroenterol* 2002; 122(4):1172-5.
63. Carlton PS, Gopalakrishnan R, Gupta A, Liston BW, Habib S, Morse MA, et al. Piroxicam is an ineffective inhibitor of N-nitrosomethylbenzylamine- induced tumorigenesis in the rat esophagus. *Cancer Res* 2002; 62(15):4376-82.

64. Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schrör K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59:198-204,
65. Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ. Increased expression of inducible nitric Oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer Res*; 1998; 58:2929-34,
66. Lord RVN, Danenberg KD, Danenberg PV. Cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus, Barrett's adenocarcinomas, and esophageal SCC: ready for clinical trials. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(8):2313-15.
67. Shirvani VN, Ouatu-Lascar R, Kaur BS, Omary MB, Triadafilopoulos G. Cyclooxygenase-2 expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma: ex vivo induction by bile salts and acid exposure. *Gastroenterol* 2000; 118:487-96.
68. Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, Okami J, Kondo M, Fujiwara Y, et al. Up-regulation of Cyclooxygenase in squamous Carcinogenesis of the esophagus. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1229-38.
69. Craddock VW. *Cancer of the Oesophagus*. Oxford: Oxford University Press; 1993.
70. Gibel W. Experimental studies of syncarcinogenesis in esophageal carcinoma. *Arch. Geschwulstforsch* 1967, 30:181-9.
71. Aze Y, Toyoda K, Furukawa F, Mitsumori K, Takahashi M. Enhancing effect of ethanol on esophageal tumor development in rats by initiation of diethylnitrosamine. *Carcinogen* 1993; 14(1):37-40.

72. 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. *Carcinogen* 1984; 5(10):1337.
73. Ribeiro Pinto LF. Differences between isoamyl alcohol and ethanol on the metabolism and DNA ethylation on N-nitrosodiethylamine in the rat. *Toxicol* 2000, 151(1-3):73-9.
74. Ribeiro Pinto LF, Swann PF. Opium and esophageal cancer: effect of morphine and opium on the metabolism of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in the rat. *Carcinogen* 1997; 18(2):365-9.
75. Mirvish SS. Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett* 1995; 93:17-48.
76. Lijinsky W. *Chemistry and Biology of N-nitroso Compounds*. Cambridge: Cambridge University Press; 1992.
77. Druckrey H, Preussmann R, Ivankovic S, Schmähl D. Organotropic carcinogenic effects of 65 various N-nitroso-compounds on BD rats. *Zeitschrift fur Krebsforschung* 1967; 69:103-201.
78. Von Hofe E, Schmerold I, Lijinsky W, Jeltsch W, Kleihues P. DNA methylation in rat tissues by a series of homologous aliphatic nitrosamines ranging from N-nitrosomethylamine to N-nitrosomethyldodecylamine. *Carcinogen* 1987; 8(9):1337-41.

79. Pinto LF, Moraes E, Albano RM, Silva MC, Godoy W, Glisovic T, et al. Rat oesophageal Cytochrome P450 (CYP) mono-oxygenases system: comparison to the liver and relevance in N-nitrosodiethylamine carcinogenesis. *Carcinogen*, 2001; 22(11):1877-83.
80. Godoy W, Albano RM, Moraes EG, Pinho PR, Nunes RA, Saito EH, et al. CYP2A6/2^{A7} and CYP2E1 expression human oesophageal mucosa: regional and inter-individual variation in expression and relevance to nitrosamine metabolism. *Carcinogen* 2002; 23(4):611-6.
81. Victora C, Muñoz N, Dau NE, Barcelos LB, Peccin DA, Braga NM. Hot beverages and esophageal cancer in southern Brazil: a case control study. *Int J Cancer* 1987; 39:710-6.
82. Barros SGC. Detecção de lesões precursoras em indivíduos sob risco para carcinoma epidermóide do esôfago: experiência com a histopatologia e a citopatologia da mucosa esofágica através de biópsias endoscópicas e do esfregaço pelo balão citológico chinês [Tese]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1982.
83. Rolón PA, Castellsagué X, Benz M, Muñoz N. Hot and Cold mate drinking and esophageal cancer in Paraguay. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4000(6):595-605.
84. Jatoi A, Thomas CR. Esophageal cancer and the esophagus: challenges and potential strategies for selective cytoprotection of the tumor-bearing organ during cancer treatment. *Semin Radiat Oncol* 2002; 12(1 Suppl1):62-7.

85. Yang K, Lamprecht SA, Liu Y, Shinozaki H, Fan K, Leung D, et al. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogen* 2000; 21(9):1655-60.

Artigo em Português

**EXPRESSÃO DA COX-2 ASSOCIADA À LESÃO TÉRMICA E
CARCINOGENESE ESOFÁGICA INDUZIDA POR
DIETILNITROSAMINA: MODELO EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS INDUÇÃO DE CARCINOGENESE ESOFÁGICA
POR DIETILNITROSAMINA E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA
COX-2 ASSOCIADA À LESÃO TÉRMICA: MODELO EXPERIMENTAL
EM CAMUNDONGOS**

RESUMO

Introdução: o carcinoma epidermóide de esôfago apresenta alta incidência nos estados do sul do Brasil, especialmente, no Rio Grande do Sul. O hábito de ingerir bebidas em altas temperaturas, principalmente o mate, vem sendo apontado como co-fator responsável por este fato. Devido à alta morbi-mortalidade, ainda, observada apesar de inúmeros avanços terapêuticos nas últimas décadas, uma nova abordagem - a quimioprevenção - utilizando os inibidores seletivos da COX-2, tem sido alvo de estudos experimentais no intuito de melhorar o prognóstico desta neoplasia.

Objetivo: avaliar a expressão da COX-2 em um modelo experimental de carcinogênese esofágica em camundongos associada à lesão térmica.

Material e Métodos: foram utilizadas 160 fêmeas de camundongos *Mus musculus*, cepa CF1. Os animais foram divididos em quatro grupos: os grupos I e II (controles) receberam gavagem esofágica com água à temperatura ambiente e a 60-70°C, respectivamente, e sacrificados aos 30 e 150 dias de experimento (T30 e T150); os grupos III e IV (tratados) receberam gavagem esofágica com água à temperatura ambiente e a 60-70°C,

respectivamente, além de NDEA três vezes por semana, durante todo o experimento e sacrificados aos 30, 60, 90, 120, e 150 dias (T30, T60, T90, T120 e T150). Nos dias de sacrifício, os esôfagos foram dissecados e coletados. Metade do esôfagos foram conservados em parafina para exame histopatológico e os demais tiveram a mucosa isolada e armazenada em frasco com Trizol para análise da expressão do RNAm da COX-2 por RT-PCR.

Resultados: não houve diferença na média do número de tumores entre os grupos tratados III e IV (0,70 e 0,76, respectivamente, $p=0,537$). A distribuição e variação histopatológicas foram semelhantes a outros trabalhos na literatura com este modelo, não havendo diferença entre os grupos tratados. Não houve expressão de RNAm COX-2 em nenhum dos grupos estudados.

Conclusão: não houve expressão da COX-2 ou influência promotora tumoral da temperatura da água neste modelo experimental de carcinogênese esofágica em camundongos, podendo ser aperfeiçoado para futuros estudos em quimioprevenção.

INTRODUÇÃO

Tomado em escala mundial, o câncer de esôfago ocupa a oitava posição como neoplasia maligna mais freqüente, apresentando distribuição geográfica variável (1). Analisando-se os dois tipos histológicos predominantes – o carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) e o adenocarcinoma (ADE) – notam-se incidências diferenciadas, não apenas entre regiões, mas também entre etnias de uma mesma área (1,2). Nos países em desenvolvimento, o CEE ainda é o tipo histológico predominante em 93% dos casos (3). Nos últimos anos, entretanto, houve um aumento da incidência de adenocarcinoma nos países ocidentais desenvolvidos, passando este a ser o tipo histológico mais freqüente nestes locais

(2). No Brasil, o Rio Grande do Sul é o estado de maior incidência com 22,32 casos por 100 mil habitantes/ano - considerada uma zona de incidência média - e taxa de mortalidade estimada de 16,21 mortes/100 mil habitantes em 2003, a segunda causa de morte por câncer em homens no estado (4,5). O hábito de consumir o mate, uma infusão da erva *Ilex paraguayensis*, em altas temperaturas (aproximadamente 70°C), configura-se como um cofator de risco para o CEE neste estado (6).

O CEE é notório por seu comportamento biológico agressivo, infiltrando-se localmente e envolvendo linfonodos adjacentes, além de apresentar disseminação hematogênica importante, responsável pelo prognóstico reservado, apesar dos avanços técnicos alcançados na sua abordagem cirúrgica. A drenagem linfática mediastinal extensa, que se comunica com a cadeia cervical e abdominal, é a responsável pelas metástases mediastinais, supraclaviculares e celíacas, presentes em 75% dos pacientes ao diagnóstico. A sobrevida geral em 5 anos, para tumores tratados, é de 5 a 12%.

Dada a alta frequência de doença localmente avançada associada à presença de micrometástases, quase sempre existente antes de qualquer tentativa de ressecção, resultando em recidiva local e sistêmica após a esofagectomia, vem se observando crescente interesse em abordagens multidisciplinares, como a quimioterapia neo-adjuvante ou adjuvante, radioterapia ou rádio e quimioterapia combinadas, no intuito de proporcionar novas possibilidades terapêuticas. Ainda em um esforço para melhorar o prognóstico do CEE e dos tumores do trato gastro-intestinal (TGI) em geral, a quimioprevenção - abordagem farmacológica para suspender ou reverter a carcinogênese (7, 8) - vem sendo intensamente estudada, notadamente, no adenocarcinoma de cólon e, mais recentemente, também no câncer de esôfago. Novos agentes estão sendo avaliados, especialmente, os inibidores seletivos da ciclooxigenase-2 (COX-2). A relação desta enzima com a quimioprevenção e sua aplicação

no CEE está ligada ao crescente interesse na aspirina e em outros antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) para a prevenção do câncer colo-retal.

A COX-2 é também denominada prostaglandina H₂ sintetase-2 (PGHS-2), principalmente em literatura americana. A COX-1 e COX-2 são isoformas de uma enzima que catalisa o primeiro estágio de oxidação do ácido araquidônico para a formação de prostanóides. A COX-1 está normalmente presente na maioria dos tipos celulares, sendo constitutiva (*house-keeping*), e a sua concentração mantém-se praticamente constante tanto em condições fisiológicas como patológicas. Por sua vez, a COX-2 é normalmente ausente na maioria das células, mas surge rapidamente (em 2-4h) em grande quantidade em uma variedade de processos patológicos, freqüentemente, inflamatórios. Estudos subseqüentes demonstraram que o aumento na concentração da COX-2 era induzido por uma série de fatores de crescimento e mitógenos, e não apenas por um promotor tumoral e um oncogene viral, como nos trabalhos iniciais de Xie (9) e Kujubu (10), tornando esta isoforma particularmente relevante nos processos de crescimento celular e na carcinogênese e, portanto, como alvo de fármacos voltados para a quimioprevenção.

Este estudo tem como objetivo avaliar a expressão da COX-2 em um modelo de carcinogênese esofágica em camundongos associada à lesão térmica, mimetizando um fator de risco relevante em nosso meio, e testar este desenho experimental para futuros estudos em quimioprevenção.

MATERIAL E MÉTODOS

Cirurgia Experimental

Aprovação

Este trabalho foi submetido à análise da Comissão Científica e da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sendo aprovado na data de 22 de janeiro de 2004, recebendo o número de protocolo: 03-467.

Animais e Ambiente

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*, cepa CF1), num total de 160 fêmeas, com 60 dias de vida e peso médio inicial de 30 gramas, provenientes do biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em condições adequadas de umidade (45-95%), temperatura (19 - 21°C), fluxo contínuo de ar e ciclo de 12 horas de claro e escuro (luz 9:00h - 21:00h). Todos os animais foram adaptados a estas condições, sete dias antes de entrarem em experimento nesta mesma unidade.

Foram obedecidos todos os princípios éticos no tratamento dos animais, evitando-se dor e desconforto durante os procedimentos. Os camundongos foram mantidos em gaiolas plásticas forradas com maravalha de pinus, com grade metálica servindo de tampa, tendo acesso à ração (Nuvital®- Nuvilab CR1) e água *ad libitum*, em consonância com os preceitos estabelecidos no National Institutes Of Health (NIH) (11), enquadrando-se às Normas de Utilização de Animais em Projetos de Pesquisa da Comissão de Ética em Saúde/GPPG/HCPA, resolução normativa 04/97.

Experimento

Foram mantidos dez animais por gaiola. Estas eram higienizadas conforme rotina da Unidade de Experimentação Animal e numeradas de acordo com a divisão dos animais entre os grupos de maneira individual, cada uma mostrando etiquetas plastificadas em que constavam os grupos a que pertenciam os animais, os óbitos ocorridos e suas datas, as substâncias administradas na água para beber e a substância correspondente à infusão por intubação esofágica.

A partir do primeiro dia de experimento, foi acrescido à água dos animais do Grupo Tratado, e oferecida semanalmente por três dias consecutivos, para indução de tumores, o carcinógeno N-Nitrosodietilamina (NDEA, CAS: 55-18-5) na concentração de 0,04 ml/1000ml conforme modelo experimental de Rubio (12) e Krueel (13), mantendo-se alimentação padrão. A água para beber e para preparo das soluções foi fornecida pela rede pública de abastecimento de Porto Alegre (Departamento Municipal de Água e Esgoto-DMAE). Foi administrado aos animais por intubação esôfago-gástrica, doravante denominada gavagem, água quente a 60-70°C ou “fria”, à temperatura ambiente (TA) – entre 17 a 21°C – conforme cada grupo, utilizando-se uma agulha feita especialmente para esta finalidade (Figura 1). A gavagem era realizada uma vez por semana durante todo o experimento. A escolha por esta frequência se baseou na experiência do grupo de que o aumento do número de gavagens na semana aumentava a mortalidade e debilidade dos animais, sem acréscimo de tumores (4). A água era aquecida por uma resistência elétrica dentro de um recipiente termicamente isolado e sua temperatura era controlada por um termômetro de mercúrio graduado até 100°C.



Figura 1 - Agulha para infusão de água por gavagem.

A distribuição dos grupos experimentais está ilustrada na Figura 2.

Grupos Controle: composto por 20 camundongos por grupo, sendo sacrificados em 30 dias (10 por grupo) e 150 dias (10 por grupo).

- Grupo I – Água fria (TA) por infusão;
- Grupo II – Água quente (60-70°C) por infusão.

Grupos Tratados: compostos por 60 camundongos por grupo, sendo sacrificados em 30 dias (10 animais por grupo), 60 dias (10 por grupo), 90 dias (10 por grupo), 120 dias (10 por grupo) e 150 dias (20 por grupo).

- Grupo III – NDEA + água fria por infusão
- Grupo IV – NDEA + água quente por infusão

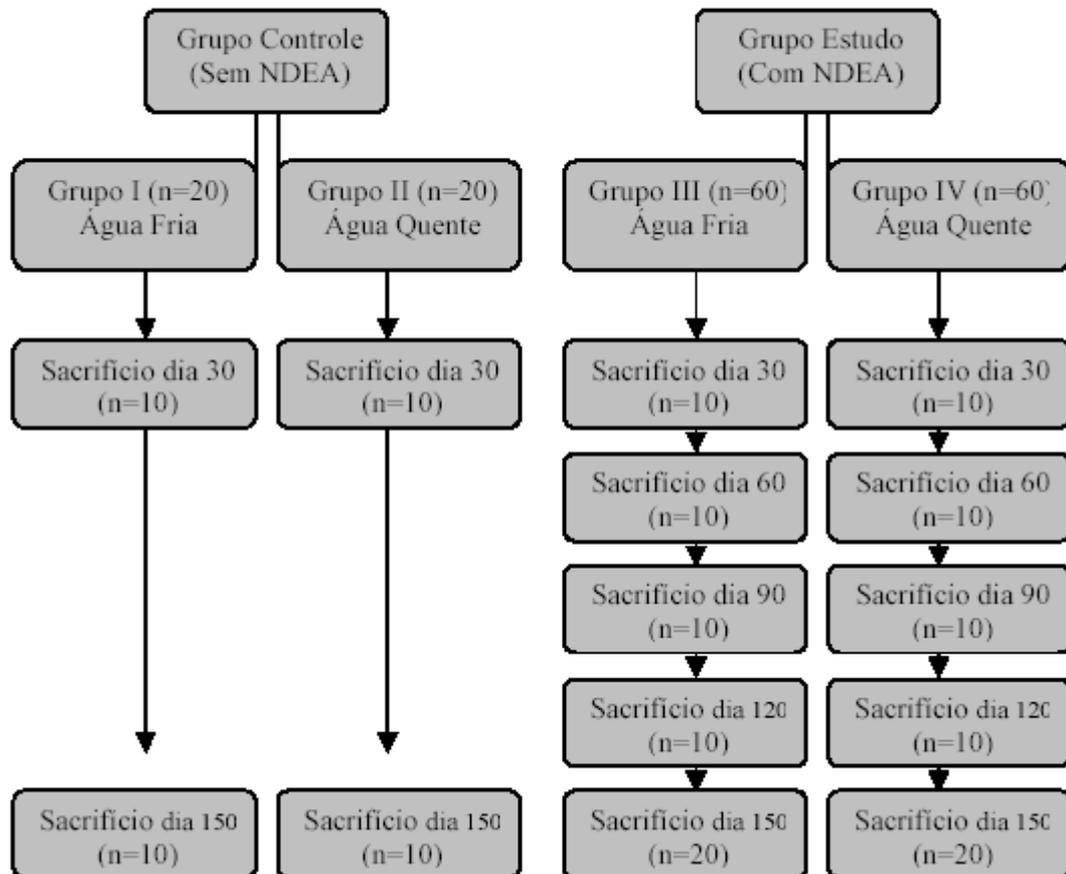


Figura 2 - Desenho experimental; n= n° de animais. NDEA: N-dietilnitrosamina; Água Quente ou Fria: refere-se à temperatura da água utilizada na gavagem esofágica; Dia 30, 60, 90, 120, 150, refere-se ao dia do experimento que cada grupo de animais foi sacrificado e analisado.

Para o procedimento de gavagem os animais eram isolados, por grupo, dos demais, imobilizados manualmente pela cauda e pela região cervical posterior, hiper-estendendo-se a cabeça e introduzindo-se gentilmente a agulha através da cavidade oral sem resistência (Figura 3).

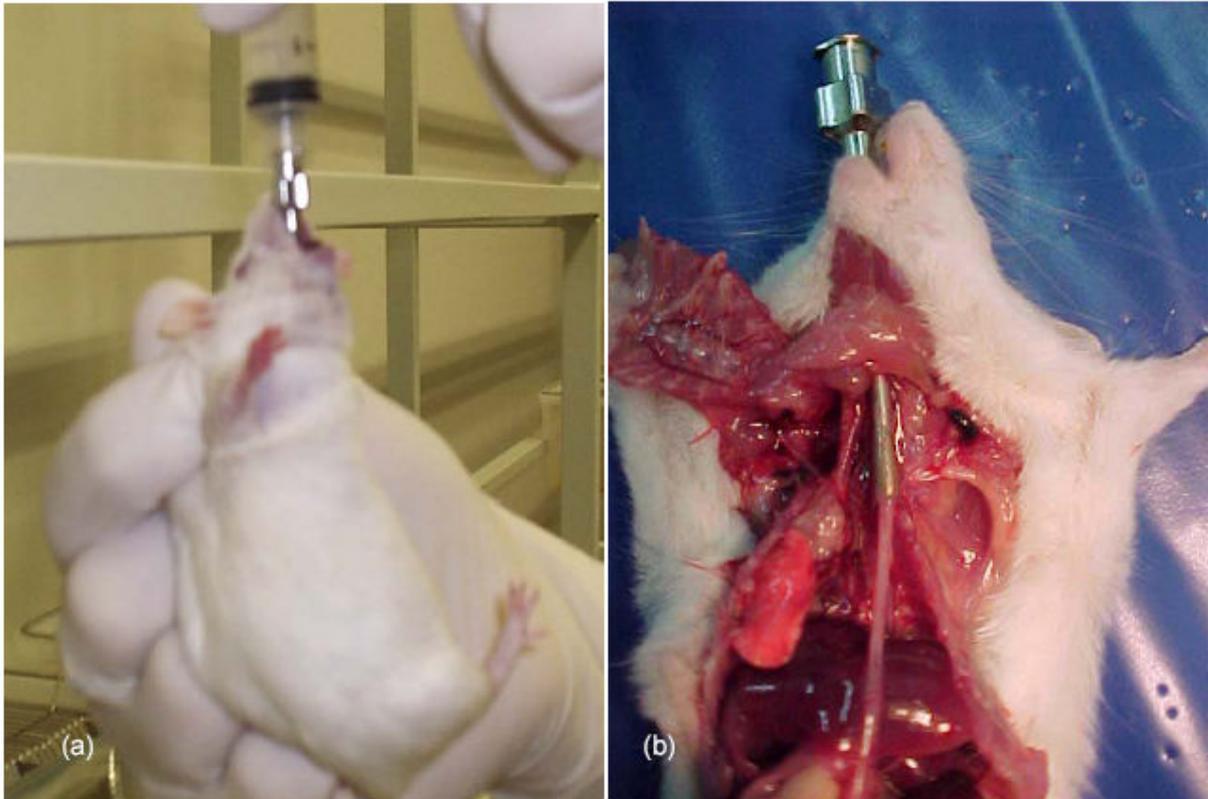


Figura 3 - (a) Técnica de gavagem. (b) à necropsia confirma-se o posicionamento da agulha no terço proximal do esôfago

Descrição do sacrifício e necropsia

Sacrifício

No dia assinalado, cada animal do grupo foi sacrificado na câmara de CO₂.

Necropsia

A seqüência da dissecção é descrita a seguir:

1. Posicionamento do animal em decúbito dorsal sobre uma prancha, fixando-se as patas com agulhas;
2. Abertura da pele por incisão mediana da região púbica à submentoniana;
3. Abertura do peritônio, sobre a linha média, iniciando no nível do púbis até apêndice xifóide e, após, lateralmente, margeando os rebordos costais;

4. Ressecção costal bilateral, iniciando nos gradeados costais inferiormente e ascendendo ao manúbrio esternal, com conseqüente exposição da região toraco-abdominal;
5. Dissecção esofágica: inicialmente era aplicada, sobre o estômago, suave tração, com identificação da extremidade inferior do esôfago. Iniciava-se pela região da cárdia, estendendo-se cranialmente pelo mediastino posterior. Eram feitas dissecção romba e secção de estruturas, incluindo ligamento pulmonar inferior, aorta e ázigos. Já na região cervical, onde a traquéia e o esôfago tornam-se uma estrutura única formando a hipofaringe, o esôfago era seccionado no ponto mais cranial. Em sua extremidade caudal, era seccionado na porção diretamente inferior à junção esofagogástrica.
6. Os esôfagos destinados à análise por biologia molecular eram estendidos sobre placas de vidro sobre gelo e, com auxílio de pinças, a camada muscular externa era tracionada a partir do terço médio do órgão para as extremidades, expondo a mucosa. Esta era coletada para análise e a camada muscular descartada. Os esôfagos destinados à patologia eram seccionados longitudinalmente e fixados pelas extremidades com alfinetes sobre cortiça.

Destino do material

Os esôfagos dos animais do grupo controle foram coletados para análise do RNAm da COX-2 por RT-PCR (Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction) e para análise histopatológica. Aos 30 dias e aos 150 dias, o material foi dividido da seguinte maneira, em cada grupo (I e II):

- Cinco esôfagos eram estendidos sobre cortiça e acondicionados dentro de potes plásticos, devidamente identificados por grupo, com formalina tamponada a 10% e destinados à patologia;

- Cinco esôfagos, sem camada muscular, eram coletados em tubo com 1ml reagente Trizol[®] (Invitrogen, SP, BRA) para extração do RNA total.

No grupo tratado, os esôfagos de dez animais sacrificados de cada grupo (III e IV) aos 30, 60, 90 e 120 dias foram assim divididos:

- Cinco esôfagos coletados como descrito nos tubos de Trizol[®];
- Cinco esôfagos coletados da mesma forma que o grupo controle para análise histopatológica.

Aos 150 dias, dos 20 animais restantes de cada grupo tratado, 10 receberam tratamento semelhante ao descrito anteriormente e todos foram submetidos à contagem tumoral.

Para a contagem tumoral, os segmentos esofágicos eram inicialmente fixados em pequenas placas de cortiça, mantendo o espécime totalmente estendido e possibilitando abertura de sua luz e exposição da mucosa. A contagem tumoral era realizada ao natural e uma segunda contagem com auxílio de lupa. Foram considerados como tumores, lesões maiores ou iguais a 1mm, mensuradas ao paquímetro.

Análise histopatológica

As peças foram inicialmente desidratadas, passando por uma série gradativa de soluções alcoólicas até 100% (etanol a 75, 90 e 100%) e acrescidas à parafina derretida até seu resfriamento e endurecimento. Foi utilizada, especificamente, a parafina de alta qualidade Paraplast[®] (Sigma, USA). A inclusão do esôfago em bloco de parafina era feita enrolando-se o órgão sobre si mesmo a partir de uma das extremidades, com a finalidade de gerar cortes histológicos que atingissem todo o perfil longitudinal da víscera, moldada em forma de bloco e cortada em fatias pelo micrótomo. Esses cortes foram lavados com xilol para remoção da parafina e corados com hematoxilina e eosina.

Todo o trabalho com as peças até a montagem destas já coradas foi realizado no Centro Integrado de Patologia, na cidade de Rio Grande, Rio Grande do Sul, sob a supervisão do Dr. Renan Varela Juliano. As lâminas foram numeradas de maneira aleatória por funcionário deste serviço, não havendo conhecimento do autor ou dos patologistas sobre sua classificação por grupo. As lâminas foram lidas por dois patologistas de forma independente.

Os cortes histológicos do esôfago foram analisados em microscópio ótico comum para identificação das alterações histopatológicas e classificados da seguinte forma:

- Histologia Normal: uma fileira de células basais localizadas entre a borda do epitélio e a submucosa, com núcleos ovais ou arredondados. Apresenta um estrato córneo que ocupa um terço ou até a metade da espessura epitelial. Não se define a muscular da mucosa e são vistas algumas papilas rudimentares.
- Esofagite: o epitélio apresenta-se mais espesso às custas de hiperplasia da camada basilar, hiperplasia papilar, hiperqueratose e infiltrado inflamatório composto por polimorfonucleares e linfócitos.
- Displasia de Baixo Grau: aumento das camadas celulares basais atingindo um terço do epitélio com células pleomórficas.
- Displasia de Alto Grau: as alterações displásicas atingem toda a espessura do epitélio que é composto de células marcadamente anormais. No entanto, pode ser observada alguma maturação na superfície epitelial.
- Carcinoma Invasivo: as células malignas são encontradas abaixo da lâmina própria.

RT-PCR

Uma vez coletados em Trizol[®], as mucosas esofágicas eram armazenadas em freezer a -20°C até seu envio ao Rio de Janeiro/RJ, para análise no Laboratório de Toxicologia e Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Universidade

do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Para cada remessa, o material era acondicionado em caixas de isopor preenchidas com gelo seco e remetido por SEDEX (serviço de encomenda expressa)¹⁰ (oferecido pela Empresa Brasileira de Correios e Telégrafos - EBCT), chegando ao seu destino no mesmo dia, em horário comercial.

Para a análise da expressão da COX-2 a partir das mucosas esofágicas, foi utilizado o protocolo descrito a seguir.

Material

a) Equipamentos:

- Agitador tipo Vortex AP56, *Phoenix*;
- Centrífuga modelo 16, *RDE Equipamentos Científicos LTDA*;
- Espectrofotômetro UV-160, *Shimadzu*;
- Fonte para eletroforese modelo 250, *Life Technologies*;
- Freezer -85°C modelo U41085, *New Brunswick Scientific*;
- Micropipetas Finnpiette[®] 4500, *Labsystems*;
- Termociclador modelo I cyclor, *Bio Rad*;
- Transiluminador de luz ultravioleta Modelo TM-20, UVP.

b) Reagentes:

- Trihidroximetil aminometano (Tris), gelatina, oxalato de tetrametilamônia, trealose, N-dietilnitrosamina (NDEA), *Sigma chemical company, MO, USA*;
- Cloreto de potássio (KCl), cloreto de magnésio (MgCl₂, etanol, formaldeído, etilenodiamina tetracetato (EDTA) dihidratado, formamida, isopropanol, clorofórmio, (Merk, NY, USA);

- Glicerol, (*Reagen, RJ, Brasil*);
- Dietilpirocarbonato (DEPC), (*USB, OH, USA*);
- *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerase, produzida no laboratório de Biologia Molecular e Toxicologia do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UERJ pelo Doutor Rodolpho Mattos Albano;
- Sequências de oligonucleotídeos específicos para cDNA da COX-2 (*Bioneer*) reagente Trizol[®], transcriptase reversa M-MLV (*Invitrogen, SP, Brasil*);
- Sequências de oligonucleotídeos randômicos (*Random Primer*) Desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs), RNAGuard[™], inibidor de RNase (RNAsina), (*Amersham Pharmacia Biotech, SP, Brasil*).

Extração e quantificação do RNA total

O RNA total foi extraído dos tecidos utilizando-se o reagente Trizol, seguindo o protocolo descrito pelo seu fabricante:

1. Homogeneização: cada fragmento de 50-100mg de tecido foi homogeneizado em tubo eppendorf contendo 1ml de trizol e incubado por 5min a TA;
2. Separação e Precipitação: acrescentou-se 0,2ml de clorofórmio a cada tubo, para separar a fase aquosa, sobrenadante contendo o RNA, da fase orgânica, contendo proteínas. Os tubos foram agitados por 15 segundos, incubados por 2min a TA e centrifugados a 12000 x g (centrífuga *eppendorf*, modelo 5415) por 15min;
3. Precipitação do RNA: a fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para tubos novos, e o resto do material foi descartado. Um volume de 0,5ml de isopropanol,

para precipitação do RNA, foi acrescentado à fase aquosa e os tubos foram agitados, incubados por 10min a TA e centrifugados a 12000 x g por 10min;

4. Lavagem: descartou-se o sobrenadante e o precipitado com o RNA total foi lavado com 1ml de etanol 75% (V/V – volume por volume) e centrifugado por 5min a 12000 x g.
5. Quantificação do RNA total: O RNA foi ressuspendido em 20µl de água tratada com 0,1%(V/V) de Dietilpirocarbonato (DEPC) (agente inativador de RNAses). Após, 1µl de solução final contendo RNA foi diluído em água/DEPC 150 vezes, e sua absorbância foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 260nm (λ 260nm), contra um branco contendo 150µl de água. Uma densidade ótica corresponde à concentração de 40 µg/ml de RNA.

Eletroforese de RNA

Com o objetivo de verificar a qualidade do RNA extraído para as reações de RT-PCR, foi realizada a eletroforese em gel de agarose com formaldeído, seguindo o protocolo descrito:

1. Esterilização da câmara de eletroforese com água oxigenada (aprox. 300ml), 3% em H₂O por 30min (para eliminar qualquer vestígio de material biológico e evitar contaminação) e, após, rinsamento com água autoclavada;
2. Preparação do tampão MOPS 5X (proporciona íons para a corrente elétrica ser conduzida pelo gel):
 - a. 0,1 M MOPS- pH 7,0- Molecular Weight (MW) 209g;
 - b. 40 mM de acetato de sódio –MW 82,03g;
 - c. 5mM EDTA –pH 8,0 (quelantes de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ íons co-fatores de RNAses);

3. Preparação do tampão *loading* para a amostra:

- a. 50% de glicerol;
- b. 1mM EDTA –pH 8,0
- c. 0,25% de azul de bromofenol (corante azul).

4. Preparação do gel de agarose 1% (25ml):

- a. 1% agarose P/V (0,25g);
- b. Tampão MOPS 5X (05ml);
- c. Formaldeído 2,2 M [cc estoque=12,3 M] (4,5ml).

Obs: a agarose é dissolvida em água, dentro de um erlenmayer, levada ao forno de microondas em potência forte por aproximadamente 3min e reservada em banho a 60°C. É, então, adicionado o formaldeído e o tampão.

5. Preparação da amostra de RNA:

- a. formamida 5 μ l;
- b. formaldeído 2 μ l;
- c. tampão MOPS 5X 2 μ l;
- d. RNA 2 μ g.

Obs: a amostra é incubada por 5min a 65°C e transferida imediatamente para o gelo. É adicionado 2 μ l de tampão *loading* e brometo de etídio 200ng. O gel com formaldeído é colocado em cuba de eletroforese e esperado sua solidificação (aprox. 3-5min). É acrescido o tampão de corrida (MOPS 1X) e distribuído o material nos poços (*lanes*) do gel. O RNA é então submetido à corrente elétrica de 40V em câmara fechada (o vapor de formaldeído é

tóxico) por 30 minutos e, após, é visualizado em transluminador de luz ultravioleta e fotografado.

Reação de RT

A partir do RNA total, o cDNA foi sintetizado através de uma reação de transcrição reversa com a enzima Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT), seguindo o protocolo de Ferreira e col. (14). Cada tubo de reação continha:

- 2,5µg de RNA total do tecido correspondente ou 2,7µl de RNA do controle positivo;
- 250ng (4µl) de primer randômico;
- Água DEPC 1,3µl.

Após incubação a 65°C por 5min, os tubos foram transferidos para o gelo, sendo adicionados, a cada um, e mantidos a TA por 10min:

- 0,6µl de tampão de RT 5X (concentrado 5 vezes), *Invitrogen*;
- 0,1µl de cada dNTPs a 10mM;
- 0,1µl de RNAsina;
- 0,3µl de DTT 0,1;
- 12µl de trealose 1,5M.

A seguir, esta solução foi aquecida a 37°C por 2min e acrescida de 0,1µl de MMLV-RT contendo 200U. Os tubos foram incubados por 1 hora a 37°C e posteriormente a 70°C por 15min. Ao término da reação, foram armazenados a -20°C até sua utilização para a reação de PCR.

PCR com Taq DNA polimerase

A técnica da PCR foi utilizada para amplificar os cDNAs produzidos a partir da reação de RT, com o RNA total extraído dos tecidos dos animais. O protocolo foi otimizado por Ferreira e col. (14). Cada tubo de reação de 0,2ml continha:

- 2,5µl de tampão da enzima Taq concentrado 10 X (Tris 100 mM, pH 8,5/KCl 500mM/0,1 mg/ml gelatina);
- 0,5µl da enzima Taq polimerase;
- 0,1µl de solução contendo 5mM de cada dNTPs;
- 0,3µl de MgCl₂ a 17mM;
- 0,2µl de oligonucleotídeo bloqueador a 50ng/µl (5'–GCC GGC CAA TGT ACA GTA TTG GCC GGC TTT TGG CGG AGC GAT CAT CTC AGA GCA TTC TTA GCG TTT TGT TCT TGT GTA TGA-3');
- 0,1µl de oxalato de tetrametilamônia a 50mM;
- 0,1µl de primer senso a 100 ng/µl, 0,1µl de primer anti-senso a 100 ng/µl específicos para cada gene, *Bioneer, Korea*;
- 0,3µl de cDNA para iNOS e 1µl de cDNA para COX-2;
- Água DEPC qsp 25µl.

Adicionalmente, foi analisada a expressão de um “house-keeping gene”, que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), utilizado como controle positivo para as reações de RT-PCR.

A ciclagem do termociclador está resumida a seguir (para COX-2):

Pré –desnaturação: 95°C - 5min

Desnaturação: 95°C -45s

Anelamento: 58°-1 min

Extensão: 72°C -1 min

} 32 ciclos

Ciclo adicional: 72°C - 5 min

CDNA	Ciclos	Tm	Pb	Senso	Anti-senso
COX-2	32	58°C	398	GGCCATGGAGTGGACTTAAA	AAGTGGTAACCGCTCAGGTG
GAPDH	35	57°C	220	TGTGAACGGATTTGGTCGTA	TGCCTCCTGGAAGATGGTGA

Figura 4 – Seqüência dos primers (senso e ani-senso), temperatura de anelamento ideal (Tm), n° de bases (pb) para referência no gel e n° de ciclos utilizados para amplificação dos genes COX-2 e GAPDH.

Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose 2% (P/V- peso /volume) foi utilizada para verificar a ampliação do gene COX-2. As amostras foram homogeneizadas com:

- 1/10 do volume de tampão de carregamento;
- 50% (V/V-volume/volume) de glicerol;
- 0,25% (P/V) de azul de bromo fenol;
- 0,25% (P/V) de xileno-cianol.

Após aplicação em gel de agarose 2% (P/V) (0,5 g de agarose, dissolvida em SB 1X, 0,2 M NaOH – pH ajustado para 8,0 com ácido bórico), as amostras foram separadas por eletroforese a 6V/cm em cuba horizontal (GIBCO BRL-HORIZON-58).

O produto de PCR foi corado através de imersão em solução de brometo de etídeo (5 µg/mL – MERK) e o resultado visualizado em transiluminador de luz UV (UVP mod. TM-20). Os dados foram fotografados por sistema de fotodocumentação (sistema Kodak Digital Science ID) e arquivados.

RESULTADOS

Experimento

Foram registrados três óbitos, todos do grupo IV, que receberam NDEA e gavagem esofágica com água quente, sendo dois óbitos com 45 dias de experimento, provavelmente relacionados com aspiração pulmonar, e um óbito ao final do experimento, por debilidade física. A amostra do grupo IV ficou reduzida para 57 animais, dos 60 iniciais, e, da totalidade de animais que integrou todas etapas, para 157 (perda de 1,89%).

Achados macroscópicos

Não foram evidenciados, à necropsia, tumores em outros órgãos, como fígado, estômago e pulmões, identificáveis macroscopicamente. Não foram detectados tumores nos grupos I e II, cujos esôfagos serviram de controle.

Não se observou diferença relevante nas características macroscópicas dos tumores nos grupos de tratamento (III e IV), embora variações na forma e dimensões tenham sido observadas. Lesões menores de 1mm não foram consideradas tumores neste trabalho (Figura 5).



Figura 5 - Aspecto macroscópico de tumor esofágico considerado para contagem.

Número de tumores

Em termos absolutos, o número de tumores contados nos grupos III e IV, no dia 150 do experimento, foi maior no Grupo IV: 13 tumores em 17 peças esofágicas, seguido do Grupo III, com 14 tumores em 20 peças esofágicas. Esta diferença, entretanto, não foi estatisticamente significativa ($p= 0,537$ teste de Mann-Whitney unidirecional). Não houve, portanto, variação no nº de tumores entre os grupos que receberam NDEA e gavagem com água quente ou fria (Tabela 1).

TABELA 1 - N° de tumores encontrados por animal e total por grupo

N° DE TUMORES	GRUPO III*	GRUPO IV**
	Média de tumores= $0,70 \pm 0,92$ (mín. =0 máx. =4)	Média de tumores= $0,76 \pm 0,66$ (mín. =0, máx= 2)
0	9	6
1	10	9
2	0	2
3	0	0
4	1	0
TOTAL	20	17

*Grupo III= gavagem água fria +NDEA; **Grupo IV= gavagem água quente + NDEA.

Achados histopatológicos

Os grupos I e II, que receberam gavagem esofágica com água fria e quente, respectivamente, sem o carcinógeno NDEA, apresentaram características histopatológicas semelhantes durante o experimento (Figura 6).

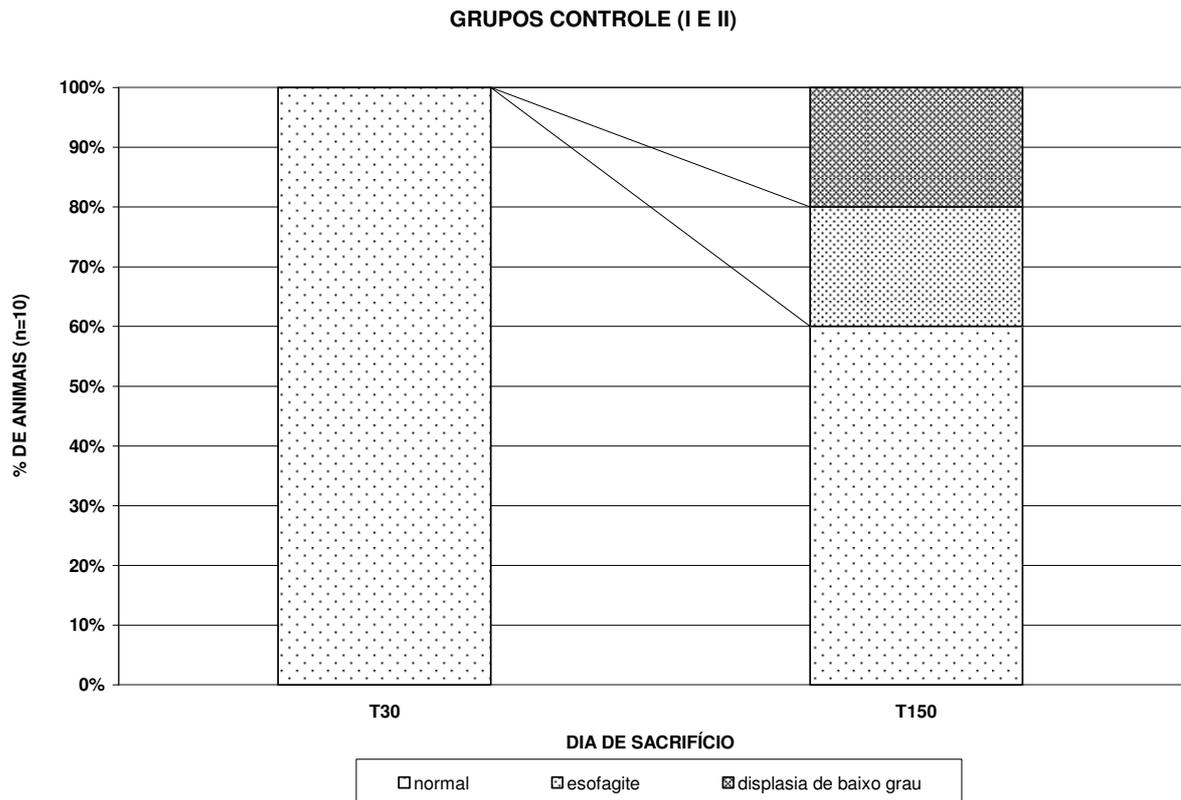


Figura 6 – Proporção relativa dos achados histopatológicos ao longo do experimento nos grupos-controle (sem NDEA). O n em T 30 (dia 0 + 30 do experimento) e T 150 é de 10 animais (cinco de cada grupo).

A evolução das alterações histopatológicas nos grupos III e IV e em ambos conjuntamente como um grupo tratado, pode ser visualizada nas Figuras 7, 8 e 9.

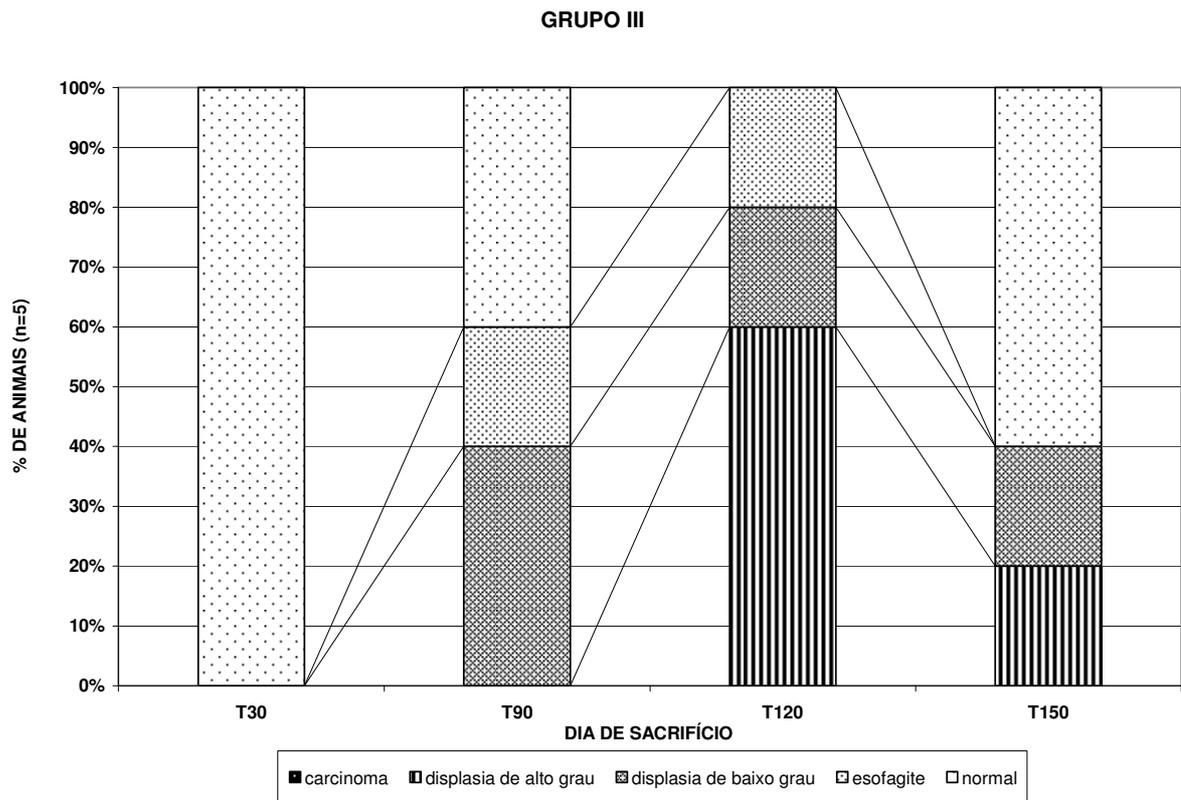


Figura 7 – Proporção relativa dos achados histopatológicos ao longo do experimento no Grupo III (NDEA + gavagem água fria). O n em cada dia de sacrifício é de 05 animais. O T 60 não é mostrado (vide texto).

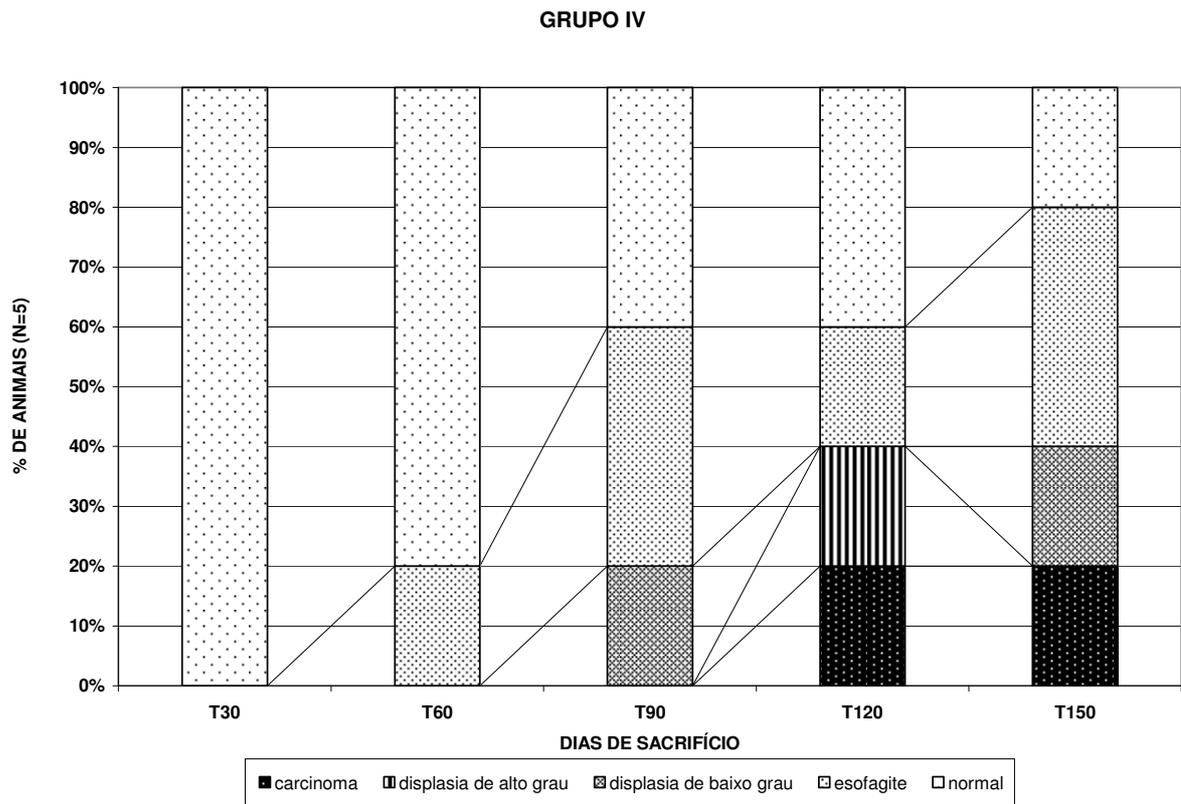


Figura 8 – Proporção relativa dos achados histopatológicos ao longo do experimento no Grupo IV (NDEA + gavagem água quente). O n em cada dia de sacrifício é de 05 animais.

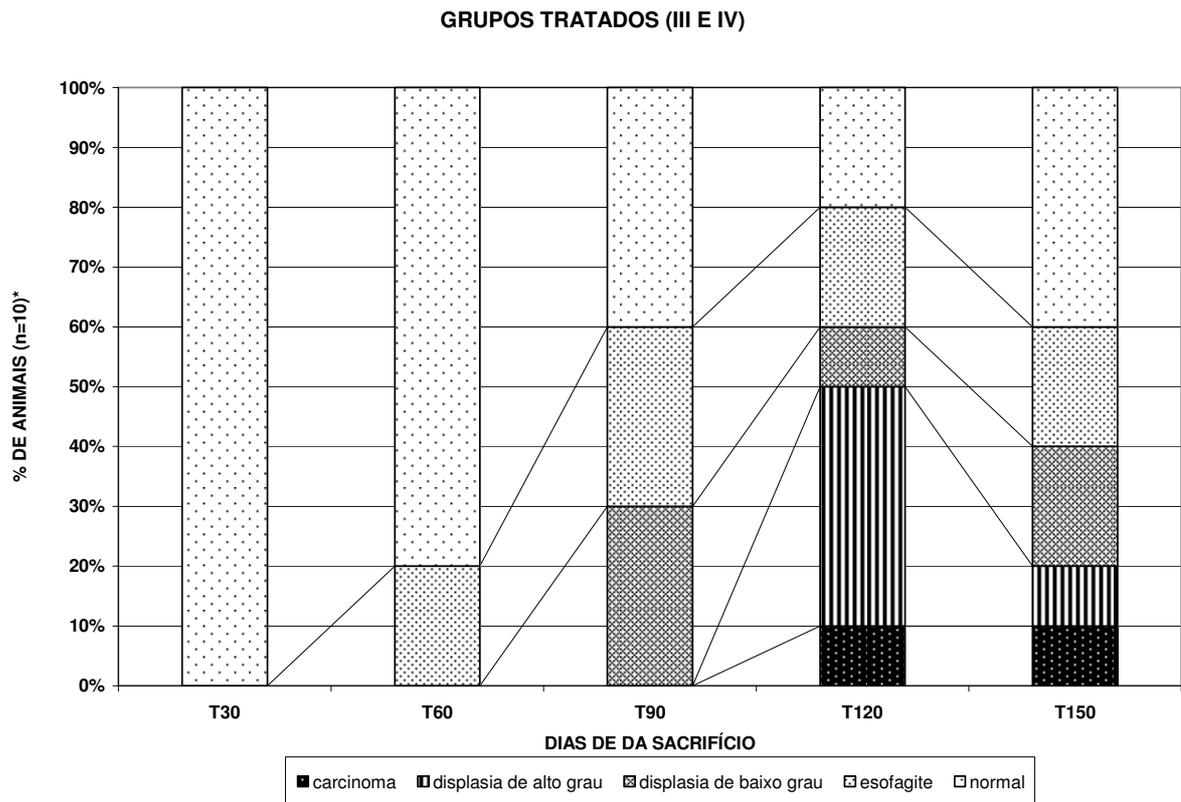


Figura 9 – Proporção relativa dos achados histopatológicos ao longo do experimento no Grupo Tratado (com NDEA). * O n em cada dia de sacrifício é de 10 animais (cinco cada grupo), exceto em T 60 (vide texto).

Aos 30 dias após o início do experimento (T 30), não foram observadas alterações histopatológicas em nenhum dos grupos. Foram testados os grupos III e IV para verificação da distribuição e variação histopatológica das mucosas esofágicas aos 90 e 120 dias de experimento (T 90 e T 120, respectivamente), não se observando diferença estatística ($p=0,717$ e $p=0,287$, teste qui-quadrado de Pearson). O T 60 não foi testado por perda de material.

Foram cruzados os dados de distribuição e alteração histopatológica de todos os grupos aos 150 (final) do experimento, não sendo observada diferença estatística significativa ($p=0,686$, teste de Pearson). Também não houve diferença ao se testar os grupos controles em conjunto contra cada um dos grupos tratados ($p=0,326$).

Considerando-se as alterações na mucosa esofágica como variável dicotômica (esôfago normal e patológico) e atemporal, foram testados os grupos controles em conjunto com cada grupo tratado, não se encontrando diferença estatisticamente significativa ($p=0,199$).

Expressão da COX-2

Inicialmente, foi realizada a amplificação do cDNA da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), utilizado como controle positivo para as reações de RT-PCR (Figura 10).



Figura 10 - RT-PCR para GAPDH RNAm, enzima de controle interno da reação. Controle: grupos I e II; Tratado: grupos III e IV. Pb, padrão de peso molecular (pares de base). T30, 60, 90, 120, 150= dia do sacrifício dos animais a contar do início do experimento. N^{os} 1,3, 5,8, 10, 12 = gavagem esofágica com água fria; N^{os} 2,4,6,7,9, 11, 13= gavagem esofágica com água quente.

A amplificação do cDNA para COX 2 não apresentou banda observável no gel de agarose (Figura 11).



Figura 11 - RT-PCR para COX-2 RNAm. Controle: grupos I e II; Tratado: grupos III e IV. Pb, padrão de peso molecular (pares de base). T30, 60, 90, 120, 150= dia do sacrifício dos animais a contar do início do experimento. N^{os} 1,3, 5,8, 10, 12 = gavagem esofágica com água fria; N^{os} 2,4,6,7,9, 11, 13= gavagem esofágica com água quente.

DISCUSSÃO

Modelo experimental

Este estudo trata-se de um modelo de carcinogênese esofágica em camundongos, induzida pela administração de NDEA na água de beber. Este desenho, aperfeiçoado por Rubio (12, 15,16), mostrou-se muito prático e útil para a verificação de hipóteses.

Animais fêmeas foram utilizados por ser conhecida a questão da morte de animais envolvidos em conflitos para estabelecimento territorial, atitude quase exclusiva dos machos (13). Esta estratégia mostrou-se efetiva, visto que a perda final foi mínima (>1,9%). A alimentação empregada foi semelhante àquela utilizada em diversos experimentos, não devendo ter interferido no processo de carcinogênese.

A escolha da NDEA como carcinógeno baseou-se no seu conhecido efeito em esôfagos de camundongos, além de outros animais, conforme revisto por Verna e col. (17). A concentração de NDEA foi a preconizada em outros trabalhos com este modelo (4,12,16), sendo utilizada a menor dose necessária para indução tumoral sem causar hepatotoxicidade e a mortalidade decorrentes, o que de fato não foram observadas neste experimento (18). O organotropismo pelo esôfago também está de acordo com o que se observa a respeito das enzimas CYP, responsáveis pelo papel mutagênico da NDEA neste órgão (18,19,20,21). A afinidade de uma enzima pelo substrato é determinada pelo seu K_m , que consiste na concentração do substrato (expressa em Moles), que leva a metade da velocidade máxima da reação química. As enzimas do citocromo P450 esofágicas têm um K_m menor que as hepáticas, e quando uma dose baixa de NDEA é administrada por um período prolongado o organotropismo da nitrosamina favorece as CYP do esôfago (18,21). Quando uma dose maior é administrada por período curto, saturando as CYP esofágicas rapidamente, o metabolismo da DEN é deslocado. Como resultado, as CYP hepáticas, com maior K_m e metabolismo 7 vezes maior, são ativadas, resultando em maior incidência de carcinoma hepático (18).

A administração na água de beber tem dupla vantagem da eficiência e da mínima necessidade de manipulação dos animais, embora permita variações de consumo. Zgodziński e col. (22), utilizando ratos, não observaram carcinoma, mesmo após 180 dias de administração de NDEA, injetada diretamente na mucosa esofágica, o que reforça a eficácia da administração oral deste carcinógeno. Isto é explicado pelo fato que a NDEA, sendo uma N-nitrosamina, não tem atividade carcinogênica intrínseca devido à sua instabilidade química, especialmente em pH elevado (18), usualmente produzindo tumores distante do sítio de aplicação.

Resultados e literatura

É conhecida a variação da incidência tumoral dependendo da espécie e do carcinógeno utilizados e do tempo de experimento. Rubio (15), utilizando o modelo preconizado por Clapp e Claig (23) para a carcinogênese, administrou NDEA por 22 semanas a camundongos, sendo estes sacrificados 10 dias após o tratamento. Com sacrifício de 87 animais em aproximadamente 160 dias, este pesquisador encontrou entre 2 e 20 tumores, com média de 7 tumores por animal. Krueel (4), utilizando o mesmo composto e concentração, e acrescentando a gavagem esofágica com água quente, obteve, em 180 dias de experimento, média geral de 0,37 tumores por animal, e média máxima de 1 tumor/animal no grupo com gavagem quente.

No presente estudo, observou-se uma média geral de 0,73 tumores por animal aos 150 dias de experimento, com média discretamente maior com gavagem quente, de 0,76 tumores/animal, não havendo diferença estatística entre gavagem fria e quente ($p=0,537$), ao contrário do observado por Krueel e col. ($P=0,03$) (4). Diferenças no N (37 neste estudo e 51 no de Krueel e col.) e no tempo de sacrifício (150 e 180, respectivamente) podem explicar por que não foi observada maior influência da lesão térmica na carcinogênese esofágica na amostra em foco. Particularidades metodológicas e nas concentrações do carcinógeno, produzido por diferentes laboratórios, também, podem explicar a maior produção de tumores nos trabalhos de Rubio. Este observou que a administração de NDEA, por 90 dias, três vezes por semana, com sacrifício aos 180 dias do início do experimento, produzia um índice tumoral (n° de tumores por cm longitudinal de esôfago) em torno de 5/cm. Com administração de NDEA por 90 ou 120 dias e sacrifício imediato após tratamento, todos os animais apresentavam tumores (16).

Com relação aos achados histopatológicos, estes foram compatíveis com os de Krueel e col. (4,24), observando-se mucosa normal no início do estudo com decréscimo gradual: aos

30 dias, ocorrem modificações do tipo esofagite, as primeiras lesões intra-epiteliais aos 60-90 dias e os primeiros carcinomas aos 120 dias de experimento. É interessante notar que, no estudo em foco, acrescentou-se a gavagem esofágica, sem o carcinógeno, com água fria e quente, procurando observar os efeitos da inflamação por lesão térmica somente, verificando-se o surgimento de esofagite e lesão intra-epitelial de baixo grau ao final do experimento, sem diferença entre a gavagem fria ou quente. Provavelmente, a gavagem esofágica por si só, possa causar lesão na mucosa pelo trauma mecânico, embora de pequena magnitude. Em um estudo semelhante, utilizando gavagem esofágica de camundongos com água quente 3 vezes por semana e carcinogênese com NDEA, Ribeiro e col. realizaram sacrifícios, em 07, 14 e 30 dias, para analisar as alterações na mucosa em três grupos experimentais: G1 – na NDEA água de beber; G2- gavagem com água quente (60 a 70°C) e G3- gavagem com água quente e NDEA. Foi observado que o grupo que recebera apenas NDEA não apresentou alterações histopatológicas ao longo dos 30 dias; o grupo que recebera gavagem com água quente apresentou alterações inflamatórias leves (esofagite), já nos primeiros sete dias, intensificadas aos 14 dias e completamente ausentes aos 30 dias; o grupo com gavagem e NDEA apresentou perfil semelhante ao anterior, exceto que as alterações inflamatórias foram ainda mais intensas aos 30 dias (dados não publicados). Isto sugere um efeito potencializador do carcinógeno agindo sobre um tecido inflamado, e não uma inflamação decorrente da tumorigênese. Será necessário correlacionar estes achados histopatológicos com estudos em biologia molecular, identificando o papel das enzimas pró-inflamatórias neste contexto.

No presente estudo, o carcinoma foi observado somente no grupo que recebeu NDEA e gavagem quente no T120, sem diferença estatística com relação à gavagem fria, provavelmente devido ao N reduzido. Ainda que se verificasse diferença, esta provavelmente seria apenas quantitativa, pois, no estudo de Kruehl (24), não houve gavagem, e o carcinoma surgiu no mesmo período, independentemente de estímulo inflamatório adicional. Com

relação ao N, Gurski e col., apresentando mais de 40 animais por grupo, neste mesmo modelo, não encontrou diferenças histopatológicas aos 180 dias, entre os que receberam somente NDEA, e NDEA + etanol, NDEA + NNN (N-nitrosornicotina), e NDEA + NNN +etanol (p=073) (25). Krueel observou percentual de carcinoma invasor de 9,5 aos 150 dias e de 26.5 aos 180 dias (24), evidenciando uma clara eclosão de tumores invasores a partir de T150. Optou-se, no entanto, em não prolongar o experimento além do 150º dia, uma vez que já se obteria uma amostra de todo o processo tumorigênico neste tempo. Dessa forma, foi possível acompanhar toda cronologia da histogênese do CEE, possibilitando a detecção do momento em que se observaria a COX-2 na mucosa, sua relação com a histopatologia e se haveria diferença entre os grupos. Também se optou por não fazer um grupo controle, sem NDEA ou gavagem, visto que Krueel não encontrou nenhuma alteração histopatológica em tal grupo em seu estudo, já citado, e também em Gurski e col. (25). Convém ressaltar que se procurou observar a expressão da COX-2 na carcinogênese esofágica, acrescentando-se a variável da lesão térmica-promotor comum em nosso meio-adaptando-se o modelo experimental a estes objetivos.

Expressão da COX-2

No presente estudo, não foi evidenciada expressão do RNAm da COX-2 em nenhum dos grupos, não sendo possível diferenciação portando. Este dado é significativo, uma vez que a técnica do RT-PCR é muito sensível. O método utilizado neste trabalho segue o protocolo descrito por Ferreira e col. (14), que otimiza a técnica permitindo a detecção de RNAm específicos de uma única célula isolada. Neste modelo experimental, a verificação de tumores, a partir dos 120 dias de estudo, está bem demonstrada por Krueel e reproduzido aqui. Já a associação entre COX-2 e CEE (e adenocarcinoma) está bem estabelecida na literatura, seja por imuno-histoquímica, RT-PCR ou western-blotting. No entanto, a expressão da COX-2

neste modelo específico ainda não havia sido verificada. Li e col. observaram a expressão da COX-2 por RT-PCR semiquantitativo em esôfagos de ratos tratados com N-nitrosometilbenzilamida (NMBA). Nesse modelo, houve aumento de 5 vezes da expressão da COX 2 em relação à mucosa normal, porém, todos os animais foram sacrificados ao final das 24 semanas do experimentos, não podendo se verificar em que momento da carcinogênese iniciaria a expressão da COX 2 (26). Shama e col., analisando peças cirúrgicas de CEE em humanos, observaram a relação entre a intensidade da expressão imuno-histoquímica da COX 2 através de um *escore imuno-reativo* (porcentagem de células positivas para COX 2 X intensidade da marcação) e o grau de lesão da mucosa esofágica, com forte presença da enzima na displasia de alto grau. Entretanto, tratava-se de esôfagos patológicos, sem a possibilidade de determinar o início da atividade da COX 2 e seu papel como promotora tumoral (27). A mesma condição observa-se no estudo de Zimmermann e col. Estes autores salientaram a necessidade de estudos com mucosas esofágicas normais de pessoas sem câncer para determinar o real papel da COX 1 e 2. A análise imuno-histoquímica revelou marcada heterogeneidade inter-tumoral na expressão da COX 2, destacando a dificuldade de determinar se o sinal detectado é realmente das células neoplásicas e não de células do estroma, não neoplásicas (28). Isto reforça a importância de estudos experimentais que permitam a verificação por todas as fases da carcinogênese, evitando contaminação cruzada.

Embora não se tenha verificado expressão da COX-2 neste estudo, em outro experimento com o mesmo desenho, à gavagem esofágica foi acrescida a administração de *Ilex paraguayensis* liofilizada com a água quente ou fria. Aos 120 dias de experimento (T120), observou-se forte expressão de COX-2 e iNOS apenas no grupo que recebera gavagem quente e ilex, sem indução tumoral (dados não publicados). Este achado sugere a necessidade de um aprofundamento no estudo da erva-mate e seu papel na inflamação e na carcinogênese esofágica, e não apenas na lesão térmica.

Com relação à coleta de material, a técnica de RT-PCR apresenta algumas vantagens. É necessária uma quantidade pequena de material, dada a sensibilidade do método, bastante atraente quando se propõe estudos em humanos; a conservação é simples, bastando o reagente (p.ex., Trizol[®]), não sendo necessários métodos físicos mais sofisticados, como resfriamento com nitrogênio líquido (e.g., *western blotting*); a objetividade dos resultados é maior com os métodos semi-quantitativo e quantitativo em relação à imuno-histoquímica. Os estudos de Zimmermann e Shama mostraram resultados similares na expressão da COX 2 nos três métodos supracitados, demonstrando que a expressão proteína é regulada no nível transcricional. Portanto, a presença de RNAm no tecido é sinal fidedigno e proporcional da presença da enzima.

Quimioprevenção

A importância dos modelos em animais no contexto do estudo da carcinogênese esofágica deve ser destacada. Ainda que a extrapolação para humanos deva ser feita com cautela, o aprofundamento dos conhecimentos sobre a patologia nestes desenhos experimentais deve ser explorada ao máximo. A divulgação recente de um ensaio clínico para quimioprevenção de pólipos adenomatosos com Vioxx[®] (rofecoxib), um inibidor seletivo da COX-2, alertou para a questão do curto-benefício do emprego desta classe de medicamentos, uma vez que foi observado um aumento dos eventos trombóticos cardiovasculares (IAM e AVC) no grupo tratado com relação ao controle (risco relativo de 1.92; 95% intervalo de confiança, 1.19 a 3.11; P=0,008), ainda, que a mortalidade cardiovascular geral tenha sido idêntica nos dois grupo (29). Talvez seja necessário voltar aos modelos experimentais procurando alternativas, como a inibição da produção mais seletiva da PGE2 em etapa imediatamente anterior, ou focalizar em outras enzimas associadas à inflamação e carcinogênese (p.ex, lipooxigenases e iNOS).

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Na pesquisa em foco, com inflamação carcinogênica associada a lesão térmica, a progressão das alterações histopatológicas mostrou-se compatível com a literatura, ainda que a temperatura da água não mostrasse influência significativa na histogênese e tumorigênese. O RNAm da COX-2 não foi expresso, devendo-se reavaliar e aperfeiçoar este modelo para futuros estudos em quimioprevenção. O papel da *Ilex paraguayensis* associada à lesão térmica constitui-se em promissora linha de pesquisa a ser explorada, com importante relevância e repercussão em nosso meio.

REFERÊNCIAS

1. Stoner GD, Gupta A. Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogen* 2001; 22(11):1737-46.
2. Koshy M, Esiashvilli N, Landry JC, Thomas Jr CR, Matthews RH. Multiple Management Modalities in Esophageal Cancer: Epidemiology, Presentation and Progression, Work-up, and Surgical Approaches. *The Oncologist* 2004; 9:137-46.

3. Pinto LF, Albano RM, Guimarães DP. Câncer de Esôfago e Estômago. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Atheneu; 2004:155-64.
4. Kruel C, Gurski R, Golbert L, Da Luz L, Ferreira M. Effect of thermal injury and the oral administration of diethylnitrosamine in the development of esophageal tumor in mice. In: Peracchia A, Rosati R, Bonavina L, Fumagalli U, Bona S, Chella B. *Recent advances in Diseases of the esophagus*. Bologna: Monduzzi, 1997:37-40.
5. Coral RP, Gabiatti G. Carcinoma epidermóide de esôfago. In: Rohde L. *Rotinas em cirurgia digestiva*. São Paulo: Artmed, 2005; 12:91-5.
6. de Barros SG, Ghisolfi ES, Luz LP, Barlem GG, Vidal RM, Wolff FH, et al. High temperature “mate” infusion drinking in a population at risk for squamous cell carcinoma of esophagus. *Arq Gastroenterol* 2000;37(1):25-20.
7. Chemoprevention Working Group. Prevention of cancer in the next millennium: Report of the Chemoprevention Working Group to the American Association for Cancer Research. *Cancer Res* 1999; 59:4743-58.
8. Sporn MB, Nanjoo S. Chemoprevention of cancer. *Carcinogen* 2000; 21:525-30.
9. Xie W, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2692–6.
10. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS 10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 1991; 266:12866-72.

11. National Institutes Of Health. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council. Washington: National Academy Press; 1996.
12. Rubio CA. Further Studies on the Therapeutic Effect of Indometacin on Esophageal Tumors. *Cancer*, 1986; 58:1029-31.
13. Krueel CDP, Pan Chacon J. Classificação citopatológica das lesões precursoras do carcinoma escamoso do esôfago: modelo experimental em camundongos. Tese [Doutorado]. Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina; 1992.
14. Ferreira ABR, Pinto LFR, Albano, RM. An optimized reverse transcription-polymerase chain reaction procedure for the amplification of low-copy Cyp2a3 mRNA in rat esophagus. *Analyt biochem* 2003; 319:323-6.
15. Rubio CA. Epithelial lesions antedating esophageal carcinoma. Histologic study in mice. *Pathol Res Pract* 1983; 176:269-75.
16. Rubio CA, Liu F, Chejfec G, Sveander M. The induction of esophageal tumors in mice: dose and time dependency. *In Vivo* 1987; 1:35-8.
17. Verna L, Whysner J, Williams GM. N-Nitrosodiethylamine Mechanistic Data and Risk Assessment: Bioactivation, DNA-Adduct Formation, Mutagenicity, and Tumor Initiation. *Pharmacol Ther* 1996; 71(1/2):57-81.
18. Sallet JA, Zilberstein B, Andreollo NA, Eshkenazy R, Pajecki D. Experimental esophageal carcinogenesis: technical standardization and results. *Diseases of the Esophagus* 2002; 15:278–281.
19. 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. *Carcinogen* 1984; 5(10):1337.

20. Ribeiro Pinto LF. Differences between isoamyl alcohol and ethanol on the metabolism and DNA ethylation on N-nitrosodiethylamine in the rat. *Toxicol*, 2000; 151(1-3):73-9.
21. Pinto LF, Moraes E, Albano RM, Silva MC, Godoy W, Glisovic T, et al. Rat oesophageal Cytochrome P450 (CYP) mono-oxygenases system: comparison to the liver and relevance in N-nitrosodiethylamine carcinogenesis. *Carcinogen* 2001; 22(11):1877-83.
22. Zgodziński W, Zinkiewicz K, Juśkiewicz W, Szumiło J, Wallner G. Diethylnitrosamine may induce esophageal dysplasia after local intramural administration; 2003.
23. Clapp NK, Craig AW. Carcinogenic effects of diethylnitrosamine in RF mice. *J Natl Cancer Inst* 1967; 39:903-16.
24. Krueel CDP, Prolla JC, Diehl AS, Putten AC. A New Cytopathological Classification of Esophageal Carcinoma Precursor Lesions. Experimental Model in Mice. In: Peracchia A, Rosati R, Bonavina L, Fumagalli U, Bona S, Chella B. Recent advances in Diseases of the esophagus. Bologna: Monduzzi, 1996:127-131.
25. Gurski KK, Schirmer CC, Krueel CK, Komlos F, Krueel CDP, 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.
26. Li Z, Shimada Y, Kawabe A, Sato F, Maeda M, Komoto I, et al. Suppression of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats by JTE-522, a selective COX-2 inhibitor. *Carcinogen* 2001; 22(4):547-51.

27. Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, Okami J, Kondo M, Fujiwara Y, et al. Up-regulation of Cyclooxygenase in squamous Carcinogenesis of the esophagus. *Clin Cancer Res*, 2000; 6:1229-38.
28. Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schrör K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res*, 1999; 59:198-204.
29. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, et al. Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx (APPROVe) Trial. *N Engl J Med* 2005; 352:1092-102.

Artigo em Inglês

**EXPRESSION OF COX-2 ASSOCIATED TO THERMAL INJURY AND
INDUCTION OF ESOPHAGEAL CARCINOGENESIS BY
DIETHYLNITROSAMINE: EXPERIMENTAL MODEL IN MICE**

ABSTRACT

Introduction: The epidermoid carcinoma of the esophagus appears in a high incidence in southern Brazil, particularly at Rio Grande do Sul. The habit of drinking hot beverages, especially the mate, has been pointed as a co-factor. Because of the elevated morbi-mortality still present despite the therapeutic advances observed in the last few decades, a new approach -the chemoprevention – using selective inhibitors of COX-2, has been a subject of experimental studies, in order to improve the prognosis of this neoplasia.

Objective: evaluate the expression of COX-2 associated to thermal injury in experimental model of esophageal carcinogenesis in mice.

Methods: A hundred and sixty female mice (*Mus musculus*, breed CF1) were studied. The animals were divided into four groups: groups I and II (controls), received esophageal gavage for tap and hot (60-70°) water infusion, respectively, killed at the 30th and 150th days of experiment (T30 and T150); groups III and IV(treated), received esophageal gavage for ambient temperature (AT) and hot (60-70°) water infusion, respectively, and induction of carcinogenesis with DEN in drinking water three times a week till the end of the study, and killed at the 30th , 60th , 90th , 120th

and 150th days (T30, T60, T90, T120 and T150); the esophagus were analyzed for histopathological alterations and COX-2 mRNA expression by RT-PCR reaction.

Results: there were no difference in the number of tumors among group III and IV (mean of 0,70 and 0,76, respectively, $p=0,537$) the distribution of the histopathologic alterations was compatible with other studies in literature. Also, no differences were observed among groups. There was no expression of the COX-2 mRNA in any of group.

Conclusion: There was no expression of the COX-2 mRNA or tumor promotion influence of the thermal injury in this experiment. The model may be further adapted for future studies on chemoprevention.

INTRODUCTION

In a global scale, cancer of esophagus is the eighth most common malignant neoplasia, with a variable geographic distribution (1). Observing the two most frequent histologic types - the epidermoid carcinoma of the esophagus (ECE) and the adenocarcinoma (ADE) – different incidences are noticed, not only among regions, but also among different ethnic groups at a given area (1,2). At the emerging nations the ECE is still the predominant histologic type with prevalence of 93%(3). In the last few years, however, there was an increase on incidence of adenocarcinoma at western developed countries, surpassing the ECE (2). In Brazil, Rio Grande do Sul is the state with the highest incidence, presenting 22,32 cases per 100000 inhabitants/ year – a middle incidence zone – and mortality rate of about 16,21/ 100000 inhabitants in 2003, the second cause of death by cancer among men(4,5). The habit of drinking the mate, an infusion of

Ilex paraguayensis, with hot water (about 70° C) is thought to be a risk factor for ECE in this state(6).

The ECE is notorious for its aggressive biological behavior, spreading to the adjacent tissues and lymph nodes, and an important hematogenous dissemination, which is responsible for its poor prognosis, despite the technical advances of the surgical approach. The extensive lymphatic drainage to mediastinum, which links to the cervical and abdominal chains, is responsible for the mediastinum, supraclaviculares and celiac metastasis, found in 75% of patients at diagnosis. The 5 year survival is 5 to 12% for treated tumors.

Because of the high incidence of locally advanced disease with microscopic metastasis, almost always present before and attempt of resection, resulting in local and systemic recurrence, an increasing interest in multimodal approaches can be noticed, as neoadjuvant or adjuvant chemotherapy and radiotherapy, combined radio-chemotherapy. Yet, in order to improve the prognosis of ECE and other digestive tumors, the chemoprevention pharmacological approach to stop or reverse carcinogenesis (7, 8) –has been given intense attention, specially for colon adenocarcinoma, and, more recently, for the cancer of esophagus too. New pharmacological agents are under evaluation, specially the selective inhibitors of the cyclo-oxygenase-2 (COX-2). The connection of this enzyme with chemoprevention and ECE is related with the increasing interest on aspirin and other non steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs) to be used in the prevention of colorectal cancer.

COX-2 is also named prostaglandin H2 synthase-2 (PGHS-2), more often in American literature. COX-1 and COX-2 are isoforms of this enzyme responsible for the first stage oxidation of arachidonic acid to produce the prostanoids. COX-1 is usually expressed in most cellular types,

a constitutive or house-keeping enzyme, with the same concentration in physiologic and pathologic conditions. Inversely, COX-2 is usually absent in most cells, but its expression increases rapidly (within 2-4h) in inumerous pathological states, most often inflammatory processes. Furthers studies showed that the overexpression of COX-2 was induced by a number a growth factors and mitogens, not only by a tumor promoter or a viral oncogen, as reported in the inicial studies from Xie (1990) and Kujubu (1991) (9, 10), making this isoform particulary relevant to processes of cell growth and carcinogenesis, and yet, as a target for pharmacological agents used in chemoprevention.

The aim of this study is evaluate de expression of COX-2 in a model of experimental esophageal carcinogenesis in mice associated to thermal injury, reproducing a relevant risk factor at southern Brazil, and test the experimental model for future studies of chemoprevention.

METHODS

Experimental Surgery

Approvement

This research was submitted to the scientific comission of the Health's Ethics and Research Comission of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and approved in january 22, 2004 (protocol number: 03-467).

Animals

A total of female mice (*Mus musculus*, breed CF1) were studied, with 60 day of age, mean weight of 30 grams, from the Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) biotery. The animals wer kept at the Animal Experimentation Research Center of Hospital de

Clínicas de Porto Alegre (HCPA) in normal umidity (45-95%), temperature (19 - 21°C), air flux and dark/light cycles of 12 hours (light -9:00 to 21:00). All animals were adapted to these conditions 7 days prior the beginning of experiment, at the aforementioned center. All ethical principals were observed concerning to manipulation of the animals, avoiding needless pain or discomfort during the procedures.

Experiment

The animals were divided in groups of 10 per cage. Since the first day of experiment the so call Treated group received in drinking water the carcinogenic agent diethylnitrosamine (DEN, CAS: 55-18-5) at the concentration of 0,04 ml /1000ml, offered during three consecutive days weekly, as described by Rubio (12) and Krueel (13), along with standard feeding. The water was available from the public system supply. The animals were submitted to esophageal intubation (gavage) with hot (60 -70°C) water or ambient temperature (AT) – 17 a 21°C – water according to the specific group. An especially design needle was used for this purpose. The gavage was done once a week, during the total period of the experiment.

The groups distribution are described: Controls - 20 animals per group, with sacrifice at the 30th (10 per group) and the 150th day (10 per group): group I – AT water given by gavage; group II – hot (60-70°C) water given by gavage. Treated - 60 animals per group, with sacrifice at the 30th (10 per group), 60th (10 per group), 90th (10 per group), 120th (10 per group) and the 150th (20 per group): group III – DEN + AT water given by gavage; group IV – DEN + hot (60-70°C) water given by gavage. At the assigned day the animals were killed at a CO₂ chamber and have their esophagus extracted.

MATERIALS

The entire extracted esophagi were collected for COX-2 mRNA analysis by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and histopathological classification. At the 150th day, the esophagus of the twenty animals left of each group had tumor count. Tumors of 1 mm or more were considered.

Histopathology

The histological sections were analyzed by two independent pathologists, using optic microscopy and classified according as follows: normal histology, esophagitis, low grade dysplasia, high grade dysplasia and invasive carcinoma.

RT-PCR

Once conserved in Trizol[®], the esophageal specimens were preserved at -20°C until final analysis. The COX-2 expression at the organ mucosa was detected using the Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) protocol described by Ferreira et alii (14).

RT reaction: From the total RNA, cDNA was produced through reverse transcription using the enzyme Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT). The reaction was heated to 37°C during 2 minutes before the addition of $0,1\ \mu\text{l}$ MMLV-RT (200U) solution. After that the material was incubated for an hour at 37°C and 70°C for 15 minutes more.

PCR reaction: The PCR reaction amplified the cDNA generated in the previous RT reaction, formed from total esophageal mucosa RNA. The protocol was optimized by Ferreira et alii (14) using a blockage oligonucleotide (5'–GCC GGC CAA TGT ACA GTA TTG GCC GGC TTT TGG CGG AGC GAT CAT CTC AGA GCA TTC TTA GCG TTT TGT TCT TGT GTA TGA-3'). A “house-keeping” gene expression was used, encoding the enzyme glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase (GAPDH), as a positive control for the RT-PCR reaction. The thermocycler program and the primers for COX-2 and GAPDH is presented in figure 1.

Agarose gel electrophoresis was runned to verify the RT-PCR reaction for COX-2 mRNA (Ultraviolet transilluminator UVP model TM-20).

Pre –denaturation: 95°C – 5 minutes

Denaturation: 95°C -45 seconds

Annealing: 58° C -1 minute

Extention: 72°C -1 minute

32 cycles

Additional cycle: 72°C - 5 minutes

cDNA	Cycles	Tm	Pb	Sense	Anti-sense
COX-2	32	58°C	398	GGCCATGGAGTGGACTTAAA	AAGTGGTAACCGCTCAGGTG
GAPDH	35	57°C	220	TGTGAACGGATTTGGTCGTA	TGCCTCCTGGAAGATGGTGA

Figure 1 – Primers (sense and anti-sense), ideal annealing temperature (Tm), pair-bases (pb) number of cycles for COX-2 and GAPDH gene amplification.

RESULTS

Experiment

Three death wer registered, all in the group IV (DEN + infusion of hot water), two within 45 day of experiment, related to pulmonary aspiration and one at the end of the study caused exhaustion, summing a total loss of 1,89%.

Macroscopy

No other tumors (liver, stomach, lungs), but esophageal, were observed. In the group I and II any tumor were detected. There were no relevant macroscopic differences among tumor of the

treated group (III and IV), although variations in shape and dimensions existed. Tumors less than 1 mm were not accounted

Number of tumors

The number of tumors were higher in the group IV, in absolute terms, but the difference was not of statistical significance, compared to group III at the 150th day of the (p= 0,537 one-tailed Mann-Whitney test). So, there was no difference between groups that received DEN and infusion of tap or hot water (Table 1).

TABLE 1 - Total Number of tumors and per animal

Number of TUMORS	GROUP III* Mean = 0,70 ± 0,92 (min. =0 max. =4)	GROUP IV** Mean = 0,76 ± 0,66 (min. =0, max= 2)
0	9	6
1	10	9
2	0	2
3	0	0
4	1	0
TOTAL	20	17

*Group III= gavage for tap water +DEN; **Group IV= gavage for hot water + DEN.

Histopathological findings

The group I and II (infusion of AT and hot water, respectively, no carcinogen), presented similar histopathological findings (Figure 2)

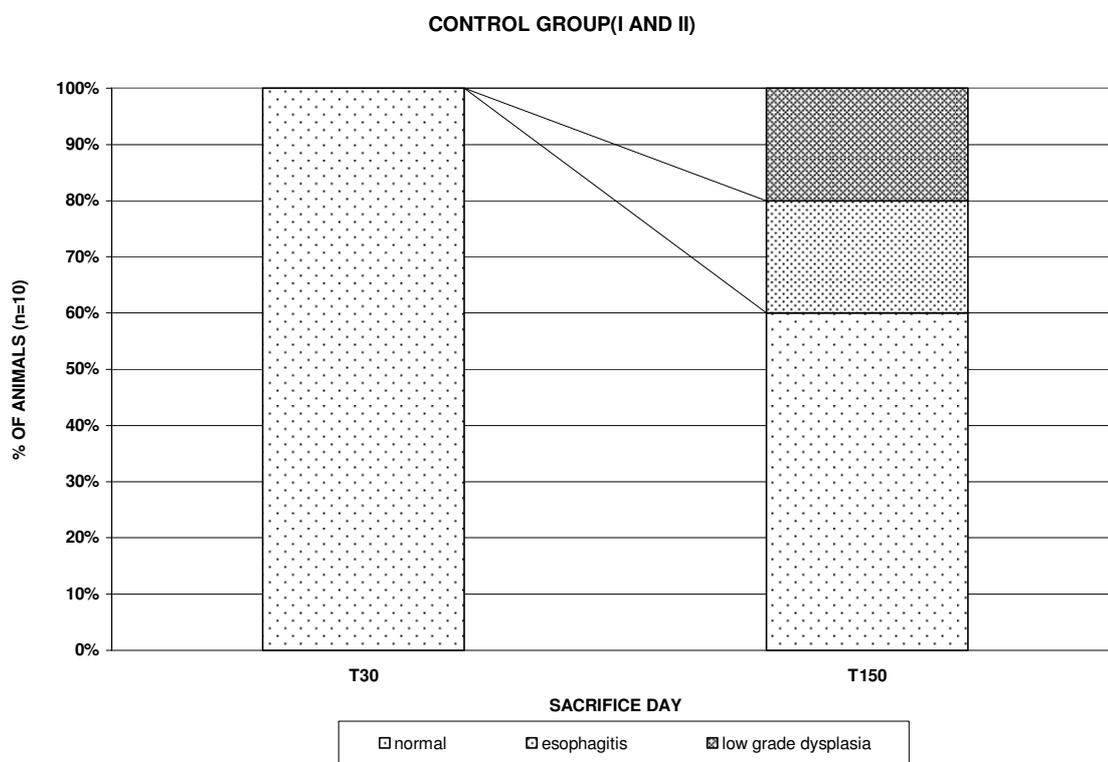


Figure 2 – histopathological findings of the control group (I and II). N= 10, 5 per group. T30= day 0 plus 30 of the experiment)

The histopathological findings of groups III and IV are presented in figures 3, 4 and 5.

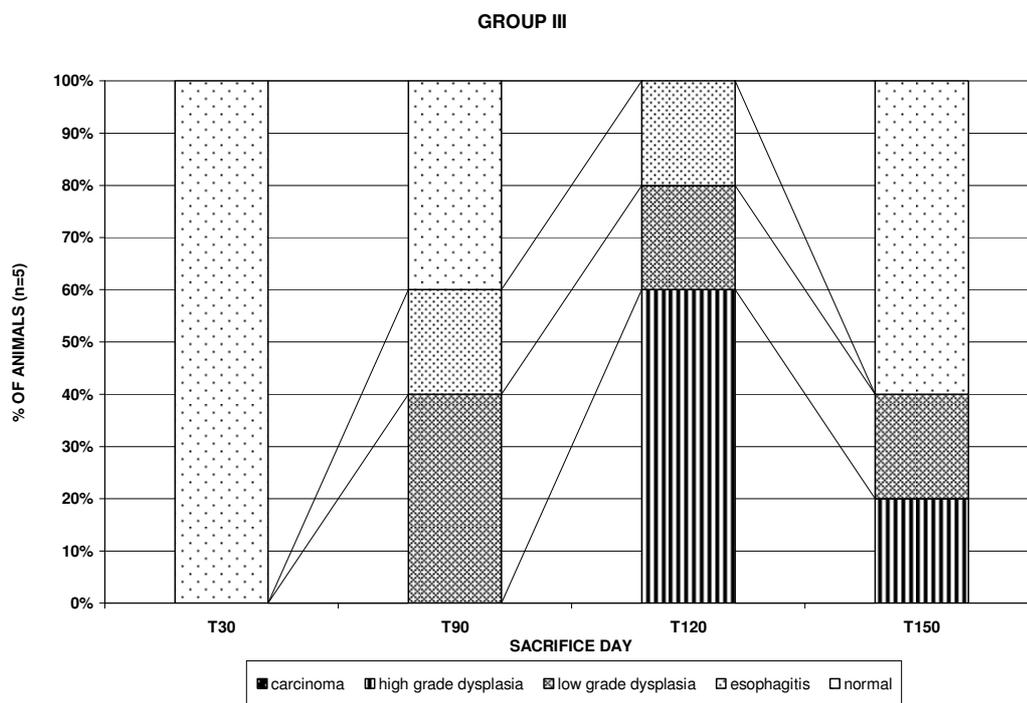


Figure 3 –Histopathological finding of grou III (DEN + infusion of AT water). N= 5.T60 is ot shown (see explanation on the text).

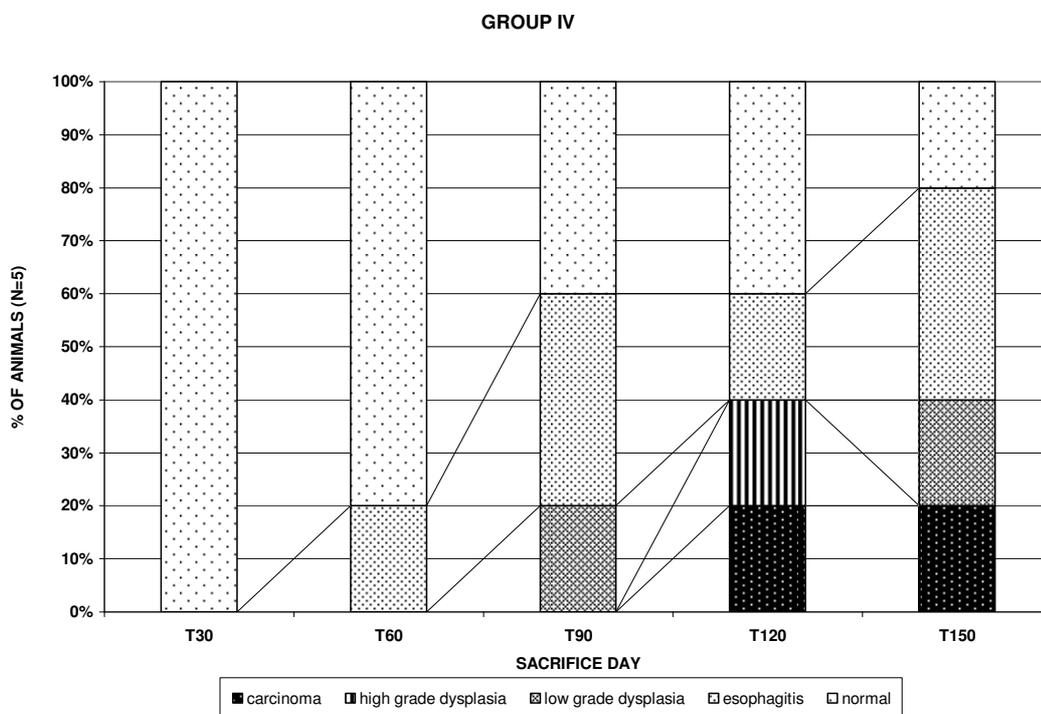


Figure 4 – Histopathological finding of grou IV (DEN + infusion of hot water). N= 5.

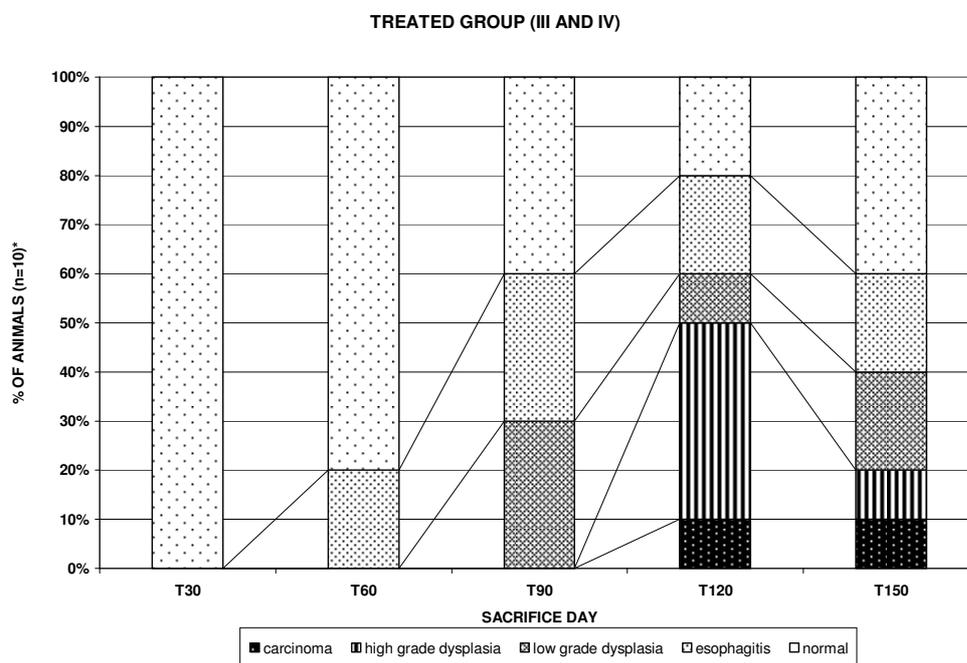


Figure 5 - Histopathological findings of treated groups (groups III and IV, infusion of hot and AT water + DEN) N= 10. T60 is at shown (see explanation on the text).

Thirty days after the beginning of the experiment (T30) no histopathological alterations were observed in any group. The groups III and IV were statistically tested for differences in distribution of histopathological alterations on esophageal mucosa at the 90th and 120th days of experiment (T90 and T120, respectively), but no significant difference was observed ($p= 0,717$ e $p= 0,287$, Pearson chi-square test). T 60 was not tested due to loss of material.

The histopathological features and distribution were crossed at the 150th day of the study for all groups and no statistical significance was observed ($p= 0,686$, test Pearson). No statistical difference was obtained also when both control groups were compared to which of the treated (DEN) group ($p= 0,326$).

Taking the histopatologic alterations of the esophageal mucosa as a dicotomic variable (normal and pathologic mucosa) in the whole study (all times), no difference was observed among control and treated groups ($p=0,199$).

COX-2 expression

The amplification of the enzyme Glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA was carried at first as a positive control for RT-PCR reactions (Figure 10).

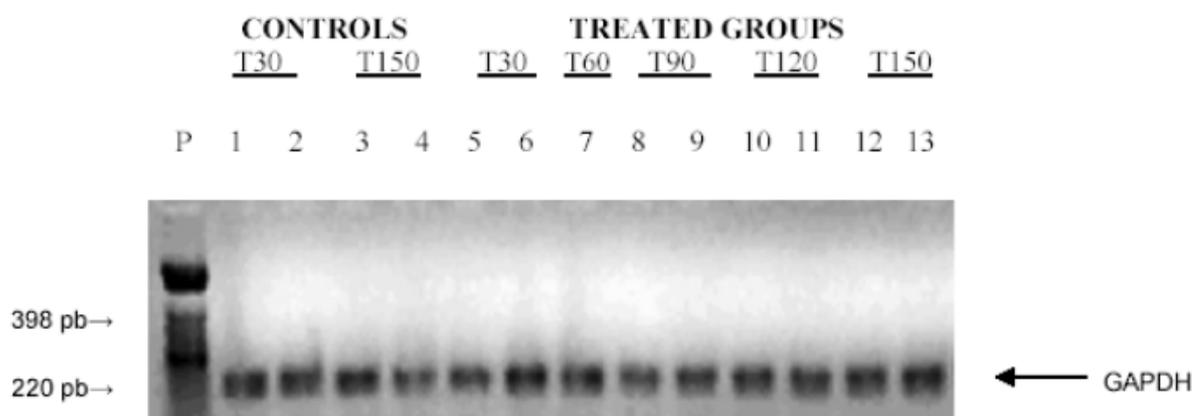


Figure 6 - GAPDH mRNA RT-PCR reaction internal control enzyme. Control: groups I e II; Treated: groups III and IV. Bp= base pair, P= molecular weight standard. T30, 60, 90, 120, 150= sacrifice day from the first experiment day. N^{os} 1,3, 5,8, 10, 12 = infusion of AT water by intubation; N^{os} 2,4,6,7,9, 11, 13= infusion of hot water by intubation.

The amplification of COX-2 cDNA was not detected (Figure 7).



Figure 7 - COX-2 RNAm RT-PCR. Control: groups I e II; treated: groups III and IV. Bp= base pair, P= molecular weight standard. T30, 60, 90, 120, 150= sacrifice day from the first experiment day. N^{os} 1,3, 5,8, 10, 12 = infusion of AT water by intubation; N^{os} 2,4,6,7,9, 11, 13= infusion of hot water by intubation.

DISCUSSION

Experimental model

This study consists in a model esophagel carcinogenesis in mice, induced by DEN administered in drinking water. This model, consolidated by Rubio (12, 15, 16), proved practical and useful for hypothesis verification.

Female animals were used because of death related to territorial conflicts, a almost exclusive male behavior (13). The strategy proved effective, with minimal loss of animals (>1,9%). The feeding was compatible with the uses in others experiments, apparently not affecting the carcinogenic process.

The choice of DEN as the carcinogenic agent was based at its known effects in mice esophagus, as well as organs in other animals, reviewed in Verna et al. (17). The dose was established in other studies with this same model (4, 12, 16), using the least dose needed for tumoral induction, with minimal hepatotoxicity and mortality, achieved in the current experiment (18).

The esophageal organotropism was compatible to the observation regarding the Cytochrome P450 (CYP) enzymes, responsible for the mutagenic action of DEN within the organ (18, 19, 20, and 21). The affinity of the enzyme to its substrate is determined by the K_m , which is the substrate concentration (in Moles) that leads to half the speed of chemical reaction. The esophageal CYP enzyme have a lower K_m compared to the hepatic CYP enzymes, and when a low dose of DEN is given for a long period of time this nitrosamine organotropism favor the esophageal CYPs(18,21). When a higher dose is administered during a short period of time, quickly surpassing metabolic activity of the esophageal CYP enzymes, the metabolism of DEN migrates resulting in hepatocarcinoma, once the hepatic CYP enzymes, with higher K_m and 7 times metabolism higher are activated (18).

The administration of DEN in drinking water has the advantage of efficacy and minimal manipulation of the animals.although some variability of consumption may occur. Zgodziński at alli (22), in a rat model, where not able to produce cancer, even after 180 days of administration of DEN directly, by injection, at esophageal mucosa, which confirms the efficacy of oral administration of this agent in producing carcinogenesis. It is explained by the fact that DEN, as an N-nitrosamine, have not iontrinsic carcinogenic activitydue tos its chemical instability, particulary at high pH (18), promotuing tumorigenesis far from the site of application.

Results and literature

The variation of the tumoral incidence depending on the animal species, carcinogenic agent and time of the experiment is well known. Rubio (15), using a mice carcinogenesis model preconized by Clapp and Claig (23), administered DEN during 22 weeks, sacrificing the animals 10 days after. In a total of 87 animals after 160 days of experiment, the researcher found 2 to 20 tumors, and a mean of 7 tumors per animal. Krueel (4), using the same carcinogenic agent and

concentration, adding hot water by esophageal intubation, observed, after 180 days of study, a mean of 0, 37 tumours per animal, with a maximum of 1 tumor/ animal in the group that received hot water. In the current study a mean of 0, 73 tumor per animal, in the whole group, was observed after 150 days of experiment. The group IV DEN+ hot water) presented a slightly higher mean (0, 76 tumor/ animal), but no statistical significance was observed ($p=0,537$), contrasting to Krueger et al (1984) (4). A different number of animals (37 in current study versus 51 in Krueger et al) and the time of the sacrifice (150 and 180, respectively) may, perhaps, explain why was not observed influence of thermal injury in this study. Methodological particularities and slight variations in carcinogen's concentration, produced by different laboratories may also explain the substantially higher tumorigenesis observed in Rubio's studies. This researcher observed that the administration of DEN during 90 days, three times a week, with sacrifice 90 days later produced a tumor index (number of tumors per cm of esophagus extension) of about 5 /cm. After administration of DEN during 90 or 120 days, immediately sacrificing the animals, all subjects presented tumors.

Regarding the histopathological findings, these were compatible to the studies of Krueger et al (1984), observing a normal mucosa at the beginning of the experiment and a gradual alteration: around the 30th day esophagitis is observed; the first intra epithelial lesions are seen at 60th -90th day the first carcinoma at the 120th day. In the current study is important to notice that was added a control group with esophageal intubation and infusion of tap or hot water without the carcinogen in order to verify the isolated effect of inflammation caused by thermal injury, observing esophagitis and low grade intra epithelial lesions at the end of the experiment, with no difference between tap or hot water infusion. Probably the esophageal intubation itself is able to produce a mucosal damage due to mechanical trauma, although of little magnitude. In a similar

study, using esophageal intubation for infusion of hot water 3 times a week and esophageal carcinogenesis with DEN, Ribeiro et alii made animal sacrifices at 07, 14 and 30 day after the study start, analyzing the mucosal alterations in three experimental groups: G1 – DEN in drinking water; G2- esophageal intubation for infusion of hot water (60 a 70°C) and G3- esophageal intubation for infusion of hot + DEN. G1 presented no histopathological alterations after 30 days; G2 presented esophagitis within the first seven days, the most intense alteration observed at the 14th day and absolutely normal mucosa at the 30th day; G3 presented a similar evolution to the G2, except for the 30th day when inflammatory lesions were even harder (unpublished data). These findings point to a synergistic effect of the carcinogen upon the inflammatory tissue, instead of an inflammatory tissue derived from tumorigenesis. It will be still necessary to correlate these findings with molecular biology studies, setting the functions of the pro-inflammatory enzyme at this context.

In our study, carcinoma was observed only on Group IV (hot water + DEN) at the 120th day without statistical difference to Group III (AT water +DEN), probably due to the reduced number of subject. Even though a difference was detected it would be quantitative, once in Kruehl (24) without additional hazard (gavage, hot water) carcinoma was observed at the same. In regard to the number of subjects, Gurski et alii, using more than 40 animals per group, in this same experimental model, found no statistical significant differences at the 180th day, among the groups receiving DEN only, DEN + ethanol, DEN + NNN (N-nitrosomornicotine) and DEN + NNN + ethanol (p=0.73) (25). Kruehl observed a percentage of invasive carcinoma of 9.5 at the 150th day and of 26.5 at the 180th day (24) showing a clear burst of invasive tumors from the 150th day on. To this study was settled not to prolong experiment beyond the 150th day, once the whole carcinogenic process would be already developed. It was possible to observe the whole

chronology of the ECE histogenesis, and establish the moment COX-2 would be detectable in the esophageal mucosa, its histopathological relation and difference among groups. A sham group was not established once Kruehl and Gurski found no histopathologic alterations in the previous discussed studies (24, 25). It is important to point out that the aim of the present study was to verify the expression of COX-2 in the esophageal carcinogenesis adding the variable of thermal injury, a common tumor promoter at southern Brazil, adapting this already tested experimental model to this objective.

COX-2 expression

In the present experiment expression of COX-2 RNA was not observed at any of the groups. This data is significant, once the RT-PCR is a very sensitive technique. The protocol used in this study was described and optimized by Ferreira et alii (14) allowing the detection of specific mRNA from isolated single cells. In the current experimental model, the observation of tumor at the 120th day is demonstrated by Kruehl and reproduced in our study; the association of COX-2 and ECE (and adenocarcinoma) is largely described in the literature (using immuno-histochemistry, RT-PCR or western-blotting); however, the expression of COX-2 at this model was not yet verified. Li et alii observed the expression of COX-2 by semiquantitative RT-PCR analysis in rat esophageal mucosa treated with N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA). In that model there was a 5 times raise on COX-2 expression compared to normal mucosa, but all the animals were killed at the end of the study, the 24th week, not allowing to verify the moment that COX-2 would begin to be expressed (26). Shama et alii, analyzing human ECE tissues from esophagectomy, detected a relationship between the intensity of COX-2 expression by immuno-histochemistry reaction (through an immunoreactive score - percentage of positive cells for COX 2 X staining intensity) and

the grade of lesion of the esophageal mucosa, the highest score observed in high grade dysphasia. However, the esophageal anatomical peaces of the aforementioned study came from diseased organs, without the possibility of pointing the beginnig o COX-2 activity and its rule as a tumoral promoter (27). The same can be said about the study of Zimmermann et alli. These autors mention the need for studies with normal esophageal mucosa from healthy human subjects to determine the real behavior of COX-1 and COX-2 in the carcinogenic process. Immuno-histochemistry analysis revealed a marked inter-tumoral heterogeneity in COX-2 expression, difficulting the determination of which type of cell, non neoplastic stromal or neoplastic, the COX-2 signal comes froms (28). These facts point out the importance of experimental models to study the stepwise fases of esophageal carcinogenesis, avoiding cross contamination.

Althoght the expression of COX-2 was not verified in present study, in another experiment using the same delineation, the liofilized *Ilex paraguayensis* was added to the esophageal gavage with tap or hot water. At the 120th day of experiment (T120), a positive and strong expression of COX-2 and iNOS was observed only in group that received esophageal gavage with hot water and liofilized *Ilex paraguayensis*, without induction on tumorigenesis (unpublished data). These findings suggest the necessity to further explore the rule of mate in esophageal inflammatory process and carcinogenesis, and not only its association to thermal injury.

In regard to the material collection, the RT-PCR reaction has some advantageges upon others technics. A very little among of tissue is necessary, given the sensibility of this method, an attractive feature when studing human cancer; a the preservation is simple with the reagent Trizol[®], precluding more sophisticated physical means as liquid nitrogen (e.g., western blotting); the results have objectives interpretation when using quantitative or semi-quantitative RT-PCR, compared to immuno-histochemistry. These studies of Zimmermann and Shama, describe

similar expression of COX 2 by three aforementioned methods, confirming that the production control of the protein is of transcriptional nature. So, the presence of mRNA in the tissue is a strong indicative of a proportional quantity of the protein.

Chemoprevention

The importance of experimental animal models for the study of the esophageal carcinogenic process must be highlighted. Even though extrapolation to humans must be carefully evaluated; the study of this pathology must be stressed in animals. A recent publication of a clinical trial in chemoprevention of adenomatous polyps using Vioxx® (rofecoxib), a selective inhibitor of COX-2, alerted to the cost-benefit issue of application of this pharmacological class, once an increase of thrombotic events (myocardial infarction and stroke) was observed on the treated group, compared to controls (relative risk 1.92 ; 95 % confidence interval, 1.19 to 3.11; P=0,008), although the main cardiovascular mortality was equal for both controls and subjects (29). Perhaps, further investigation in experimental models and basic sciences is needed, and alternatives, as more specific inhibition of PGE2 at a further or prior step and of other enzymes associated to inflammatory process and carcinogenesis (p.ex, lipo-oxygenases and iNOS) must be considered.

CONCLUSION

In our study, the inflammation and progression of histopathologic alterations caused by carcinogenesis were compatible to the literature, although, the thermal injured showed no significant influence upon esophageal histogenesis and tumorigenesis. The COX-2 mRNA was not expressed, pointing the necessity of further adaptation of this experimental model for future

studies on chemoprevention. The role of *Ilex paraguayensis* associated to thermal injury is a promising field of study, with important regional relevance.

REFERENCES

1. Stoner GD, Gupta A. Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogen* 2001; 22(11):1737-46.
2. Koshy M, Esiashvili N, Landry JC, Thomas Jr CR, Matthews RH. Multiple Management Modalities in Esophageal Cancer: Epidemiology, Presentation and Progression, Work-up, and Surgical Approaches. *The Oncologist* 2004; 9:137-46.
3. Pinto LF, Albano RM, Guimarães DP. Câncer de Esôfago e Estômago. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Atheneu; 2004:155-64.
4. Kruel C, Gurski R, Golbert L, Da Luz L, Ferreira M. Effect of thermal injury and the oral administration of diethylnitrosamine in the development of esophageal tumor in mice. In: Peracchia A, Rosati R, Bonavina L, Fumagalli U, Bona S, Chella B. *Recent advances in Diseases of the esophagus*. Bologna: Monduzzi, 1997:37-40.
5. Coral RP, Gabiatti G. Carcinoma epidermóide de esôfago. In: Rohde L. *Rotinas em cirurgia digestiva*. São Paulo: Artmed, 2005; 12:91-5.
6. de Barros SG, Ghisolfi ES, Luz LP, Barlem GG, Vidal RM, Wolff FH, et al. High temperature “mate” infusion drinking in a population at risk for squamous cell carcinoma of esophagus. *Arq Gastroenterol* 2000;37(1):25-20.

7. Chemoprevention Working Group. Prevention of cancer in the next millennium: Report of the Chemoprevention Working Group to the American Association for Cancer Research. *Cancer Res* 1999; 59:4743-58.
8. Sporn MB, Nanjoo S. Chemoprevention of cancer. *Carcinogen* 2000; 21:525-30.
9. Xie W, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2692-6.
10. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS 10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 1991; 266:12866-72.
11. National Institutes Of Health. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council. Washington: National Academy Press; 1996.
12. Rubio CA. Further Studies on the Therapeutic Effect of Indometacin on Esophageal Tumors. *Cancer*, 1986; 58:1029-31.
13. Krueel CDP, Pan Chacon J. Classificação citopatológica das lesões precursoras do carcinoma escamoso do esôfago: modelo experimental em camundongos. Tese [Doutorado]. Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina; 1992.
14. Ferreira ABR, Pinto LFR, Albano, RM. An optimized reverse transcription-polymerase chain reaction procedure for the amplification of low-copy Cyp2a3 mRNA in rat esophagus. *Analyt biochem* 2003; 319:323-6.
15. Rubio CA. Epithelial lesions antedating esophageal carcinoma. Histologic study in mice. *Pathol Res Pract* 1983; 176:269-75.

16. Rubio CA, Liu F, Chejfec G, Sveander M. The induction of esophageal tumors in mice: dose and time dependency. *In Vivo* 1987; 1:35-8.
17. Verna L, Whysner J, Williams GM. N-Nitrosodiethylamine Mechanistic Data and Risk Assessment: Bioactivation, DNA-Adduct Formation, Mutagenicity, and Tumor Initiation. *Pharmacol Ther* 1996; 71(1/2):57-81.
18. Sallet JA, Zilberstein B, Andreollo NA, Eshkenazy R, Pajceki D. Experimental esophageal carcinogenesis: technical standardization and results. *Diseases of the Esophagus* 2002; 15:278–281.
19. 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. *Carcinogen* 1984; 5(10):1337.
20. Ribeiro Pinto LF. Differences between isoamyl alcohol and ethanol on the metabolism and DNA ethylation on N-nitrosodiethylamine in the rat. *Toxicol*, 2000; 151(1-3):73-9.
21. Pinto LF, Moraes E, Albano RM, Silva MC, Godoy W, Glisovic T, et al. Rat oesophageal Cytochrome P450 (CYP) mono-oxygenases system: comparison to the liver and relevance in N-nitrosodiethylamine carcinogenesis. *Carcinogen* 2001; 22(11):1877-83.
22. Zgodziński W, Zinkiewicz K, Juśkiewicz W, Szumiło J, Wallner G. Diethylnitrosamine may induce esophageal dysplasia after local intramural administration; 2003.
23. Clapp NK, Craig AW. Carcinogenic effects of diethylnitrosamine in RF mice. *J Natl Cancer Inst* 1967; 39:903-16.

24. Kruel CDP, Prolla JC, Diehl AS, Putten AC. A New Cytopathological Classification of Esophageal Carcinoma Precursor Lesions. Experimental Model in Mice. In: Peracchia A, Rosati R, Bonavina L, Fumagalli U, Bona S, Chella B. Recent advances in Diseases of the esophagus. Bologna: Monduzzi, 1996:127-131.
25. Gurski KK, Schirmer CC, Kruel CK, Komlos F, Kruel CDP, 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.
26. Li Z, Shimada Y, Kawabe A, Sato F, Maeda M, Komoto I, et al. Suppression of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats by JTE-522, a selective COX-2 inhibitor. *Carcinogen* 2001; 22(4):547-51.
27. Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, Okami J, Kondo M, Fujiwara Y, et al. Up-regulation of Cyclooxygenase in squamous Carcinogenesis of the esophagus. *Clin Cancer Res*, 2000; 6:1229-38.
28. Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schrör K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res*, 1999; 59:198-204.
29. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, et al. Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx (APPROVe) Trial. *N Engl J Med* 2005; 352:1092-102.