

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

*AVALIAÇÃO DA AÇÃO INDUTORA DA DIETILNITROSAMINA E DO EFEITO
PROMOTOR DO ÁLCOOL ETÍLICO E DA N-NITROSONORNICOTINA NA
CARCINOGENESE ESOFÁGICA EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS*

RICHARD RICACHENEVSKY GURSKI

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Isabel Edelweiss

Co-orientador: Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Kruehl

Tese de Doutorado

1999

FICHA CATALOGRÁFICA

G981i Gurski, Richard Ricachenevsky
Avaliação da ação indutora da dietilnitrosamina e do efeito promotor do álcool etílico e da n-nitrosornicotina na carcinogênese esofágica experimental em camundongos. / Richard Ricachenevsky Gurski; orient. Maria Isabel Edelweiss. Porto Alegre: UFRGS, 1999.

fls.64

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina: Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica.

1. Carcinoma epidermóide de esôfago: carcinogênese. 2. Carcinoma epidermóide de esôfago: fatores de risco. 3. Nitrosaminas. I. Maria Isabel Edelweiss. II. Título.

CDU:616.329-006.6

CDD: 616.99232

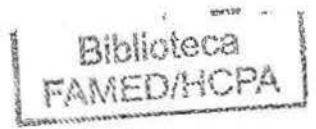
MEL
T
WA100 G981a 1999

05907451

{000601670} Gurski, Richard Ricachenevsky.
Avaliação da ação indutora da dietilnitrosamina e do efeito promotor do álcool etílico e da N-nitrosornicotina na carcinogênese esofágica experimental em camundongos. 1999. 64 f.

" O artista cria.... o cientista descobre...."

EUGÈNE DELACROIX



A minha amada esposa Eliana, por estar a meu lado há 17 anos escrevendo comigo a história de nossas vidas.

A minha querida filha Fernanda, que, como seu próprio nome significa, foi desde o seu nascimento o nosso caminho da felicidade.

Aos meus pais Enio e Léa, por terem me transmitido o permanente desejo do conhecimento.

Aos meus irmãos Régis e Rose, pelo apoio fraterno sempre demonstrado ao longo de todos esses anos .

AGRADECIMENTOS

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

- à Dra. Maria Isabel Edelweiss, professora do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), orientadora desta pesquisa, pela amizade, estímulo e dedicação demonstrados durante toda a realização deste trabalho, qualidades que completam de forma harmoniosa toda a sua capacidade profissional como docente;

- ao Dr. Cleber Dario Pinto Krueel, professor do Departamento de Cirurgia da UFRGS, co-orientador desta pesquisa, pela oportunidade de compartilhar da sua amizade e de sua experiência de vida ;

- ao Curso de Pós-graduação em Medicina: Clínica Médica, pela oportunidade de poder me aprimorar cientificamente dentro dos elevados padrões de formação exigidos neste curso, e também pelo auxílio financeiro concedido durante o desenvolvimento do trabalho. Esse auxílio foi fundamental para a apresentação dos resultados desta pesquisa em eventos internacionais de extrema importância dentro da área da Esofagologia;

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

- a todos os funcionários da Pró Ambiente Análises Químicas e Toxicológicas;

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

- às veterinárias Luiza Maria Gomes de Macedo Braga e Mara de Souza Motta, pela sua dedicação e extrema capacidade profissional, demonstradas na produção e manutenção dos animais, e pela transmissão constante de conhecimentos durante todo o período do experimento. Seu auxílio foi fundamental nesta pesquisa;

- a todos os funcionários do FEEPS e, em especial, à estagiária de Biologia, Patrícia Sesterheim, que de forma dedicada e competente cuidou dos animais durante os 180 dias do experimento;

- ao médico residente de cirurgia Dr. Cleber R. Kruehl e aos doutorandos Fábio Komlos e Pedro Schestatsky, pela importante participação nas várias fases da pesquisa, desde a revisão bibliográfica até o controle diário dos animais e auxílio na montagem do banco de dados. Seu espírito crítico e constantes questionamentos foram de grande auxílio no decorrer do trabalho;

- aos funcionários do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, principalmente dos setores de processamento do material e preparo das lâminas para análise microscópica, em especial à funcionária Elhane Gomes, pela incansável disposição de realizar esta importante parcela da pesquisa, muitas vezes além dos seus horários usuais de trabalho;

- aos amigos e colegas de consultório Dr. Carlos Cauduro Schirmer e Dr. Mário Sérgio Trindade Borges da Costa, por termos funcionado sempre como uma equipe mesmo nos momentos em que, devido a esta pesquisa, estive menos presente nas atividades relativas à nossa Clínica;

- ao Dr. Lúcio Bakos, professor titular de Dermatologia da UFRGS, pela gentileza e qualidade na realização das fotos da macroscopia utilizadas no estudo;

- à Dra. Marcelle Cerski, professora assistente de Patologia da UFRGS e à médica residente de Patologia, Eliana L. Barcelos Gurski, pela realização das fotos de microscopia apresentadas neste trabalho;

- a todos os colegas da Emergência do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Hospital de Pronto Socorro Municipal de Porto Alegre, que possibilitaram uma maior disponibilidade em alguns plantões para a digitação dessa tese;

- ao Dr. Vinícius Duval da Silva, pelo incentivo e estímulo nos momentos mais difíceis da realização deste estudo. Suas palavras de incentivo foram de grande sabedoria e incentivo para que eu prosseguisse em busca dos objetivos propostos nesse trabalho.

- a Luciana Bertoldi Nucci, pela orientação estatística prestada durante a realização deste trabalho;

- aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Medicina da UFRGS, pelo auxílio na busca do material bibliográfico;

- à bibliotecária Mônica Nodari, pela revisão das referências bibliográficas e de sua normatização;

- a professora Clarice Bohn Knies, pela revisão final do português;

- ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que, através do seu Fundo de Incentivo à Pesquisa, disponibilizou apoio financeiro decisivo para as fases iniciais de importação das drogas utilizadas nesta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS E LISTA DE TABELAS.....	11
INTRODUÇÃO.....	12
REVISÃO DA LITERATURA.....	14
Considerações gerais sobre o câncer de esôfago.....	14
Carcinogênese esofágica.....	17
Modelos experimentais induzindo câncer de esôfago a partir de compostos n-nitrosos.....	19
OBJETIVOS.....	24
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	25
ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS	33
Resumo.....	33
Introdução.....	34
Material e Métodos.....	35
Resultados.....	37
Discussão.....	40
Referências Bibliográficas.....	46
Figuras e Tabelas.....	50
SEPARATA DA PUBLICAÇÃO EM INGLÊS.....	55
ANEXOS.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

CEE:	Carcinoma epidermóide de esôfago
DEN:	Dietilnitrosamina
DMAE:	Departamento Municipal de Água e Esgotos
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
FEEPS:	Fundação Estadual de Proteção e Pesquisa em Saúde
HCPA:	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HPV:	Papiloma vírus humano
NATE:	Nitrosaminas tabaco-específicas
NNN:	N-nitrosornicotina
RNA:	Ácido ribonucleico
UFRGS:	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Macrofotografia de lesão esofágica de animal do grupo 3 (DEN + solução aquosa de NNN). Notam-se várias lesões polipóides sesséis, algumas superficialmente erodadas(*seta*)..... 49
- FIGURA 2 Macrofotografia de lesão esofágica de animal do grupo 2 (DEN + água). Nota-se lesão tumoral infiltrativa e vegetante que ocupa toda a circunferência do órgão. A lesão mostra-se ressaltada e corada pelo azul de toluidina.....49
- FIGURA 3 Microfotografia (HE 250 X) de lesão de displasia de baixo grau em esôfago de animal do grupo 5 (DEN + solução alcoólica a 6% de NNN). Notam-se células discarióticas no terço inferior do epitélio escamoso (*seta*).....50
- FIGURA 4 Microfotografia (HE 400 X) de lesão de carcinoma epidermóide invasor atingindo a camada muscular própria do esôfago de animal do grupo 4 (DEN + álcool a 6%).....50

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Volume diário das soluções líquidas ingeridas.....51
- TABELA 2 - Achados da análise macroscópica.....52
- TABELA 3 - Frequência relativa dos achados da microscopia.....53

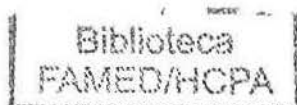
INTRODUÇÃO

As nitrosaminas foram reconhecidas como os carcinógenos mais importantes para a indução do carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) a partir do experimento de DUCKREY (1961), o qual demonstrou o aparecimento de neoplasias escamosas de esôfago em ratos que receberam N-methyl-N-nitrosoaniline. A utilização da dietilnitrosamina (DEN) para induzir carcinoma de células escamosas no esôfago de camundongos foi descrita primeiramente por CLAPP; GRAIG (1967), que obtiveram 18% de tumores em 180 dias de exposição ao carcinógeno. RUBIO *et al.* (1987) desenvolveram um modelo experimental em camundongos utilizando a DEN em doses menores, na concentração de 40 mg/l, oferecida na água de beber, com vistas a diminuir a mortalidade derivada de sua ação hepatotóxica.

O consumo de bebidas alcoólicas tem um efeito multiplicativo no risco para desenvolver neoplasia escamosa de esôfago em pacientes fumantes (McCOY; WYNDER, 1979; TUYNS, 1979a). Vários trabalhos epidemiológicos relacionam fumo e álcool com o carcinoma epidermóide de esôfago, porém não se conseguiu definir até o momento, nem experimentalmente, uma relação causa-efeito (WILLIAMS; HORM, 1977; DE STEFANI *et al.*, 1990; PROLLA *et al.*, 1993). Várias hipóteses já foram formuladas, porém o mecanismo que envolve o efeito intensificador do álcool permanece desconhecido (HECHT *et al.*, 1980).

As nitrosaminas tabaco-específicas (NATE) constituem-se em potentes carcinógenos e são as principais responsáveis por grande parte das neoplasias relacionadas ao fumo. Dentro desse grupo de nitrosaminas, a N-nitrososornicotina (NNN) é a que apresenta maior especificidade para experimentalmente desenvolver tumores de esôfago (PRESTON-MARTIN, 1991). Segundo esse autor, trabalhos experimentais que explorem o sinergismo entre álcool e fumo para induzir tumores esofágicos poderão responder a estas perguntas e confirmar suas relações.

No presente estudo, delineou-se um modelo experimental em que se oferece DEN na água de beber para camundongos durante quatro dias por semana por 180 dias, com o objetivo de observar o tipo histológico e a incidência de lesões epiteliais produzidas com este modelo. Também objetivou-se definir a importância do álcool e da N-nitrosornicotina como promotores da carcinogênese esofágica tanto isoladamente como em associação.



REVISÃO DA LITERATURA

Considerações gerais sobre o câncer de esôfago

O carcinoma epidermóide de esôfago é moléstia descrita há mais de dois mil e quinhentos anos em seres humanos. Documentos como o "Smith Surgical Papyrus", original do Egito, já relatavam casos de pacientes que não conseguiam ingerir líquidos e gradativamente emagreciam até a morte (WU *et al.*, 1982; BREWER, 1988).

Dentre os tumores do esôfago, o carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) é o tipo histológico predominante. A etiopatogenia desse carcinoma é multifatorial. Os principais fatores envolvidos são: tabagismo, etilismo, ingestão de bebidas quentes, deficiências nutricionais, HPV e exposição a dieta contendo compostos N-nitrosos (ZHU *et al.*, 1991).

Epidemiologicamente, observam-se áreas endêmicas com altos índices de incidência e mortalidade. Curiosamente, zonas de alta incidência situam-se próximas de outras de baixa incidência, inclusive dentro de um mesmo país (GHADIRIAN *et al.*, 1988). As de maior incidência situam-se no norte da China, no nordeste do Irã, em regiões da Índia, no norte da França, na África do Sul e no sul do Brasil. Na América do Sul, a sua incidência é intermediária na maior parte dos países, mas é particularmente elevada no chamado Cone Sul – regiões do norte da Argentina e nordeste do Uruguai (40:100.000) e no estado do Rio Grande do Sul (VICTORA *et al.*, 1987; DE STEFANI *et al.*, 1990; PROLLA, 1992). Estimativas do Ministério da Saúde do Brasil prevêem uma mortalidade de mais de 4.000 novos óbitos para o ano de 1999 e uma incidência de 6,75/100.000 habitantes masculinos no mesmo período,(INCA, 1999).

O Rio Grande do Sul é região de média para alta incidência do CEE, com áreas de 27 casos/100.000 habitantes/ano. A cada ano surgem no Estado cerca de 800 casos novos. A mortalidade concentra-se, principalmente, nas microrregiões da metade sul. Esses coeficientes de mortalidade conferem ao Rio Grande do Sul o primeiro lugar entre os estados do Brasil. Os demais estados brasileiros apresentam uma baixa incidência da doença (VICTORA *et al.*, 1987; PROLLA *et al.*, 1993).

Os elevados índices de complicações e mortalidade relacionados à cirurgia e a baixa sobrevida global têm sido a regra na maioria dos relatos da experiência ocidental, apesar de todo o progresso técnico havido em relação ao diagnóstico e tratamento desses pacientes nas últimas décadas (PARICIO *et al.*, 1993; VOGEL *et al.*, 1995; GURSKI *et al.*, 1997). Esses maus resultados cirúrgicos devem-se principalmente ao fato de que o diagnóstico da doença geralmente é tardio, quando os pacientes já apresentam-se sintomáticos e em más condições clínicas (ORRINGER *et al.*, 1993; GURSKI *et al.*, 1994; URSCHER *et al.*, 1995).

O grau de penetração da lesão na parede esofágica e o comprometimento linfonodal são dois fatores importantes no prognóstico desses pacientes. O índice de sobrevida em cinco anos cai drasticamente quando se comparam pacientes com lesões restritas à mucosa (em torno de 90%) com aqueles com invasão de submucosa (cerca de 40%) (SKINNER *et al.*, 1982). O diagnóstico precoce do CEE é o grande diferencial do aumento de sobrevida nesses pacientes. Esse diagnóstico somente será melhorado quando se conhecerem as populações de risco para a doença e essas forem submetidas a programas de rastreamento populacional (BARROS, 1992; KRUEL, 1992; ROTH *et al.*, 1997).

Os principais fatores de risco para o CEE já demonstrados epidemiologicamente são o consumo de tabaco e de álcool etílico, em uso independente ou em associação (DE JONG *et al.*, 1974; WILLIAMS; HORM, 1977; TUYNS *et al.*, 1979b; VICTORA *et al.*, 1987; DE STEFANI *et al.*, 1990). O grupo

populacional de maior risco constitui-se de indivíduos do sexo masculino, na sexta década de vida e com hábito de consumo crônico de álcool e/ou tabaco (BLOT, 1994). Em algumas regiões da Europa e EUA também são esses os principais fatores envolvidos, com uma prevalência maior nos homens na proporção de 4:1 (DE STEFANI *et al.*, 1990; STEMMERMMAN *et al.*, 1994).

Está bem estabelecido que o consumo de bebidas alcoólicas tem um efeito multiplicativo no risco para desenvolver neoplasia escamosa de esôfago em pacientes fumantes (CASTONGUAY *et al.*, 1984; RUSSO; FRANCESCHI, 1996). O álcool é considerado um potencializador da indução de tumores epiteliais, produzindo inicialmente lesões inflamatórias e estimulando a proliferação celular epitelial. Um estudo experimental realizado em porcos (SQUIER *et al.*, 1986) demonstrou que a penetração de N-nitrosornicotina na mucosa oral foi maior na presença de uma solução alcoólica a 5%, induzindo um maior número de lesões neoplásicas. Apesar dos inúmeros trabalhos epidemiológicos que relacionam fumo e álcool com o carcinoma epidermóide de esôfago (WILLIAMS; HORM, 1977; DE STEFANI *et al.*, 1990; PROLLA *et al.*, 1993), não se conseguiu demonstrar até o momento, nem experimentalmente, essa relação causa-efeito (HECHT *et al.*, 1980). Várias hipóteses já foram formuladas, porém o mecanismo exato que envolve o efeito intensificador do álcool é ainda desconhecido.

O papiloma vírus humano (HPV) tem sido relacionado à etiopatogenia do carcinoma de células escamosas. Os tipos de HPV mais freqüentemente encontrados são o 16 e o 18. O provável mecanismo de ação do HPV seria a presença de duas oncoproteínas (E6 e E7), as quais inativariam a ação de dois genes supressores (Rb e p53), induzindo, assim, a multiplicação celular exagerada (BENAMOUZIG *et al.*, 1992; CHANG *et al.*, 1993).

Nas regiões de alta prevalência do Irã, demonstrou-se que mais de 75% dos casos de CEE tinham relação com o estilo de vida e hábitos alimentares da população

(MAHBOUBI; ARANESH, 1980). O baixo consumo de água, vegetais verdes e frutas cítricas, bem como a ingestão de bebidas a temperatura elevada também são riscos associados ao desenvolvimento da neoplasia (VICTORA *et al.*, 1987; LI *et al.*, 1989; WANG *et al.*, 1992; KRUEL *et al.*, 1996).

A dieta pobre em proteínas animais e vitaminas tem sido responsabilizada pelo aumento do risco de desenvolver o carcinoma esofágico (ZIEGLER, 1986; TUYNS *et al.*, 1987; CHENG *et al.*, 1992). Nos países com maior incidência, foi constatado que a dieta habitualmente ingerida é pobre em caroteno, vitamina C e vitamina E (THURNHAM *et al.*, 1988; BLOT, 1993). CHENG (1994) realizou estudo no norte da China, demonstrando que o acréscimo de substâncias "protetoras" à dieta (retinol, riboflavina, zinco e vitaminas C e E) produzia um efeito protetor em relação ao carcinoma esofágico. Nessa região de alto risco, existe o hábito de consumir vegetais conservados em substâncias ricas em nitrosaminas, que são substâncias químicas sabidamente carcinogênicas. A associação desses fatores é responsável pelos altos índices dessa neoplasia apresentados naquela população.

Carcinogênese esofágica

A transformação neoplásica do epitélio esofágico é um processo de múltiplos estágios que envolve gerações sucessivas de células, cada uma se aproximando mais do fenótipo maligno. O estágio inicial é o da iniciação, no qual há alteração irreversível do genoma de uma ou mais células-alvo, que podem expressar o crescimento neoplásico. Geralmente, essas alterações são constituídas de uma ou mais mutações simples, transversões, transições e/ou deleções. Nessa fase, as células ainda não têm o fenótipo tumoral e por isso não podem ser reconhecidas diretamente (PITOT, 1993).

O estágio seguinte é o da promoção, no qual há envolvimento de alterações não na estrutura do DNA, mas na expressão do genoma. Essas alterações são

mediadas por interações entre agentes químicos promotores e moléculas receptoras que interagem ou se ligam a regiões específicas do DNA, o que produz as alterações de expressão. O estágio final e irreversível, o da progressão, é caracterizado por instabilidade cariotípica e expansão tumoral, transformando o fenótipo tumoral em neoplásico (PITOT; SIRICA, 1980; MILLER; MILLER, 1981; FARBER, 1988). As moléculas envolvidas no processo de carcinogênese incluem proto-oncogenes, oncogenes celulares e alterações em ambos alelos dos genes supressores (PITOT, 1993). Os genes relacionados ao desenvolvimento tumoral podem ser divididos em dois grupos distintos: oncogenes, que atuam diretamente na promoção do crescimento tumoral, e genes supressores, que inibem a proliferação tumoral (RUSTGI; PODOSKY, 1993).

Acredita-se que a carcinogênese esofágica siga os mesmos caminhos identificados em outros órgãos com epitélio escamoso em relação ao comportamento dos agentes químicos carcinogênicos. Quando as nitrosaminas ou outros agentes químicos carcinogênicos são ingeridos com a dieta, esses sofrem transformação enzimática e convertem-se em carcinógenos ativos. Com a ativação, as nitrosaminas interagem e induzem mutações pela alquilação do DNA (LIJINSKI, 1992). Esses compostos reagem com as proteínas do DNA e do RNA celular, produzindo mutações celulares, alterando o controle do crescimento tecidual e promovendo o desenvolvimento de carcinomas (DUCKREY, 1972; MOOLGAVKAR; KNUNSON, 1981; BARTSCH; MONTESANO, 1984).

A alquilação do DNA é catalisada pelos citocromos P450, que são enzimas presentes no retículo endoplasmático e mitocôndria celulares. A maior parte dessas enzimas encontram-se no fígado, porém estão presentes em outros órgãos, entre eles o esôfago, o que pode ser muito importante em termos de toxicidade local (YANG *et al.*, 1984; LIJINSKI, 1992). O álcool pode estimular a replicação de células displásicas na mucosa esofágica por competir com as nitrosaminas pelo metabolismo hepático, o

que favorece a circulação e a ativação dessas pelo sistema P450 da célula epitelial esofágica (RUSSO; FRANCESCHI, 1996).

Indução: Os compostos N-nitrosos costumam apresentar uma organoespecificidade bem definida, alterando a bioquímica e a genética celular do DNA de maneira a impedir a reparação e replicação celular corretas. A partir dessas alterações celulares, surgem as lesões pré-malignas e, mais tarde, o carcinoma epidermóide (MONTESANO; HALL, 1985). Vários tumores têm sido induzidos na maioria dos órgãos de roedores e outros animais pela administração dos vários tipos destes compostos e pelas mais variadas vias (RUBIO, 1983; LIJINSKY, 1987; MIRVISH *et al.*, 1993).

Compostos: A dietilnitrosamina (DEN) é uma substância química do grupo das nitrosaminas, de peso molecular 102,1, constituída de um radical nitroso ligado a quatro átomos de carbono e dez de hidrogênio— $C_4H_{10}N_2O$. É um carcinógeno completo que induz e promove neoplasias do tipo epitelial em várias espécies de animais, acometendo os sistemas respiratório, digestivo alto, fígado e rins (IARC, 1978).

A N-nitrosonorcicotina (NNN) é uma substância química do grupo das nitrosaminas tabaco-específicas, de peso molecular 177,2, constituída de 3 radicais nitrosos ligados a 9 átomos de carbono e a 11 de hidrogênio - $C_9H_{11}N_3O$. É encontrada em vários produtos do tabaco (cigarros, charutos, fumo de mascar). Em roedores, apresenta uma prevalência elevada de tumores de esôfago quando oferecida pela via oral (IARC, 1978).

Objetivo:

Assunto: Modelos experimentais induzindo câncer de esôfago a partir de compostos n-nitrosos

Introdução:

Desde a descoberta da carcinogenicidade da nitrosodimetilamina em 1956, já se descreveram mais de 300 tipos de nitrosaminas com ação carcinogênica em várias espécies animais, incluindo macacos (LIJINSKY, 1987). Os modelos experimentais

surgidos inicialmente não tinham um método satisfatório de indução seletiva e regular. As nitrosaminas foram reconhecidas como os carcinógenos mais importantes para a indução do câncer de esôfago a partir do experimento de DUCKREY (1961), em que o autor demonstrou o aparecimento de neoplasias escamosas de esôfago em ratos que receberam N-methyl-N-nitrosoaniline.

A dietilnitrosamina (DEN) foi utilizada para induzir carcinoma de células escamosas no esôfago de camundongos pela primeira vez há mais de 30 anos (CLAPP; GRAIG, 1967). Cerca de 15 anos mais tarde, foi descrito um modelo experimental em camundongos que utilizava a DEN em doses menores, na concentração de 40 mg/l, oferecida na água de beber, com o intuito de diminuir a mortalidade decorrente de sua ação hepatotóxica (RUBIO, 1982). Mais recentemente, foi novamente demonstrada a efetividade de modelos experimentais em camundongos (MUNK-WILKLAND *et al.*, 1990; KRUEL, 1992) e em ratos da raça Wistar (SALLET, 1996).

Em certos órgãos, a frequência de tumores cresce à medida que aumenta a dose de carcinógeno, enquanto que em outros órgãos do mesmo animal os tumores aumentam com o tempo, mesmo após a cessação do estímulo do carcinógeno (FARMER *et al.*, 1979; RUBIO, 1988). Trabalhos bem delineados relatam que a carcinogênese é influenciada não somente por doses crescentes, mas também pelo tempo de exposição à droga (RUBIO *et al.*, 1987). O autor descreve o aparecimento dos primeiros tumores após quatro meses, elevando-se significativamente após os seis meses de tratamento. A frequência tumoral foi mais elevada no grupo tratado por 6 meses e sacrificado 90 dias após. Esses resultados sugerem que clones de células esofágicas são programadas para crescimento tumoral nas fases iniciais do tratamento com DEN, sendo pouco influenciadas pela persistência do estímulo. Como principal conclusão, o autor refere que ainda não há provas de que haja possibilidade de regressão tumoral a despeito da retirada precoce do carcinógeno.

A DEN também foi testada em ratos Buffalo através da ingestão via oral por cerca de seis meses, com uma incidência de 50% de carcinoma epidermóide de esôfago (REUBER, 1975), e através de intubação orogástrica de ratos para colocação intragástrica do carcinógeno, tendo a incidência variado em função do tempo de administração e dosagem (NAPALKOV; POZHARISSKI, 1969). O seu uso intramuscular em galinhas ocasionou carcinoma hepatocelular e adenocarcinoma renal; já seu uso oral em gatos causou hepatomas, carcinoma de esôfago e adenocarcinoma de rim (SCHMAL *et al.*, 1978). Ela também já foi estudada em primatas, coelhos e cães (ADAMSON *et al.*, 1977; SASAJIMA *et al.*, 1977). No nosso meio, testou-se modelo experimental em frangos utilizando-se DEN, o qual demonstrou ser adequado ao estudo da carcinogênese esofágica (PESSINI, 1997)

Muitos investigadores que têm trabalhado com as nitrosaminas tabaco-específicas (NATE) sabem que elas se constituem em potentes carcinógenos e provavelmente são os principais responsáveis por grande parte das neoplasias relacionadas ao fumo. Dentro desse grupo de nitrosaminas, a N-nitrosornicotina (NNN) é a que apresenta maior especificidade para experimentalmente desenvolver tumores de esôfago. Isoladamente, ela pode desenvolver câncer de esôfago quando administrada a ratos na água de beber (HOFFMANN; HECHT, 1985). Trabalhos experimentais que explorem o sinergismo entre álcool e fumo para induzir tumores esofágicos poderão responder a essas questões e confirmar suas relações (PRESTON-MARTIN, 1991).

O estudo do efeito do etanol no metabolismo e carcinogenicidade da NNN em ratos demonstrou um aumento da susceptibilidade da mucosa esofágica aos efeitos carcinogênicos da NNN devido à indução das enzimas de ativação pelo etanol (CASTONGUAY *et al.*, 1984). Esse autor observou também que, ao se comparar um grupo que ingeriu o etanol via oral com outro que o recebeu por via subcutânea, houve maior número de tumores no primeiro grupo, possivelmente em decorrência de fatores

enzimáticos locais da mucosa esofágica, que potencializam a ação do carcinógeno. Outro estudo demonstrou, em ratos, que a administração de etanol aumenta o desenvolvimento de tumores esofágicos induzidos por DEN, quando administrado durante a fase inicial da carcinogênese (AZE *et al.*, 1993).

O carcinógeno etil N-butilnitrosamina induziu o carcinoma epidermóide de esôfago em 120 ratos Wistar, na dose de 10 mg/kg de peso, na água de beber, por um período superior a três meses (MANDARD *et al.*, 1984). A lesão mais prevalente nesse estudo foi o papiloma, com uma incidência de 49%. Somente em 2,5% dos casos observou-se carcinoma epidermóide. O autor concluiu que o carcinoma esofágico em roedores evolui após esofagite, a partir dos papilomas ou em associação com esses.

O exame microscópico dos esôfagos submetidos à carcinogênese pela DEN demonstra alterações desde esofagite, papilomas, atipias epiteliais de vários graus até carcinoma invasor. A displasia de baixo grau consiste de lesões com hiperplasia celular basal e polimorfismo nuclear, as quais ocupam cerca de um terço da espessura do epitélio. A atipia nuclear apresenta-se com núcleos polimórficos e hiper cromáticos, sendo que o epitélio escamoso apresenta eventualmente protusões no estroma. A displasia de alto grau caracteriza-se por polimorfismo nuclear intenso e acentuado hiper cromatismo. As células anormais ocupam mais da metade da espessura do epitélio. A maturação citoplasmática ocorre somente nas células superficiais e as protusões estromais do epitélio estão sempre presentes (RUBIO *et al.*, 1989).

O carcinoma *in situ*, por sua vez, apresenta alterações similares às da displasia de alto grau, com protusões estromais, mas sem maturação citoplasmática das células superficiais. Todas as alterações estão restritas ao epitélio. Alguns estudos, principalmente da escola japonesa, têm discutido as diferenças diagnósticas entre a displasia de alto grau e o carcinoma *in situ*, tendendo a incluí-las em uma mesma

etapa do desenvolvimento e inclusive sugerindo o abandono do termo “ displasia de células escamosas” (WATANABE, 1991).

Finalmente, o carcinoma invasor apresenta invasão além da lâmina própria, a qual está interrompida ou descontínua. Ele pode ser subdividido em microinvasivo (a lesão chega na *muscularis mucosae*), submucoso (a lesão invade a camada submucosa) ou avançado (a lesão vai além da camada muscular própria) (JAPANESE SOCIETY, 1976; RUBIO *et al.*, 1987).

Os modelos experimentais permitem um estudo sistematizado que possibilita a compreensão da histogênese, da morfogênese e da etiopatogenia do câncer de esôfago. São modelos facilmente reproduzíveis, que permitem a identificação de um número expressivo de lesões para o estudo evolutivo do câncer de esôfago (RUBIO, 1983).

OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo foram:

1- Determinar as alterações histopatológicas observadas em esôfago de camundongos submetidos a indução de carcinogênese pela dietilnitrosamina .

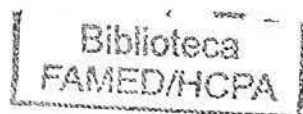
2 - Determinar o efeito promotor do álcool etílico e da N-nitrosornicotina, isoladamente e em associação, na carcinogênese esofágica induzida pela dietilnitrosamina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Apresentação de Teses e Dissertações. Proj 14:02.02-002. Rio de Janeiro: ABNT; 1984.
2. Adamson R, Krollokowski F, Correa P, Sieber S, Dalgard D. Carcinogenicity of 1-methyl-1-nitrosurea in non human primates. *J Natl Cancer Inst* 1977;59:415-19.
3. Aze Y, Toyoda K, Furukawa F, Mitsumori K, Takahashi M. Enhancing effect of ethanol on esophageal tumor development in rats by initiation of diethylnitrosamine. *Carcinogenesis* 1993;14:37-40.
4. Barros SGS. Detecção de lesões precursoras em indivíduos sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago [Tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1992.
5. Bartsch H, Montesano R. Relevance of nitrosamines to human. *Carcinogenesis* 1984;5:1381-93.
6. Benamouzig R, Pigot F, Amiroga G, Nahidiri P, Chaussade S, Catalan F, *et al.* Human papillomavirus infection in esophageal squamous-cell carcinoma in Western Countries. *Int J Cancer* 1992;50:549-52.
7. Blot WJ. Esophageal cancer trends and risk factors. *Semin Oncol* 1994;21:403-10.
8. Blot WJ, Li JY, Taylor PR. Nutritional intervention trials in Linxian, China: Supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence and disease-specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1483-92.
9. Brewer LA. Historical notes on surgery of the esophagus. In: Hill L, Kosarek R, McCallum R, Mercer CD, editors. *The esophagus medical and surgical management*. Philadelphia: Saunders; 1988. p. 1-15.

10. Castonguay A, Rivenson A, Trushin N, Reinhardt J, Spathopoulos S, Weiss CJ, *et al.* Effects of chronic ethanol consumption of the metabolism and carcinogenicity of N'-Nitrosornicotine in F344 rats. *Cancer Res* 1984;44:2285-90.
11. Chang F, Syrjänen S, Shen O, Wang L, Syrjänen K. Screening for human papillomavirus infections in esophageal squamous cell carcinomas by in situ hybridization. *Cancer* 1993;72:2525-30.
12. Cheng KK. The etiology of Esophageal Cancer in chinese. *Semin Oncol* 1994;21:411-5.
13. Cheng KK, Day NE, Duffy SW, Law TH, Fok M, Wong J. Pickled vegetables in the aetiology of oesophageal cancer in Hong Kong Chinese. *Lancet* 1992;339:1314- 8.
14. Clapp NK, Craig AW. Carcinogenic effects of diethylnitrosamine in RF mice. *J Natl Cancer Inst* 1967;39:903-16.
15. De Jong UW, Breslow N, Hong JG, Sridharan M, Shanmugaratnam K. Aetiological factors in oesophageal cancer in Singapore Chinese. *Int J Cancer* 1974;13:291-303.
16. De Stefani E, Muñoz N, Esteve J, Vassalo A, Victora C, Teuchmann S. Mate drinking, alcohol, tobacco, and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Res* 1990;50:426-31.
17. Duckrey, H. Carcinogenese Wirkungh von N-Methyl-N-Nitroso-Anili. *Naturwissenschaften* 1961;48:722-3.
18. Duckrey, H. Organospecific carcinogenesis in the digestive tract. In: Nakahara, Takayama, Sugimura, editors. *Topics in chemical carcinogenesis*. Tokyo: University Park Press; 1972. p. 73-103.
19. Farber, E. Cancer development and its natural history. A cancer prevention perspective. *Cancer* 1988;62:1676-9.

20. Farmer JH, Kodell RL, Greenman DL. Dose and time response models for the incidence of bladder and liver neoplasms in mice fed 2-acetylaminofluorene continuously. *J Environ Pathol Toxicol* 1979;3:55-68.
21. Ghadirian P, Thouez JP, Sinard, A. La géographie du cancer de l'oesophage. *Soc Sci Med* 1988;27:971-85.
22. Gurski RR. Avaliação nutricional em pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade de Federal do Rio Grande do Sul; 1994.
23. Gurski, RR, Schirmer CC, Toneto JE, Rosa AR, Toniazzo GP, Fasolo GR, *et al.* Delayed cervical anastomosis of the esophagus for esophageal carcinoma. *Int Surg* 1997;82:56-9.
24. Hecht SS, Chi-Hong BC, Ohmori T, Hoffmann D. Comparative carcinogenicity of the tobacco-specific nitrosamines, N'-Nitrosornicotine and 4-(N-Methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone. *Cancer Res* 1980;40:298-302.
25. Hoffmann D, Hecht SS. Nicotine derived N-nitrosamines and tobacco related cancer: current status and futures directions. *Cancer Res* 1985;45:935-44.
26. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some n-nitroso compounds. *Iarc Monogr Eval Carcinog Risk Chem Man* 1978;17:1-365.
27. Instituto Nacional do Câncer. INCA. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 1999.
28. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. *New Engl J Med* 1997;336:309-16.
29. Japanese Society for Esophageal Diseases. Guidelines for the clinical and pathologic studies on carcinoma of the esophagus. *Jpn J Surg* 1976;6:69-78.



30. Kruel CDP. Classificação citopatológica das lesões precursoras do carcinoma escamoso do esôfago: modelo experimental em camundongos [Tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina;1992.
31. Kruel CDP, Gurski RR, Golbert L, Luz L, Ferreira M, Lemos N. Effect of thermal injury and the oral administration of diethylnitrosamine in the development of esophageal tumors in mice. In: Perachia A, Rosati R, Bonavina L, Fumagalli U, Bona S, Chella B, editors. Recent advances in diseases of the esophagus. Bologna: Monduzzi; 1996. p. 37-40.
32. Li JY, Ershow AG, Chen ZJ. A case control study of cancer of the esophagus and gastric cardia in Linxian. *Int J Cancer* 1989;43:755-61.
33. Lijinsky W. Chemistry and biology of n-nitroso compounds. Cambridge: Cambridge University Press; 1992. (Cambridge Monographs on Cancer Research)
34. Lijinsky W. Structure activity relations in carcinogenesis by N-nitroso compounds. *Cancer Metastasis Rev* 1987;6:301-56.
35. Lijinsky W, Reuber MD, Singer GM. Induction of tumors of the esophagus in rats by nitrosomethylalkylamines. *J Cancer Res Clin Oncol* 1983;106:171-5.
36. Mahboubi EO, Aranesh B. Epidemiology of esophageal cancer in Iran, with special reference to nutritional and cultural aspects. *Prev Med* 1980;9:613-21.
37. Mandard AM, Marnay J, Herlin P, Elie H, Tuyns AJ, Le Talaer JY. Cancer de l'oesophage induit chez le rat Wistar par 1 éthyl-N-Butyl-Nitrosamine. *Bull Cancer* 1984;71:419-24.
38. McCoy GD, Wynder EL. Etiological and preventive implications in alcohol carcinogenesis. *Cancer Res* 1979;39:2844-50.
39. Miller EC, Miller JA. Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer* 1981;47:1055-64.

40. Mirvish SS, Huang Q, Chen SC, Birt DF, Clark GWB, Hinder RA. Metabolism of carcinogenic nitrosamines in the rat and human esophagus and induction of esophageal adenocarcinoma in rats. *Endoscopy* 1993;25:627-31.
41. Moolgavkar SH, Knudson AG Jr. Mutation and cancer: animal model for human carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1981;66:1037-52.
42. Montesano R, Hall J. Species and organ specificity in nitrosamine carcinogenesis. In: Likhachev A, Anisimov V, Montesano R, editors. Age-related factors in carcinogenesis. IARC Sci Publ 58:173-81, 1985.
43. Munck-Wilkland E, Kuylestierna R, Lindhaolm J, Rubio, C. Image cytometric DNA analysis of diethylnitrosamine-induced dysplasias and invasive squamous cell carcinoma of the esophagus in mice. *Acta Otolaryngol* 1990;109:155-60.
44. Napalkov NP, Pozhariski KM. Morphogenesis of experimental tumors of the esophagus. *J Natl Cancer Inst* 1969;42:922-40.
45. Orringer MB, Marshall B, Stirling MC. Transhiatal esophagectomy for benign and malignant disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;105:256-77.
46. Paricio PP, Garcia Marcilla JA, Haro LM, Escandell MO, Castellanos-Escrig G. Results of surgical treatment of epidermoid carcinoma of the thoracic esophagus. *Surg Gynecol Obstet* 1993;177:398-404.
47. Pessini RA. Modelo experimental de carcinogênese esofágica em frangos [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade de Federal do Rio Grande do Sul; 1997.
48. Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer* 1993;72:962-70.
49. Pitot HC, Sirica AE. The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Acta* 1980;605:191-215.
50. Preston-Martin S. Evaluation of the evidence that Tobacco-Specific Nitrosamines (TSNA) cause cancer in humans. *Crit Rev Toxicol* 1991;21:295-8.

51. Prolla JC. Mortalidade por neoplasias associadas ao tabagismo no Rio Grande do Sul, 1970-1989 [Tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1992.
52. Prolla JC, Dietz J, Costa LA. Rio Grande do Sul geographic differences in esophageal cancer mortality. *Rev Ass Med Bras* 1993;39:217-20.
53. Reuber MD. Carcinoma of the esophagus in rats by diethylnitrosamine. *Eur J Cancer* 1975;11:97-9.
54. Roth MJ, Liu SF, Dawsey SM, Zhou B, Copeland C, Wang GQ, *et al.* Cytologic detection of esophageal squamous cell carcinoma and precursor lesions using balloon and sponge samplers in asymptomatic adults in Linxian, China. *Cancer* 1997;80:2047-59.
55. Rubio CA. Epithelial lesions antedating esophageal carcinoma. Histologic study in mice. *Pathol Res Pract* 1983;176:269-75.
56. Rubio CA. Experimental models. In: Pfeiffer CJ. *Cancer of the esophagus*. CIDADE: CRC Press; 1982. v. 3, p. 139-68.
57. Rubio CA. Post-carcinogen interval in carcinogenesis. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988;24:499-500.
58. 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.
59. Rubio CA, Liu F, Zhao, H. Histological classification of intraepithelial neoplasias and microinvasive squamous carcinoma of the esophagus. *Am J Surg Pathol* 1989;13: 685-90.
60. Russo A, Franceschi S. The epidemiology of esophageal cancer. *Ann Ist Super Sanita* 1996;32:65-72.
61. Rustgi AK, Podosky DK. Neoplasia and oncogenesis. In: Sleisenger MH, Fordtran JS, editors. *Gastrointestinal disease*. Philadelphia: Saunders; 1993. p. 87-112.

62. Sallet JA. Carcinogênese esofágica experimental: contribuição ao estudo da histopatogênese do carcinoma epidermóide [Dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 1996.
63. Sasajima K, Kawachi T, Sano T. Esophageal and gastric cancers with metastases induced in dogs by n-ethyl-n'-nitrosoguanidine. *J Natl Cancer Inst* 1977;58:1789-94.
64. Schmähli D, Habs M, Ivankovic S. Carcinogenesis of n-nitrosodiethylamine in chickens and domestic cats. *Int J Cancer* 1978;22:552-7.
65. Skinner DB, Dowlathshahi KD, Demeester TR. Potentially curable cancer of the esophagus. *Cancer* 1982;50:2571-5.
66. Squier CA, Cox P, Hall BK. Enhanced penetration of nitrosornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. *J Oral Pathol* 1986;15:276-9.
67. Stemmermann G, Heffelfinger SC, Noffsinger A, Hui YZ, Miller MA, Fenoglio-Preiser M. The molecular biology of esophageal and gastric cancer and their precursors: Oncogenes, tumor supressor genes, and growth factors. *Hum Patol* 1994;25:968-81.
68. Thurnham DI, Munõz N, Lu JB. Nutritional and hematological status of chinese farmers: The influence at 13.5 months treatment with riboflavin, retinol and zinc. *Eur J Clin Nutr* 1988;42:647-60.
69. Tuyns AJ. Epidemiology of alcohol and cancer. *Cancer Res* 1979a;39:2840-3.
70. Tuyns AJ, Péquignot G, Abbatucci JS. Oesophageal cancer and alcohol consumption: importance of type of beverage. *Int J Cancer* 1979b;23:443-7.
71. Tuyns AJ, Riboli E, Doornbos G, Péquignot G. Diet and esophageal cancer in Calvados. *Nutr Cancer* 1987;9:81-92.
72. Urschel JD. Esophagogastrostomy anastomotic leaks complicating esophagectomy: a review. *Am J Surg* 1995;169:471-5.

73. Victora C, Muñoz N, Day NE, Barcelos LB, Peccin DA, Braga NM. Hot beverages and oesophageal cancer in southern Brazil: a case-control study. *Int J Cancer* 1987;39:710-6.
74. Vogel SB, Mendenhall WM, Sombeck MD. Downstaging of esophageal cancer after preoperative radiation and chemotherapy. *Ann Surg* 1995;221:685-95.
75. Yang CS, Tu YY, Hong J, Patten C. Metabolism of nitrosamines by cytochrome p-450 isozymes. *IARC Sci Publ* 1984;57:423-7.
76. Wang YP, Han XY, Su W. Esophageal cancer in Shanxi province, people's Republic of China: A case-control study in high and moderate risk areas. *Cancer Causes Control* 1992;3:107-13.
77. Watanabe H. Does esophageal dysplasia really exist?. *Stomach and Intestine* 1991;26: 133-140.
78. Williams RR, Horm JW. Association of cancer sites with tobacco and alcohol consumption and socioeconomic status of patients: interview study from the Third National Cancer Survey. *J Natl Cancer Inst* 1977;58:525-47.
79. Wu YK, Huang GJ, Zhang YD, Lin XS. Progress in the study and surgical treatment of cancer of the esophagus in China, 1940-1980. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982;84:325-33.
80. Zhu JG, Xiao Y, Liu ZQ, Chen JS, Guo ZL. The effects of Chinese tea on the methylation of DNA by the esophageal carcinogen N-nitrosomethylbenzylamine. *Biomed Environ Sci* 1991;4:225-31.
81. Ziegler RG. Alcohol nutrient interactions in cancer etiology. *Cancer* 1986;58:1942-8.

AVALIAÇÃO DA AÇÃO INDUTORA DA DIETILNITROSAMINA E DO EFEITO PROMOTOR DO ÁLCOOL ETÍLICO E DA N-NITROSONORNICOTINA NA CARCINOGENESE ESOFÁGICA EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

RESUMO

Introdução: as nitrosaminas são compostos carcinogênicos com grande organoespecificidade. A dietilnitrosamina é uma das nitrosaminas com maior potencial de produzir câncer experimental no esôfago. O objetivo do presente trabalho foi definir a incidência e o tipo de lesões epiteliais induzidas pela DEN, bem como avaliar o papel do álcool e da N-nitrosornicotina (NNN) como promotores dessa carcinogênese.

Métodos: realizou-se o experimento com 208 camundongos fêmeas tipo *mus musculus* divididos em cinco grupos. Grupo 1: somente água = controles; Grupo 2: DEN + água; Grupo 3: DEN + NNN; Grupo 4: DEN + solução alcoólica a 6%; Grupo 5: DEN + NNN + solução alcoólica a 6%. Do grupo 2 ao 5, os animais receberam DEN (0,04 ml/l) em quatro dias da semana e, nos três dias restantes, as demais soluções. A NNN tinha concentração de 30 mg/l. Após 180 dias de duração do experimento, os animais foram mortos e o esôfago analisado macro e microscopicamente.

Resultados: não houve diferença significativa em relação ao tamanho dos esôfagos e ao consumo médio de DEN ($p > 0,05$). Nas análises macro e microscópica dos tumores, houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,001$) entre o grupo controle e os demais grupos. A análise entre os grupos que foram expostos aos carcinógenos não demonstrou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao tipo e número de lesões. A incidência de displasia de alto grau foi de 21,2% e a de carcinoma invasor, de 64,2%.

Conclusões: o modelo testado foi extremamente eficaz em desenvolver câncer de esôfago. Graças à alta prevalência de câncer, o álcool etílico e a NNN não demonstraram ser promotores eficientes da carcinogênese esofágica neste modelo.

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

INTRODUÇÃO



As nitrosaminas começaram a ser reconhecidas como os carcinógenos mais importantes para a indução do câncer de esôfago a partir do experimento de Duckrey¹, onde foi demonstrado o aparecimento de neoplasias escamosas de esôfago em ratos que receberam N-methyl-N-nitrosoaniline. O uso da dietilnitrosamina (DEN), induzindo carcinoma de células escamosas no esôfago de camundongos, foi realizado primeiramente por Clapp; Graig², que obtiveram 18% de tumores em 180 dias de exposição ao carcinógeno. Após isso, Rubio³⁻⁷ desenvolveu modelos experimentais em camundongos em que utilizava a DEN em doses menores, na concentração de 40 mg/l, oferecida na água de beber, a fim de diminuir a mortalidade pela sua ação hepatotóxica.

Está bem estabelecido que o consumo de bebidas alcoólicas por seres humanos tem efeito multiplicativo no risco para desenvolver neoplasia escamosa de esôfago em indivíduos fumantes^{8,9}. Apesar dos inúmeros trabalhos epidemiológicos que relacionam fumo e álcool com o carcinoma epidermóide de esôfago¹⁰⁻¹², não se conseguiu definir até o momento, nem experimentalmente, essa relação causa-efeito¹³. Várias hipóteses já foram formuladas, porém o mecanismo que envolve o efeito intensificador do álcool é ainda desconhecido.

Muitos investigadores que têm trabalhado com as nitrosaminas tabaco-específicas (NATE) sabem que elas se constituem em potentes carcinógenos e, provavelmente, nos principais responsáveis por grande parte das neoplasias relacionadas ao fumo. Dentro desse grupo de nitrosaminas, a N-nitrosonorcicotina (NNN) é a que apresenta maior especificidade para experimentalmente desenvolver tumores de esôfago^{14,15}. Segundo Preston-Martin¹⁴, trabalhos experimentais que explorem o sinergismo entre álcool e fumo para induzir tumores esofágicos poderão responder a essas perguntas e confirmar suas relações.

No presente estudo, delineou-se um modelo experimental oferecendo DEN na água de beber para camundongos durante 4 dias por semana por 180 dias, a fim de observar o tipo e a incidência de lesões epiteliais, comparando-as com um grupo controle. Também objetivou-se definir a importância do álcool e da N-nitrosornicotina como promotores da carcinogênese esofágica, tanto isoladamente como em associação.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e ambiente de experimentação: utilizaram-se 208 camundongos fêmeas do tipo *mus musculus*, da cepa CF1, fornecidos pelo Biotério da Fundação Estadual de Proteção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul, com idade inicial em torno de três meses e peso médio de 30 g no início do experimento. Todos os animais foram mantidos por períodos diários de 12 horas de luz, sob fluxo contínuo de ar e submetidos a temperaturas que variaram de 7°C a 36°C. Foram divididos em grupos de oito animais e mantidos dentro de gaiolas plásticas com grade metálica servindo de tampa e fundo forrado com serragem. As gaiolas eram higienizadas em dias alternados .

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

Os carcinógenos dietilnitrosamina (DEN) e N-nitrosornicotina (NNN) provieram da Sigma Chemicals CO (St.Louis, USA) com as seguintes características: **DEN** - Sigma Química – 0756, frasco de 25 ml, densidade – 0,95 g/ml, peso molecular

- 102.1 e fórmula química - $C_4H_{18}N_2O$. **Nornicotine** - Sigma Química – 3018, frasco de 50 mg, pureza - 98%, peso molecular - 148.2 e fórmula química - $C_9H_{12}N_2$. A **NNN** ($C_9H_{11}N_3O$) foi preparada a partir da nornicotine conforme descrito por Hu *et al.*¹⁶.

Soluções utilizadas: a solução de DEN foi oferecida aos animais na concentração de 40 mg / l⁴, a solução de NNN foi oferecida na concentração de 30 mg/l; e a solução alcoólica utilizada foi diluída a 6% de etanol. As soluções finais eram acondicionadas em recipientes de vidro e guardadas na geladeira a 4 C, protegidas da luz, até que fossem oferecidas aos animais: a solução de DEN era colocada por 4 dias consecutivos e as demais soluções, de acordo com cada grupo, nos 3 dias restantes, durante os 180 dias do experimento. O controle da evolução do experimento foi diário. Nos dias das trocas das soluções, era medido o volume ingerido pelos animais de cada gaiola e o restante era desprezado. Com isso, pôde-se mensurar o consumo médio das soluções a fim de verificar se havia diferenças entre os grupos. (ANEXO B)

Divisão dos grupos: os 208 animais foram divididos em 5 grupos conforme o tipo de solução oferecida:

Grupo 1 (**G1**) - 16 animais, que receberam somente água (controles)

Grupo 2 (**G2**) - 48 animais, que receberam água (dias 1, 2 e 3) e DEN (dias 4, 5, 6 e 7)

Grupo 3 (**G3**) - 48 animais, que receberam solução aquosa de NNN (dias 1, 2 e 3) e DEN (dias 4, 5, 6 e 7)

Grupo 4 (**G4**) - 48 animais, que receberam solução alcoólica a 6% (dias 1, 2 e 3) e DEN (dias 4, 5, 6 e 7)

Grupo 5 (**G5**) - 48 animais, que receberam NNN em solução alcoólica a 6% (dias 1, 2 e 3) e DEN (dias 4, 5, 6 e 7)

Morte dos animais: a morte dos camundongos ocorreu em média após 180 dias (175 a 185 dias) do início do experimento para todos os grupos, pela inalação de éter etílico em campânula de vidro fechado. Após a morte, foi feita a retirada do

esôfago e estômago em bloco, por meio de incisão mediana toracoabdominal anterior xifopúbica. Esse bloco era fixado a uma lamina de cortiça pelas extremidades. Após, a peça era medida na sua extensão longitudinal para posterior comparação entre os grupos.

Análise macroscópica: com auxílio de microscópio estereoscópico, o bloco era aberto na sua face anterior por tesoura de microdissecção, longitudinalmente, desde o piloro até a porção cervical do esôfago. Procedia-se então à coloração com azul de toluidina e, após a contagem do número de lesões presentes no esôfago, obtinha-se o índice tumoral de Rubio ⁴ — numero de lesões / tamanho esôfago (cm). A seguir, o bloco era fixado em formalina tamponada a 10 % por 72 horas e processado no laboratório para posterior análise da microscopia. (ANEXO C)

Análise microscópica: o processamento ocorria após o esôfago ser enrolado sobre si mesmo a partir de uma das extremidades, com vistas a gerar cortes histológicos que atingissem um perfil longitudinal da víscera. Após, os cortes eram corados pela técnica de hematoxilina-eosina. Foram então analisados em microscópio ótico comum para identificação de alterações histopatológicas⁵, descritas como: 1) histologia normal; 2) esofagite; 3) displasia de baixo grau; 4) displasia de alto grau (incluídos aqui os casos de *carcinoma in situ*); e 5) carcinoma invasor: da mucosa, da muscular da mucosa; da submucosa e da muscular própria. (ANEXO C)

Análise estatística: os resultados obtidos foram avaliados empregando-se a análise de variância ou o teste de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos na análise das variáveis quantitativas e o Teste do Qui-Quadrado ou o teste exato de Fischer para as variáveis qualitativas. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Do total de 208 animais, houve 12 perdas durante o experimento. Oito destes animais morreram em decorrência de um resfriamento prolongado ocasionado pelo extravasamento da solução para beber no G5. As quatro demais perdas foram por óbitos ocorridos antes do final do experimento. Além dos 12 casos de perdas de animais, houve 7 casos de óbito antes do final do experimento: 3 no G2 (aos 153, 162 e 157 dias), 2 no G3 (aos 148 dias e 169 dias) e 2 no G4 (aos 139 e 171 dias). Nas necrópsias, identificaram-se macroscopicamente lesões de broncopneumonia, tumores de pulmão e tumores hepáticos.

O volume de solução ingerido variou de acordo com o tipo de solução oferecida (Tabela 1). O volume médio de água ingerido pelo G1 durante todo o experimento foi de 32,1 ml/dia por gaiola (4,01 ml/dia por animal). Valores muito semelhantes de solução só de água foram ingeridos por G2: 31,9 ml/dia por gaiola (3,98 ml/dia por animal). Em relação à ingesta de DEN, observou-se que os volumes médios foram muito próximos nos quatro grupos que ingeriram essa solução: G2: 27,07 ml/dia por gaiola (3,38 ml/dia por animal); G3: 27,30 ml/dia (3,41 ml/dia); G4: 26,96 ml/dia (3,37 ml/dia); e G5: 27,77 ml/dia (3,47 ml/dia).

As soluções contendo álcool e/ou NNN apresentaram volumes bastante diferenciados de consumo entre os grupos. O G2, que ingeriu a solução pura de NNN, teve um volume médio de consumo por gaiola de 15,77 ml/dia (1,97 ml/dia por animal). O G3, que bebeu a solução alcoólica a 6%, teve uma ingestão média de 28,66 ml/dia (3,58 ml/dia por animal). Já o G5, que ingeriu a solução alcoólica de NNN, consumiu 15,50 ml/dia (1,93 ml/dia por animal), menor volume consumido dentre todos os grupos de soluções.

A análise do tamanho dos esôfagos demonstrou os seguintes resultados, em média: G1: 35,9 mm; G2: 35,1 mm; G3: 35,8 mm; G4: 35,4 mm; e G5: 36,1 mm. Não

houve diferença significativa para $p > 0,05$. Na análise macroscópica dos esôfagos, observaram-se lesões papilares, vegetantes e ulceradas, indistintamente entre os grupos testados, apresentando entre 2 e 5 mm de diâmetro (Figuras 1 e 2). As lesões apresentaram-se uniformemente distribuídas em toda a extensão do esôfago.

Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os demais grupos, que ingeriram os carcinógenos, em relação à presença de lesões tumorais ($p < 0,001$). Do total de 180 animais (já excluídas as perdas) expostos aos carcinógenos, observaram-se lesões tumorais em 165 (91,7%). Não se demonstrou, porém, diferença estatística significativa entre os grupos que apresentaram tumores, em relação ao número de lesões ($p = 0,71$). As medianas de tumores em cada grupo foram as seguintes: em G1: ausência de lesões; em G2: 3,0; em G3: 2,0; em G4: 2,0 e em G5: 3,0. O índice de tumores proposto por RUBIO foi calculado com os seguintes valores para cada grupo: para G1: 0; para G2: 0,783; para G3: 0,697; para G4: 0,647; e para G5: 0,741. Também em relação ao índice não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,72$) (Tabela 2).

A microscopia demonstrou ausência total de lesões no G1 (16 animais). Nos demais grupos, todos os animais apresentaram algum tipo de alteração histológica (Figuras 3 e 4). A incidência de esofagite foi de 6,1% (11 animais). A incidência total de displasia de baixo grau foi de 8,4% (15 animais) e de displasia de alto grau, de 21,2% (38 animais). A incidência de carcinoma invasor foi de 64,2% (115 animais). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao controle ($p < 0,001$), porém não houve diferença significativa entre os outros quatro grupos, excluído o controle, em relação aos diferentes tipos de lesão ($p = 0,73$).

O nível de invasão microscópica encontrado nos 115 animais em que havia carcinoma invasor foi o seguinte: 38,3% (44 animais) tiveram invasão da mucosa (mm1 ou mm2); 37,4% (43) tiveram invasão da *muscularis mucosae*; 15,6% (18) tiveram invasão da submucosa (sm1 ou sm2); e 8,7% (10) tiveram invasão da camada

muscular própria. Na comparação entre os grupos, excluído o controle, também não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grau de invasão do carcinoma ($p > 0,05$). Os achados da microscopia estão representados na Tabela 3.

DISCUSSÃO

Os compostos nitrosos começaram a ser estudados neste século a partir da década de 30. Vários estudos demonstraram a sua hepatotoxicidade, manifestada por insuficiência e necrose hepáticas, tanto em seres humanos como em animais¹⁶⁻¹⁸. Harris *et al.*¹⁹ demonstraram que as nitrosaminas produziam a alquilação do DNA em tecidos humanos *in vitro*. Os compostos N-nitrosos apresentam-se na dieta ou no ambiente em doses bem inferiores àquelas necessárias para desenvolver câncer, por isso a grande preocupação é com a sua exposição crônica. Relatos como os de Ender *et al.*^{20,21} referiram a presença de nitratos carcinogênicos em peixes e outras carnes conservadas, em cogumelos, queijos e leite. A partir desses estudos, o *International Agency for Research on Cancer*²² sugeriu que as nitrosaminas poderiam estar relacionadas ao câncer de esôfago no homem.

A descoberta de que as nitrosaminas apresentam um organotropismo bem definido permitiu o desenvolvimento de modelos de estudo de câncer em vários órgãos, entre eles o esôfago. Baker²³, Reuber^{24,25} e Rubio^{3,4} utilizaram a dietilnitrosamina e produziram com esta droga a carcinogênese esofágica. As doses utilizadas nos trabalhos iniciais, como os de Duckrey *et al.*²⁶ e Baker²³, tinham uma elevada hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. Por isso, estudos posteriores como os de Rubio *et al.*⁵ utilizaram doses menores a fim de diminuir a mortalidade dos animais de experimentação.

No presente estudo, usaram-se camundongos conforme modelos prévios de Clapp; Craig² e Rubio *et al.*⁵, que, utilizando a DEN nesse tipo de animais,

demonstraram factibilidade com baixo custo. O período de exposição de 180 dias adotado foi aquele preconizado como o período médio em que ocorre maior número de lesões cancerosas com níveis aceitáveis de mortalidade^{2,4,27,28}. Sabe-se que, a partir de 120 dias do início da administração da nitrosamina, já se desenvolvem lesões do tipo displásicas e alguns carcinomas invasores⁵; porém é em 180 dias que existe o maior número de lesões. Períodos maiores de exposição apresentam um maior número de óbitos.

A diluição de carcinógeno utilizada foi a mesma proposta por Rubio *et al.*⁵ (40 mg/l), porém o período semanal de ingestão foi aumentado em 24 horas, o que significou 25% a mais na dose final do carcinógeno. A hipótese inicial foi que a mortalidade seria maior do que a relatada por esse autor; o que ocorreu, porém, foi que, excluídas as perdas, houve apenas 7 óbitos no total de 196 animais. Possivelmente, esses resultados decorrem do fato de que a droga foi utilizada em doses suficientemente baixas e em tempo prolongado de exposição para evitar a hepatotoxicidade. Tanto Rubio^{3,4} quanto Kruei²⁸ relataram uma mortalidade bem maior, apesar de terem utilizado as mesmas doses por apenas três dias da semana. Do total de 252 camundongos machos utilizados por Kruei²⁸, houve perdas de 68 deles devido a morte precoce, a qual pode dever-se ao comportamento agressivo dos camundongos machos. O fato de se terem utilizado fêmeas ao invés de machos pode ter sido o responsável pela ausência desse tipo de comportamento no presente trabalho. Estudos adicionais devem ser feitos para melhor avaliar essa possível reação dos animais a essas drogas.

As nitrosaminas tabaco-específicas (NATE) são os únicos carcinógenos relacionados ao tabaco que causam câncer de esôfago em animais de laboratório. Dos quatro tipos de NATE que causam câncer de esôfago, a N-nitrosornicotina (NNN) é a que apresenta maiores concentrações na fumaça do cigarro. Deve-se

salientar, porém, que os níveis usados para produzir experimentalmente tumores de esôfago são maiores do que aqueles a que são expostos os fumantes em geral.²⁹

Um estudo realizado por Hu *et al.*¹⁶, em ratos, demonstrou o desenvolvimento de papilomas e carcinomas epidermóides de esôfago em 23/24 animais após a ingestão de solução líquida de NNN a 200mg/l por 36 semanas. Hoffmann *et al.*³⁰ descreveram o desenvolvimento de tumores benignos em ratos após receberem injeções subcutâneas de NNN por 20 semanas.

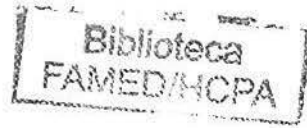
Castonguay *et al.*³¹ utilizaram dois grupos de ratos para definir o efeito do consumo crônico de etanol na carcinogenicidade da NNN. O carcinógeno foi instilado por via subcutânea ou por via oral, e o álcool oferecido em água de beber em concentração de 6%. Os animais que utilizaram a solução alcoólica somada a NNN por via subcutânea tiveram maior índice de lesões na cavidade nasal, porém o maior número de lesões de esôfago surgiu naqueles que utilizaram a NNN por via oral. Os autores discutiram a possibilidade de que as enzimas responsáveis pela ativação das nitrosaminas, entre elas o citocromo p450, tenham maior atividade nas mucosas nasal e esofágica. Além disso, é possível que o etanol induza a atividade destas enzimas, aumentando com isso a susceptibilidade ao efeito do carcinógeno. Utilizando doses semelhantes, ofereceu-se aos animais, no presente estudo, uma solução alcoólica a 6%, que é capaz de influenciar o metabolismo e a carcinogenicidade das nitrosaminas. Quando se comparam os volumes ingeridos de soluções de DEN e de álcool, percebe-se que não há diferença significativa entre eles, o que demonstra que essa é uma dose adequada para os animais.

A N-nitrosornicotina foi oferecida na dose de 30 mg/l em função do cálculo do peso dos camundongos. Como o composto existente no mercado era um precursor (nornicotina), foi necessária a reação com uma molécula de dióxido de nitrogênio para se obter a NNN. Optou-se por utilizar o carcinógeno por via oral, em função de relatos prévios demonstrando a maior incidência de lesões esofágicas quando a NNN é

oferecida por essa via^{5,31-33}. Ao analisar os volumes de ingestão das soluções, ficou claro que a presença da NNN nas soluções levou a uma diminuição do consumo médio, em torno de 50 % do volume usualmente ingerido de água pura e de cerca de 40% do volume, quando comparado às soluções de álcool puro ou de DEN, tanto na solução aquosa como na alcoólica de NNN. Mesmo nos dois grupos que receberam esta droga, não houve alteração da ingestão de DEN nos primeiros quatro dias da semana, o que demonstra que a menor ingestão está relacionada a NNN exclusivamente. Ao analisar os resultados macro e microscópicos, observou-se que essa menor ingestão não produziu diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Os resultados observados demonstram que a mortalidade global no experimento foi extremamente baixa. Nota-se que o efeito tóxico das nitrosaminas, tanto no grupo que ingeriu apenas DEN como nos outros dois grupos que receberam DEN e NNN, foi controlado pelas baixas doses. Isso permitiu que, mesmo em doses cerca de 25% maiores do que aquelas relatadas em modelos semelhantes^{4,5,28}, pudesse ser observado um grande efeito carcinogênico da DEN, com baixa mortalidade. O fato de se ter adicionado um carcinógeno potente como a NNN não foi um fator de elevação da mortalidade.

Na análise da macroscopia, observou-se, inicialmente, que mais de 90% dos animais expostos aos carcinógenos apresentaram tumores macroscópicos na luz esofágica. Vários autores^{2,5,23,25,34} relataram previamente valores bem inferiores em modelos utilizando vários tipos de roedores. O que mais se aproximou dos valores obtidos foi Rubio *et al*⁵, que apresentou 85% de lesões tumorais na análise macroscópica. Porém, ao se analisarem os resultados da microscopia do experimento desse autor, observou-se que 85% desses casos apresentavam papilomas escamosos, que são lesões benignas, com o restante dos casos dividindo-se em displasias de alto e baixo grau e alguns carcinomas invasores.



Ao se compararem os grupos do ponto de vista macroscópico, nota-se que há uma diferença estatística significativa em relação ao número de lesões entre os cinco grupos; porém, quando se analisam somente os grupos que usaram carcinógeno, não há diferença estatística significativa nem em relação ao número de lesões nem em relação ao índice de Rubio ⁴.

Os resultados da microscopia demonstram um alto índice de carcinomas epidermóides. Esse índice foi de 64,2% quando se consideram apenas os carcinomas invasores ou de 85,4% caso se associem a esses os casos de displasia de alto grau. Esses resultados demonstram ser este um excepcional modelo de carcinogênese esofágica, já que desenvolveu alta incidência de neoplasia com baixa mortalidade. Ao analisar o presente modelo em comparação ao modelo descrito por Rubio ⁴, vê-se que, enquanto naquele houve desenvolvimento de 15% de lesões malignas e 85% de papilomas, neste mais de 85% dos animais apresentaram-se com câncer. Como no grupo que utilizou somente DEN a incidência do câncer foi de 88,9% e como nos demais grupos ela se manteve em torno de 85% a 90%, é provável isso tenha ocorrido porque o modelo (DEN) apresenta um potencial indutor tão elevado, que o fato de adicionar promotores como a NNN e o álcool não produziu nenhum acréscimo significativo à carcinogênese esofágica.

Talvez esse baixo efeito promotor do álcool etílico e da NNN decorra da hipótese, já comentada por Rubio *et al.*⁵, de que clones de células esofágicas são programados para crescimento tumoral nas fases iniciais da carcinogênese com DEN, sendo pouco influenciados pela persistência posterior do estímulo carcinogênico. É possível que, com uma exposição menos intensa à DEN, mantendo o estímulo do álcool e da NNN, se possa observar um efeito potencializador dessas substâncias à indução protagonizada pela DEN.

Após a utilização do modelo de esofagocarcinogênese, concluiu-se que:

- o modelo experimental utilizando dietilnitrosamina foi efetivo para desenvolver carcinoma esofágico, tendo-se observado as seguintes lesões epiteliais: esofagite, displasia de baixo grau, displasia de alto grau e carcinoma invasor;

- o álcool e a N-nitrosornicotina não demonstraram um efeito promotor da carcinogênese esofágica;

- a grande incidência de câncer observada (85,4%) lança a perspectiva de utilização deste modelo para análise da ação de drogas citoprotetoras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Duckrey, H. Carcinogenese Wirkungh von N-Methyl-N-Nitroso-Anili. *Naturwissenschaften* 1961;48:722-3.
2. Clapp NK, Craig AW. Carcinogenic effects of diethylnitrosamine in RF mice. *J Natl Cancer Inst* 1967;39:903-16.
3. Rubio CA. Experimental models. In: Pfeiffer CJ. *Cancer of the esophagus. USA: CRC Press; 1982. v. 3, p. 139-68.*
4. Rubio CA. Epithelial lesions antedating esophageal carcinoma. Histologic study in mice. *Pathol Res Pract* 1983;176:269-75.
5. 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.
6. Rubio CA. Post-carcinogen interval in carcinogenesis. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988;24:499-500.
7. Rubio CA, Liu FS, Zhao HZ. Histological classification of intraepithelial neoplasias and microinvasive squamous carcinoma of the esophagus. *Am J Surg Pathol* 1989;13:685-90.
8. Hoffmann D, Castonguay A, Rivenson A, Hecht SS. Comparative carcinogenicity and metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and N'-nitrosornicotine in Syrian golden hamsters. *Cancer Res* 1981;41:2386-93.
9. Lechner JF, Babcock MS, Marnell M, Narayan KS, Kaighn ME. Normal human prostate epithelial cultures. In: Harris CC, Trump BF, Stoner GD editors. *Methods and perspectives in cell biology. New York: Academic Press, 1980. Vol.2, p. 195-225.*
10. Prolla JC, Dietz J, Costa LA. Rio Grande do Sul geographic differences in esophageal cancer mortality. *Rev Ass Med Bras* 1993;39:217-20.

11. Williams RR, Horn JW. Association of cancer sites with tobacco and alcohol consumption and socioeconomic status of patients: interview study from the Third National Cancer Survey. *J Natl Cancer Inst* 1977;58:525-47.
12. De Stefani E, Muñoz N, Esteve J, Vassallo A, Victora C, Teuchmann S. Mate drinking, alcohol, tobacco, and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Res* 1990;50:426-31.
13. Hecht SS, Chi-Hong BC, Ohmori T, Hoffmann D. Comparative carcinogenicity of the tobacco-specific nitrosamines, N'-Nitrosornicotine and 4-(N-Methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone. *Cancer Res* 1980;40:298-302.
14. Preston-Martin S. Evaluation of the evidence that Tobacco-Specific Nitrosamines (TSNA) cause cancer in humans. *Crit Rev Toxicol* 1991;21:295-8.
15. IARC. N'-Nitrosornicotine. *Iarc Monogr* 1987;37:241-61.
16. Hu MW, Bondinelli WE, Hoffmann D. Chemical studies on tobacco smoke. XXIII. Synthesis of carbon-14 labelled myosmine, nornicotine and N'-nitrosornicotine. *J Labelled Compound* 1974;10:79-88.
17. Freund HA. Clinical manifestations and studies in parenchymatous hepatitis. *Ann Intern Med* 1937;10:1144-56.
18. Fussgaenger RD, Ditschuneit H. Lethal exitus of a patient with N-nitrosodimethylamone poisoning 2.5 years following the first ingestion and signs of intoxication. *Oncology* 1980;37:273-7.
19. Harris CC, Autrup H, Stoner GD, Trump BF, Hillman E, Schafer PW, *et al.* Metabolism of benzo [a] pyrene, N-nitrosodimethylamine and N-nitrosopyrrolidine and identification of the major carcinogen - DNA adducts formed in cultured human esophagus. *Cancer Res* 1979;39:4401-6.
20. Ender F, Harve G, Helgebostad A, Koppang N, Madsen R, Cheh L. Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herringneal produced from sodium nitrite-preserved herring. *Naturwissenschaften* 1964;51:637-45.

21. Ender F, Harve G, Madsen R, Cheh L, Helgebostad A. Studies an conditions under which N-nitrosodimethylamine is formed in herring meal produced from nitrite-preserved herring. *Z. Tierphysical Tiernaehv. Futtermittelkd* 1967;22:181-88.
22. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some n-nitroso compounds. *Iarc Monogr Eval Carcinog Risk Chem Man* 1978;17:1-365.
23. Baker J. Induction of tumors of the stomach and esophagus in inbred chinese hamsters by anal diethylnitrosamine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974;146:291-8.
24. Reuber MD. Carcinoma of the esophagus in rats by diethylnitrosamine. *Eur J Cancer* 1975;11:97-9.
25. Reuber MD. Effect of age and sex on lesions of the esophagus in Buffalo Strain Rats ingesting diethylnitrosamine. *Expl Cell Biol* 1976;44:65-72.
26. Duckrey H, Preussman R, Blum G, Ivankovic S, Afkham J. Erzeugung van Karzinamen der Speiserohre demch unsummetrische Nitrosamine. *Naturwissenschaften* 1963;50:100-105.
27. Napalkov NP, Pozharisski KM. Morphogenesis of experimental tumors of the esophagus. *J Natl Cancer Inst* 1969;42:922-40.
28. Krueel CDP. Classificação citopatológica das lesões precursoras do carcinoma escamoso do esôfago: modelo experimental em camundongos [Tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina;1992.
29. Hecht SS, Hoffmann D. The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer. *Cancer Surv* 1989;8:273-94.
30. Hoffmann D, Rivenson A, Amin S, Hecht SS. Dose-response study of the carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines in F344 rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 1984;108:81-6.

31. Castonguay A, Rivenson A, Trushin N, Reinhardt J, Spathopoulos S, Weiss CJ, *et al.* Effects of chronic ethanol consumption on the metabolism and carcinogenicity of N'-Nitrosornicotine in F344 rats. *Cancer Res* 1984;44:2285-90.
32. Hecht SS, Young R, Masura Y. Comparative carcinogenicity in F344 rats and Syrian golden hamsters of N'- nitrosornicotine and N'-nitrosornicotine - 1- N-oxide. *Cancer Lett* 1983;20:333-40.
33. Hecht SS. Metabolic activation and detoxification of tobacco -specific nitrosamines- a model for cancer prevention strategies. *Drug Metab Rev* 1994;26:373-90.
34. Mandard AM, Marnay J, Herlin P, Elie H, Tuyns AJ, Le Talaer JY. Cancer de l'oesophage induit chez le rat Wistar par 1 éthyl-N-Butyl-Nitrosamine. *Bull Cancer* 1984;71:419-24.
35. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. *New Engl J Med* 1997;336:309-16.

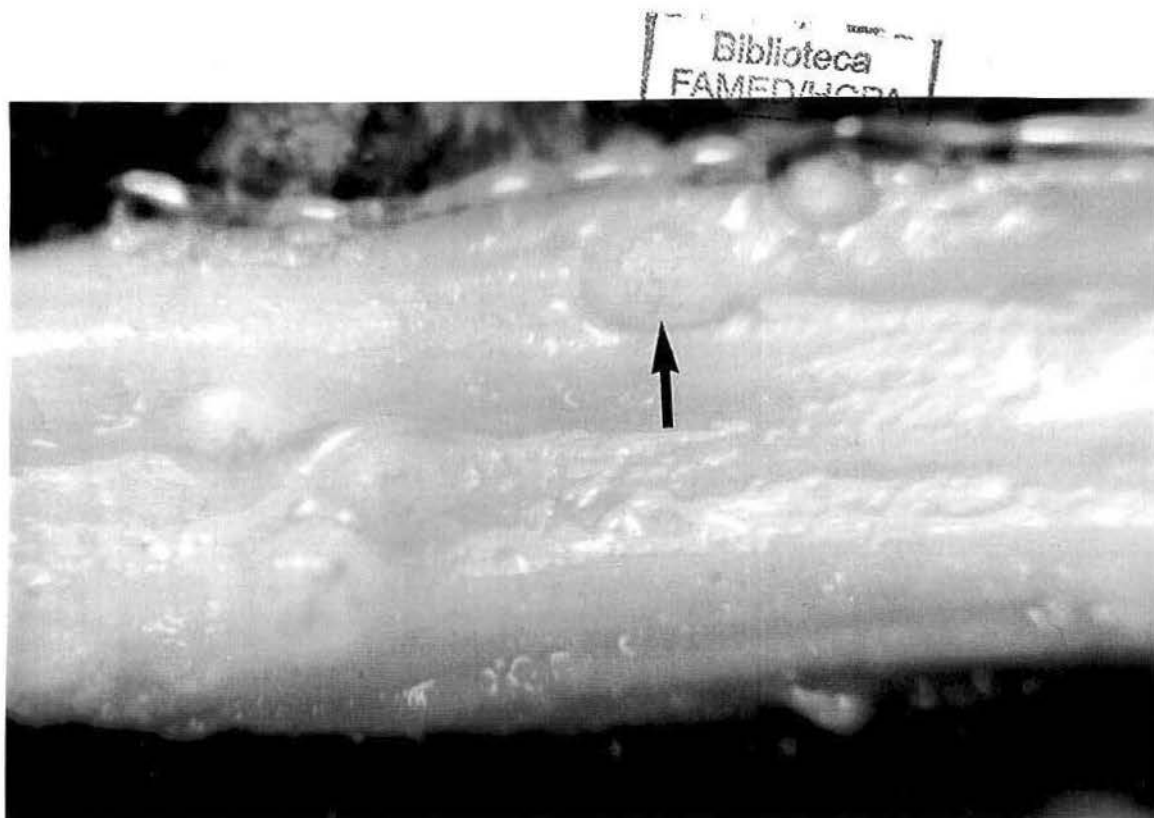


Figura 1 - Macrofotografia de lesão esofágica de animal do grupo 3 (DEN + solução aquosa de NNN). Notam-se várias lesões polipóides sesséis, algumas superficialmente erodadas (*seta*).

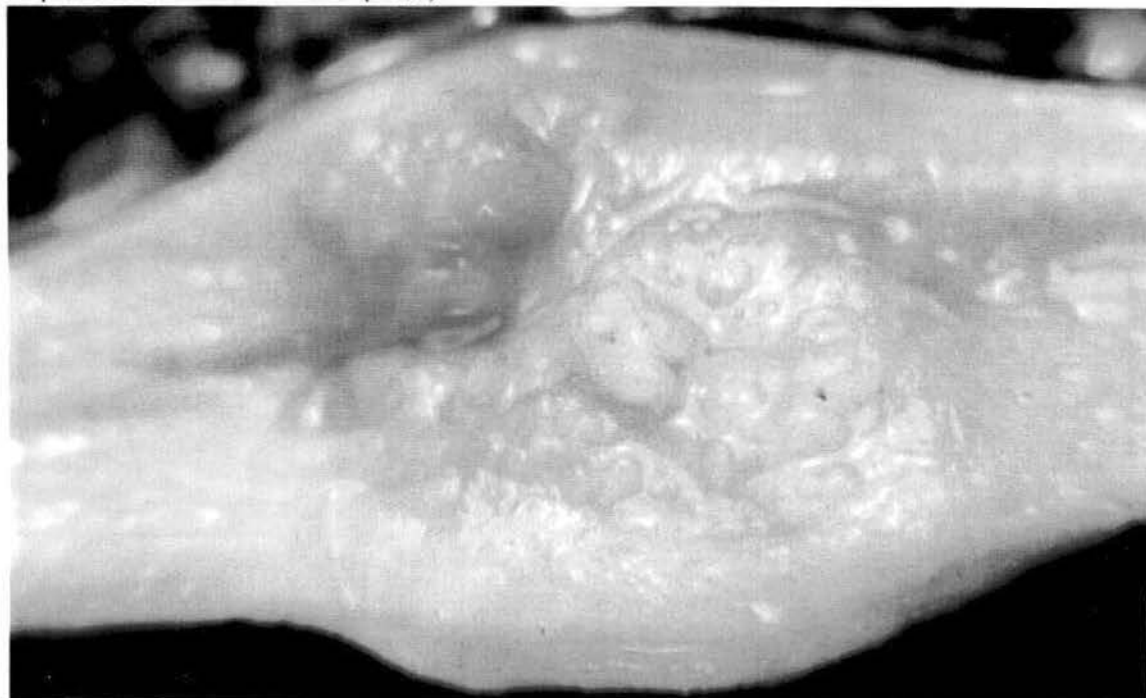


Figura 2 - Macrofotografia de lesão esofágica de animal do grupo 2 (DEN + água). Nota-se lesão tumoral infiltrativa e vegetante que ocupa toda a circunferência do órgão. A lesão mostra-se ressaltada e corada pelo azul de toluidina.

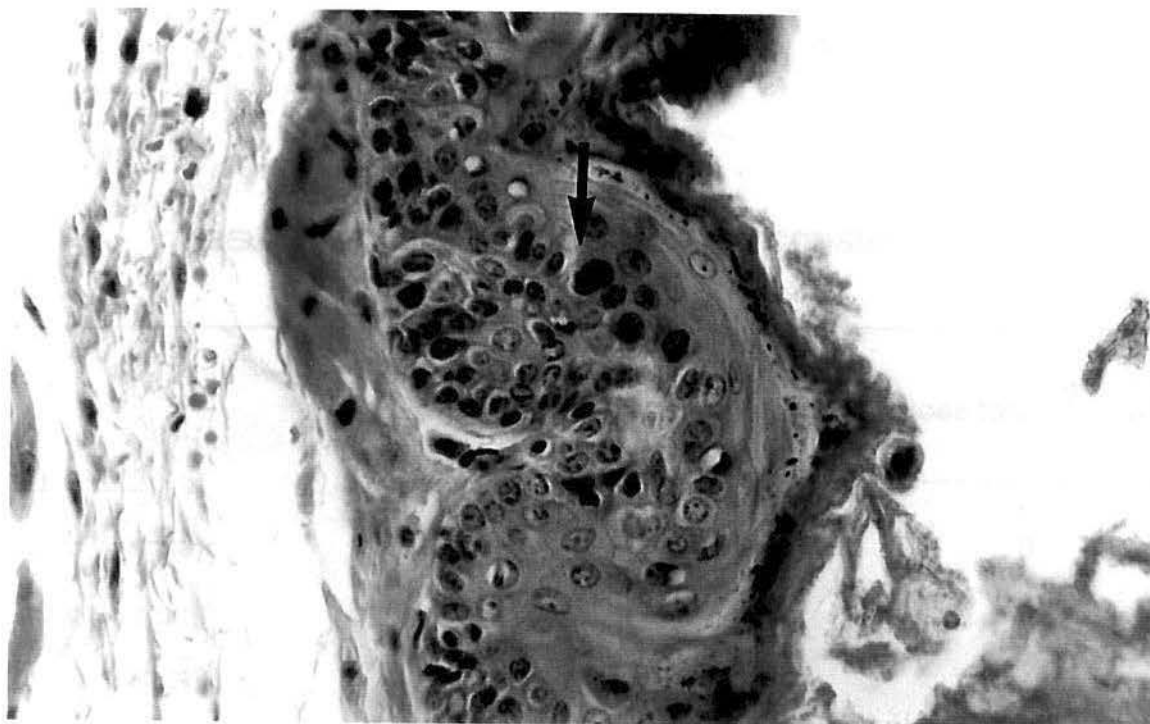


Figura 3 - Microfotografia (HE 250 X) de lesão de displasia de baixo grau em esôfago de animal do grupo 5 (DEN + solução alcoólica a 6% de NNN). Notam-se células discarióticas no terço inferior do epitélio escamoso (seta)

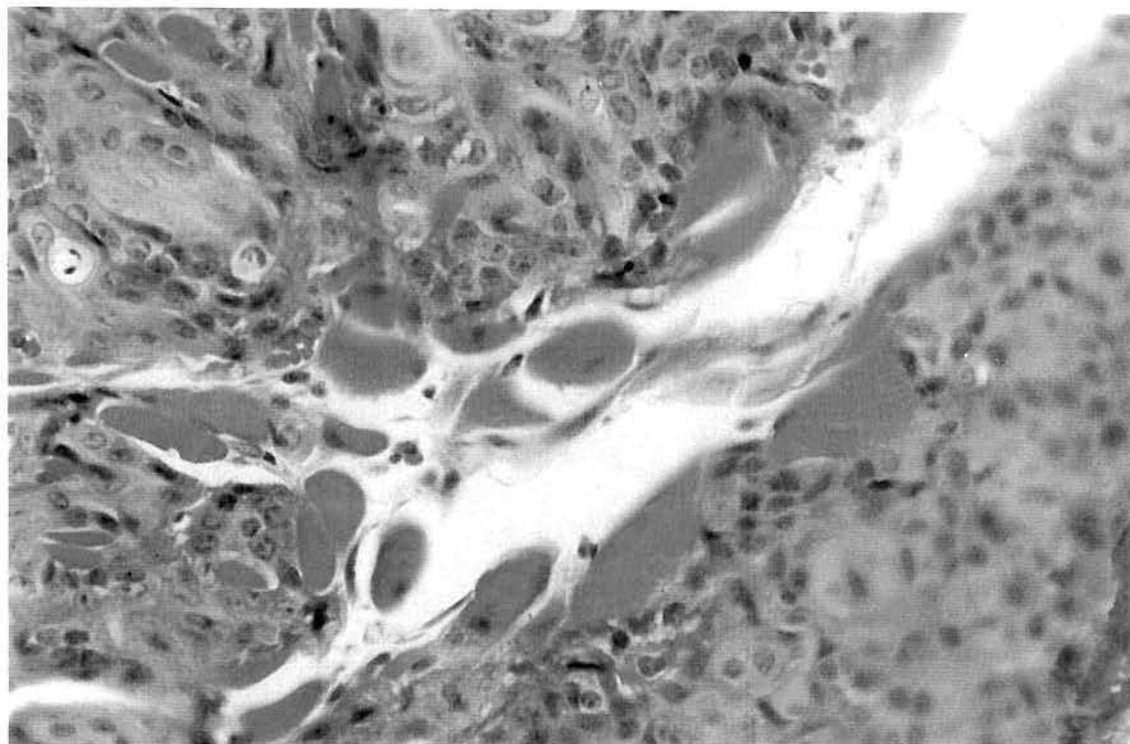


Figura 4 – Microfotografia (HE 400 X) de lesão de carcinoma epidermóide invasor que atinge a camada muscular própria do esôfago de animal do grupo 4(DEN + álcool 6%).

TABELA 1.- VOLUME DIÁRIO DE LÍQUIDO CONSUMIDO

	Por caixa (ml)	Por rato (ml)	Dose total (180 dias)
<u>SOLUÇÃO 1</u>			
Grupo 1 (água)	32,1	4,0	0
Grupo 2 (água)	31,9	3,9	0
Grupo 3 (NNN)	15,8	2,0	10,6 mg
Grupo 4 (álcool)	28,7	3,6	38,6g
Grupo 5 (NNN + Álcool)	15,5	1,9	10,4 + 20,8g
<u>SOLUÇÃO 2</u>			
Grupo 1 (água)	32,1	4,0	0
Grupo 2 (DEN)	27,1	3,4	24,3mg
Grupo 3 (DEN)	27,3	3,4	24,9mg
Grupo 4 (DEN)	27,0	3,3	24,2mg
Grupo 5 (DEN)	27,8	3,5	24,9mg

TABELA 2.-ACHADOS DE MACROSCOPIA

	Mediana do número de tumores	Média do tamanho dos esôfagos	Índice de Rubio ^a (média)
Grupo 1	0	3,55	0
Grupo 2	3,0	3,51	0,78
Grupo 3	2,0	3,58	0,70
Grupo 4	2,0	3,54	0,65
Grupo 5	3,0	3,71	0,74
p * =	> 0,05	> 0,05	> 0,05

^a número de tumores / tamanho do esôfago

* relativo aos grupos 2 - 5

TABELA 3.-FREQUÊNCIA RELATIVA DOS ACHADOS NA MICROSCOPIA

	Grupo 1* (n = 16)	Grupo 2** (n= 45)	Grupo 3 ** (n = 43)	Grupo 4** (n = 48)	Grupo 5** (n = 43)
Normal	16	0	0	0	0
Esofagite	0	2 (4.4%)	3 (7.0%)	3 (6.3%)	3 (7.0%)
Displasia de Baixo grau	0	3 (6.7%)	6 (14.0%)	1 (2.1%)	5 (11.6%)
Displasia de Alto grau	0	11 (24.4%)	9 (21.0%)	11 (23.0%)	7 (16.3%)
Carcinoma Invasor***	0	29 (64.4%)	25 (58%)	33 (68.8%)	28 (65.1%)
<i>Mucosa</i>	0	11(37,9%)	12 (48%)	12 (36,4%)	9 (32,1%)
<i>Muscularis mucosae</i>	0	13(44,8%)	5 (20%)	14 (42,4%)	11(39,3%)
<i>Submucosa</i>	0	3(10,4%)	6 (24%)	6 (18,2%)	3 (10,7%)
<i>Muscular Própria</i>	0	2(6,9%)	2(8%)	1 (3%)	5 (17,9%)

* $p < 0,001$ (comparação entre o grupo G1 e os demais para presença de lesão)

** $p > 0,05$ (N.S. entre os grupos que beberam carcinógenos)

*** $p > 0,05$ (N.S. em relação à comparação do grau de invasão do carcinoma)

Induction of esophageal carcinogenesis by diethylnitrosamine and assessment of the promoting effect of ethanol and N-nitrosornicotine: experimental model in mice*

R. R. Gurski, C. C. Schirmer, C. R. Krueel, F. Komlos, C. D. P. Krueel, M. I. Edelweiss

Department of General Surgery, Federal University of Rio Grande Do Sul State, Brazil

SUMMARY. It is known that some nitrosamines preferably affect particular organs because of their organospecificity. Diethylnitrosamine (DEN) is one of the most powerful nitrosamines for experimentally inducing esophagus cancer. The present study aimed to evaluate the rate and type of epithelial lesions induced by DEN in mice. We also assessed the role of alcohol and N-nitrosornicotine (NNN) as promoters of this carcinogenesis. A total of 208 female mice (*Mus musculus*) were allocated to five experimental groups: group 1, water only (controls); group 2, DEN + water; group 3, DEN + NNN; group 4, DEN + 6% alcohol solution; group 5, DEN + NNN + 6% alcohol solution. Animals in groups 2, 3, 4 and 5 received DEN (0.04 ml/l) three times per week, and during the following 4 days they received the other two solutions. NNN was provided at a final concentration of 30 mg/l. The overall experimental period was 180 days. At the end of this time, the animals were killed and their esophagus was dissected for macro- and microscopic analysis.

There was no significant difference in relation to the size of the esophagus and to the average DEN intake by the animals ($p > 0.05$). A statistically significant difference ($p < 0.0001$) was observed between controls and all other experimental groups. There was no significant difference among experimental groups treated with carcinogens ($p > 0.05$). The average incidence of cancer was 85.4%.

The experimental model used in the present study is a very potent indicator of esophagus cancer. Owing to the high incidence of cancer observed in the present study, it was not possible to assess the effect of alcohol and NNN as inducers of the development of esophagus cancer.

INTRODUCTION

Nitrosamines were first recognized as the most important carcinogens responsible for the induction of esophagus cancer after the experimental work of Druckrey.¹ That study demonstrated the emergence of esophageal neoplasias in the esophagus of rats treated with N-methyl-N-nitrosoaniline. The use of diethylnitrosamine (DEN) to induce squamous cell carcinoma in mouse esophagus was first reported by Clapp and Craig.² These authors showed that 18% of the animals developed tumors after being exposed to the carcinogens for a period of 180 days. More recently, Rubio³⁻⁷ developed an experimental mouse model in which the animals received DEN dissolved

in their drinking water at a concentration of 40 mg/l, in order to diminish the mortality caused by the drug hepatotoxicity.

It is well established that the consumption of alcoholic drinks considerably increases the risk of developing squamous neoplasia of the esophagus in patients who smoke.^{8,9} Although various epidemiologic studies have demonstrated a relationship between alcohol, active smoking and esophageal carcinoma of the esophagus,¹⁰⁻¹² a cause-effect relationship has yet to be defined experimentally.¹³ The mechanism by which alcohol exerts its intensifying effect is still unknown, despite the different hypotheses put forward to explain it.

Several investigators working with tobacco-specific nitrosamines (NATE) recognize that they are potent carcinogens and are probably responsible for most smoking-related neoplasia. In that group of nitrosamines, N-nitrosornicotine (NNN) shows the highest specificity to induce experimentally the development of tumors in the esophagus.^{14,15} As stated

Address correspondence to: R. R. Gurski, Edmundo Gardolinski St 115/04, Zip code - 90.480130, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: (+55) 51 3281036. Fax: (+55) 51 3308783.

*Presented at the VIIth World Congress, International Society for Diseases of the Esophagus, Montreal, 2 September 1998.

in other studies, experimental work needs to be designed to demonstrate the synergistic effect of alcohol and active smoking to induce the development of esophageal tumors, making it possible to explain and confirm the relationship between them.¹⁴

In the present study, we have developed an experimental model to investigate the type and rate of epithelial lesions, particularly epidermoid carcinoma of the esophagus, in mice receiving DEN in their drinking water 4 days per week for a period of 180 days. In addition, we aimed to define the role of alcohol and NNN, on their own and in combination, as promoters of esophagus tumors.

MATERIALS AND METHODS

Animals and experimental environment

All 208 female mice, *Mus musculus*, used in the present study belonged to the strain that was bred in the Animal Facilities House of the Biological Research Institute (IPB/RS). Animals were \approx 3 months old and weighed, on average, 30 g at the beginning of the experiment. The mice were maintained under constant conditions of light (12-h light and 12-h dark periods) and air flow. The temperature varied between 7°C and 36°C. Groups of eight animals were allocated to plastic cages topped with a metal grid and bedded with sawdust. The cages were cleaned every other day.

Food and carcinogens

Animals were weaned when they were 21 days old. Water and rodent chow were provided ad libitum. The diet was supplied every 2 days and changed once a week. Tapwater from the Porto Alegre water supply was used for their drinking water and for preparing the different solutions.

Source and characterization of chemicals

Diethylnitrosamine (DEN) and *N*-nitrososornnicotine (NNN) were supplied by Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA (DEN, cat. no. 0756, C₄H₁₈N₂O 25-ml bottle, Density 0.95 g/ml, molecular weight 102.1; nornicotine cat. no. 3018, C₉H₁₂N₂ 50-mg bottle, 98% purity, molecular weight 148.2. NNN was prepared from nornicotine as described by HU et al.¹⁶

Experimental solutions

The DEN solution had a final concentration of 0.04 ml/l,⁴ and the NNN solution had a final concentration of 30 mg/l. The 6% alcoholic solution was made up with ethanol in water. Final solutions were stored in glass containers, maintained at 4°C in a fridge and protected from light until use. The DEN

solution was provided for 4 days of the week, and the other two solutions were allocated to the different experimental groups in the remaining 3 days of the week throughout the 180 experimental days. On days when the drinking water was changed, the amount consumed was recorded and the remaining fluid was discharged. In this way it was possible to estimate the average consumption of the different solutions and to assess whether there were differences among groups.

Design of experimental groups

A total of 202 animals were divided among five experimental groups according to the different regimens they were submitted to: group 1 (G1), 16 animals receiving pure water (controls); group 2 (G2), 48 animals receiving pure water on days 1, 2 and 3 and DEN on days 4, 5, 6 and 7; group 3 (G3), 48 animals receiving aqueous solution of NNN on days 1, 2 and 3, and DEN on days 4, 5, 6 and 7; group 4 (G4), 48 animals receiving 6% ethanol solution on days 1, 2 and 3, and DEN on days 4, 5, 6 and 7; group 5 (G5), 48 animals receiving 6% ethanol solution with NNN on days 1, 2 and 3, and DEN on days 4, 5, 6 and 7.

Collection of organs

Mice from all experimental groups were killed \approx 180 days after the beginning of the experiment (175–183 days) by ethyl ether inhalation in a glass container. Out of the 202 animals used in the present study, there were 14 losses from which no satisfactory tissues could be obtained.

After killing the mice, the esophagus and stomach were dissected as a single block through a xiphopubic anterior thoracoabdominal median incision. The block was fixed by its ends in a cork slide with metal pins. The length was measured and comparisons of the average values were made among the different groups.

Macroscopic analysis

The organ block was opened under a stereoscope microscope on its anterior face longitudinally from the pyloric region to the cervical area of the esophagus using a pair of microdissecting scissors. The block was then stained with toluidine blue and the number of lesions present in the esophagus was assessed in order to estimate the tumoral index:⁴ number of lesion/size of esophagus (cm). Afterwards, the organ was immersed in 10% buffered formalin solution for 72 h for fixation and then analyzed microscopically.

Microscopic analysis

Paraffin embedding was performed after folding the organ over, in order to produce histologic sections

that included the complete length of the viscera. After fixing in paraffin, the histologic sections were stained with hematoxylin-eosin.

The histologic sections of esophagus were examined under a light microscope to identify the following histopathological alterations: (1) normal histology; (2) esophagitis; (3) low-grade dysplasia; (4) high-grade dysplasia; (5) invasive carcinoma: mucosa, muscularis mucosae, submucosa, muscularis propria.

Statistical analysis

The data were analyzed by analysis of variance or the Kruskal-Wallis test for comparisons among groups in quantitative variables, and the chi-square test was used for the qualitative variables. Data were considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Out of the total of 208 mice used in the present study there were 12 losses. Eight of these animals (G5) died because of cold because the solution was dropped into the box. The remaining four losses were due to early death of mice from the same experimental group (G5), and again the macroscopic analysis of the material was not feasible. During preparation of the material for microscopic analysis there were 14 losses. In addition to the 12 above-mentioned losses, there were also seven deaths before the end of the experimental period: three in G2 (153, 162 and 157 days), three in G3 (148 and 169 days) and two in G4 (139 and 171 days). During necropsies, bronchopneumonia, lung tumors and hepatic tumors were observed.

The volume of solution taken by the animals varied according to the solution being provided (Table 1). The average water volume taken by mice in G1 throughout the experimental period was 32.1 ml/day per cage (4.04 ml/day per animal). Similar water-only intake values were observed for G2: 31.9 ml/day per cage (3.98 ml/day per animal). Regarding DEN intake, we observed that the average volumes were very similar among the four groups that received this solution: G2, 27.07 ml/day per cage (3.38 ml/day per animal); G3, 27.30 ml/day (3.41 ml per day); G4, 26.96 ml/day (3.37 ml/day); G5 27.77 ml/day (3.47 ml/day).

Regarding the alcohol- and/or NNN-containing solutions, there were considerably different intake volumes among groups. In G2, which received the pure NNN solution, we observed an average intake volume per cage of 15.77 ml/day (1.97 ml/day per animal). In G3, which received the 6% alcoholic solution, there was an average intake of 28.66 ml/day (3.58 ml/day per animal), a value very similar to that

Table 1. Daily fluid intake and total dose

	Per cage (ml)	Per animal (ml)	Total dose (180 days)
<i>Solution 1</i>			
Group 1 (water)	32.1	4.01	0
Group 2 (water)	31.9	3.98	0
Group 3 (NNN)	15.77	1.97	10.6 mg
Group 4 (alcohol)	28.66	3.58	38.6g
Group 5 (NNN + alcohol)	15.50	1.93	10.4 + 20.8g
<i>Solution 2</i>			
Group 1 (water)	32.1	4.01	0
Group 2 (DEN)	27.07	3.38	24.3 mg
Group 3 (DEN)	27.30	3.41	24.9 mg
Group 4 (DEN)	26.96	3.37	24.2 mg
Group 5 (DEN)	27.77	3.47	24.9 mg

obtained for the DEN solution. In G5, which received the alcoholic solution supplemented with NNN, the average intake was of 15.50 ml/day (1.93 ml/day per animal), the least volume taken among the different solution groups.

The analysis of the size of the esophagus showed the following mean values: G1, 35.9 mm; G2, 35.1 mm; G3, 35.8 mm; G4, 35.4 mm and G5, 36.1 mm. Correlation showed $p < 0.05$. Macroscopic analysis of the esophagus revealed exophytic, ulcerous and papillary lesions, between 2 and 5 mm in diameter, in all groups (Figs 1 and 2). The distribution of the lesions in the esophagus was uniform along its length.

There was a statistically significant difference between the control and the experimental groups that received carcinogens in relation to the presence of tumor lesions ($p < 0.0001$). The prevalence of lesions in groups that received carcinogens was 91.7% (165/180). However, there was no statistically significant difference among the groups presenting tumors in relation to the number of lesions ($p = 0.71$). The different groups showed the following median number of tumors: G1, no lesions; G2, 3.0; G3, 2.0; G4, 2.0 and G5, 3.0. The tumor index as suggested by

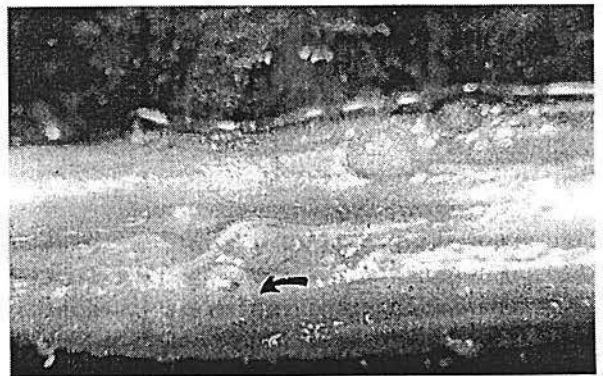


Fig. 1—Macrophotograph of an esophageal lesion in an animal from group 3. Several sessile polypoid lesions, some of which are superficially eroded, can be observed (arrow).

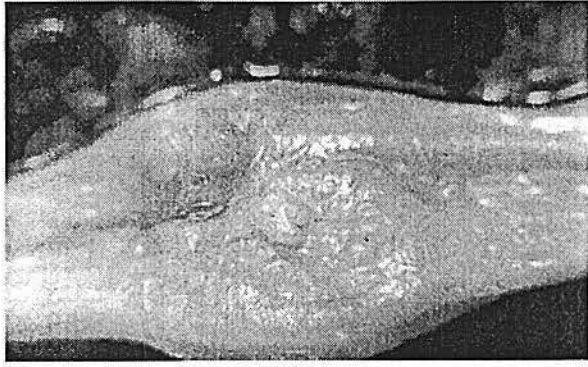


Fig. 2—Macrophotograph of an esophageal lesion in an animal from group 2. A vegetating infiltrative tumoral lesion surrounding the whole organ circumference can be observed. The lesion is outlined by the supravital staining.

Rubio⁴ in each experimental group was G1, 0; G2, 0.783; G3, 0.697; G4, 0.647 and G5, 0.741. No statistically significant difference was observed among the groups regarding the tumor index (Table 2).

Microscopic analysis showed no lesions present in G1. In the remaining four experimental groups, all animals presented some histologic alteration (Figs 3 and 4). Esophagitis was present in 6.1%(11) of the animals. The total incidence of low-grade dysplasia was 8.4% (15) and of high-grade dysplasia was 21.2% (38). The rate of invasive carcinoma was 64.2% (115). There was a statistically significant difference between the control and the experimental groups that received carcinogens in relation to the presence of tumor lesions ($p < 0.0001$). No statistically significant difference was observed among the groups that received carcinogens regarding the different types of lesions ($p = 0.73$).

The levels of the microscopic invasion in the subgroup in which there is an invasive carcinoma were 38.2% presenting mucosal invasion (mm1 or mm2); 37.3% presenting muscularis mucosae invasion; 15.6% presenting submucosal invasion (sm1 and sm2); and 8.6% presenting invasion of the muscularis propria. There was no significant difference among the groups for the different lesion types ($p < 0.05$) (Table 3).

DISCUSSION

Nitroso compounds have been studied since the 1930s. Several studies have demonstrated their hepatotoxicity due to hepatic insufficiency and necrosis in humans as well as in experimental animals.^{17,18} Harris et al¹⁹ have shown that nitrosamines induce DNA alkylation in human tissues in vitro. *N*-nitroso compounds are present in food and in the environment in doses far lower than those necessary to

Table 2. Gross findings

	Tumor number Median	Esophageal length Media	Average Rubio* index
p	0.71	>0.05	0.72
Group 1	0	3.55	0
Group 2	3.0	3.51	0.85
Group 3	2.0	3.58	0.55
Group 4	2.0	3.54	0.56
Group 5	3.0	3.71	0.80

*Number of tumors/esophageal length.

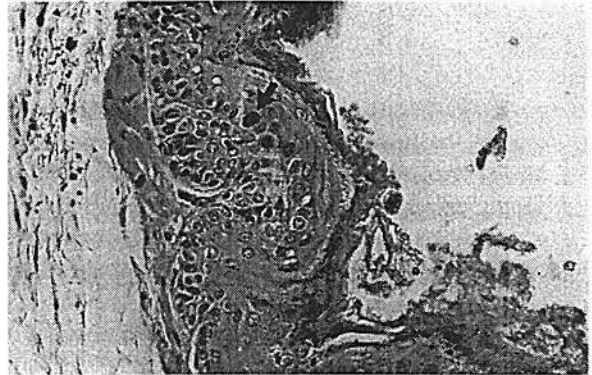


Fig. 3—Microphotograph of a low-grade dysplastic lesion in an animal from group 5. Dyskaryotic cells can be observed in the inferior third of the squamous epithelium (arrow). HE 125x.

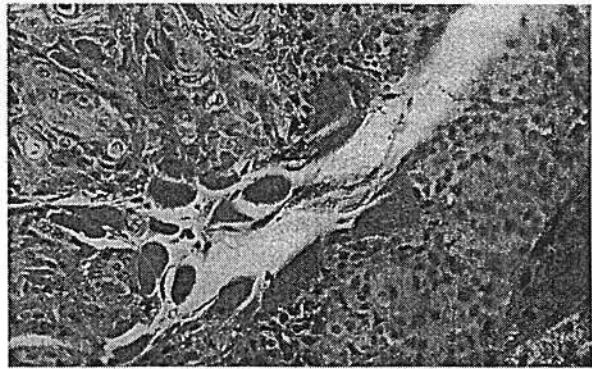


Fig. 4—Microphotograph of an invasive epidermoid carcinoma reaching the muscularis propria of the esophagus in an animal from group 4. HE 200x.

induce cancer development. There is some concern about chronic exposure to these compounds. Some reports, e.g. Ender et al,^{20,21} have referred to the presence of carcinogenic nitrates in fish and canned meat, mushrooms, cheese and milk. After the publication of these studies, the International Agency for Research on Cancer²² suggested that nitrosamines could be associated with cancer of the esophagus in humans.

The finding that nitrosamines have a well-defined organ tropism allowed the development of models for the study of cancer in several organs, including the

Table 3. Frequency of microscopic findings

	Group 1*	Group 2**	Group 3**	Group 4**	Group 5**
Normal	16	0	0	0	0
Esophagitis	0	2 (4.4%)	3 (7.0%)	3 (6.3%)	3 (7.0%)
Low-grade dysplasia	0	3 (6.7%)	6 (14.0%)	1 (2.1%)	5 (11.6%)
High-grade dysplasia	0	11 (24.4%)	9 (21.0%)	11 (23.0%)	7 (16.3%)
<i>Invasive carcinoma***</i>	0	29 (64.4%)	25 (58%)	33 (68.8%)	28 (65.1%)
Mucosa	0	11 (37.9%)	12 (48%)	12 (36.4%)	9 (32.1%)
Muscularis mucosae	0	13 (44.8%)	5 (20%)	14 (42.4%)	11 (39.3%)
Submucosa	0	3 (10.4%)	6 (24%)	6 (18.2%)	3 (10.7%)
Muscularis propria	0	2 (6.9%)	2 (8%)	1 (3%)	5 (17.9%)

*p < 0.0001(between G1 and others groups).

**p = 0.73 (NS between groups that ingested carcinogens).

***p > 0.05 (NS grade of invasion between groups that ingested carcinogens).

esophagus.^{3,4,23-25} Using diethylnitrosamine, esophageal cancer could be induced. The doses used in initial studies, e.g. those by Duckrey et al²⁶ and Baker,²³ resulted in high hepato- and nephrotoxicity. For this reason, subsequent studies, e.g. that by Rubio,³ used lower drug doses in order to reduce the mortality among experimental animals.

In the present study, we used mice, as described previously,^{2,5} that were exposed to DEN, resulting in high feasibility at low costs. An exposure period of 180 days was elected as being the average time necessary to induce an elevated number of lesions with acceptable levels of mortality.^{2,3,27} It is known that the first dysplastic lesions and some invasive carcinomas can be detected 120 days after the beginning of exposure to nitrosamine⁵. However, it is after about 180 days of treatment that the highest incidence of lesions can be observed. Longer periods of exposure show an elevated rate of mortality.

The dilution of the carcinogen used in this work was similar to that suggested by Rubio⁵ (40 mg/l). However, the weekly exposure period to the drug was increased by 24 h, which represented a 25% increase in the total carcinogen dose offered to the animals. Our initial hypothesis was that mortality would be higher than that reported by Rubio;⁵ nevertheless, we observed that, excluding 12 losses, there were only seven deaths out of the 196 animals. It is possible that these results reflect the fact that the drug was used in low enough doses and for a prolonged exposure period in order to avoid hepatotoxicity.

Tobacco-specific nitrosamines (NATE) are the only carcinogens related to tobacco that cause esophagus cancer in laboratory animals. Among the four NATE types that cause esophagus cancer, NNN is present in the highest concentration in cigarette smoke. It should, however, be pointed out that the experimental amounts of the drug used to induce esophageal tumors are much higher than those to which smokers are usually exposed.²⁸

In the study performed by HU et al¹⁶ in rats, the development of papillomas and squamous carcino-

mas of the esophagus was detected in 23 out of 24 experimental animals after treatment with 200 mg/l NNN liquid solution for a period of 36 weeks. Hoffmann et al²⁹ have reported an experimental model with the development of benign tumors after subcutaneous injections with NNN for a period of 20 weeks.

Castonguay et al³⁰ used two groups of rats to establish the effect of chronic ethanol intake in NNN carcinogenicity. The carcinogen was administered subcutaneously or v.o., and the alcohol was provided in their drinking water at a final concentration of 6%. Animals that received the alcoholic solution and NNN subcutaneously showed the highest incidence of lesions in the nasal cavity. However, the highest rates of esophagus lesions were among the animals that received NNN v.o. The authors discuss the possibility that enzymes responsible for nitrosamine activation, among them the p450 cytochrome, may have a higher activity in the nasal and esophageal mucosa. Furthermore, ethanol may play a role as an inducer of the activity of these enzymes, enhancing susceptibility to the effect of the carcinogen. In the present report, a 6% alcoholic solution was chosen, taking into account experimental models that have demonstrated that this dose is well tolerated by the animals but is able to influence the metabolism and carcinogenicity of the nitrosamines.

NNN was used at the dose of 30 mg/l, taking the weight of the mice into account. As the compound available in the market was a precursor (nornicotine), it had to be reacted with nitrogen dioxide to obtain NNN. We decided to provide this carcinogen v.o., because previous reports have shown a higher incidence of esophageal lesions when NNN is provided in this way.^{5,30-32}

When we analyzed the intake volume of the solutions, it was evident that the presence of NNN led to a dramatic decrease in the average fluid intake, representing about 50% of the amount of pure water usually consumed and about 40% of the volume of the alcohol and DEN solutions taken alone. The results observed in this study show that overall

mortality during the experimental period was very low. It was noted that the toxic effect of nitrosamines, as well as in the group that received DEN only and in the other two groups that received DEN and NNN could be controlled in low doses. This fact allowed us to obtain a strong carcinogenic effect and high survival, even when using 25% higher doses of DEN. The addition of NNN did not cause an increase in mortality.

Initial gross analysis of the material revealed that more than 90% of the animals exposed to one or more carcinogen presented tumor growth in the esophageal lumen. Previous authors^{2,5,23,24,33} have recorded far lower values in models using different species of rodents. Rubio³⁻⁷ reported 85% of tumor lesions in macroscopic analysis, which is similar to our results. However, when microscopic findings of this same study are analyzed, it can be noticed that 85% of these cases show squamous papilloma, which represent benign lesions. The remaining instances can be divided between high- and low-grade dysplasia and some invasive carcinomas. When comparing the different groups macroscopically, there is a statistically significant difference in relation to the number of lesions among the five groups. However, if carcinogen-treated groups are analyzed separately, there is no significant difference among them regarding both the number of lesions and the Rubio index.

Results from the microscopic analysis showed a high rate of squamous carcinomas, namely 64.2% for invasive carcinomas alone or 85.4% if cases of high-grade dysplasia were included. These results demonstrate that this is an exceptional model of esophageal carcinogenesis because it induces a high incidence of neoplasias with minimum mortality. If we perform a comparative analysis with the model developed by Rubio,⁴ one can notice that in that study the development of malignant lesions was about 15% and the development of papilloma was 85%, whereas in the present work 85% of the animals developed cancer. Considering that the group provided with DEN only showed an incidence of cancer of 88.9% and in the remaining groups it was between 85% and 90%, it is clear that DEN itself has such a strong inducing potential that the addition of promoters such as NNN and alcohol did not produce any significant increase in the incidence of esophageal cancer.

Using the experimental model proposed in the present report, it is possible to follow the development of epithelial lesions ranging from esophagitis to invasive carcinoma. The high cancer incidence (85.4%) opens the possibility for this model to be used for testing cytoprotector drugs such as vitamin C and garlic acid. Although the model is very potent for esophageal carcinogenesis, alcohol and NNN did not show a strong promoting effect for this condition, at least in the study here described.

References

1. Druckrey H. Carcinogene Wirkung von N-Methyl-N-Nitroso-Anilin. *Naturwissenschaften* 1961; 48: 722-723.
2. Clapp N K, Craig A W. Carcinogenic effects of diethylnitrosamine in RF mice. *J Natl Cancer Inst* 1967; 39: 903-916.
3. Rubio C A. Experimental models. In: Pfeiffer C J, ed. *Cancer of the esophagus*, Vol. III. USA: CRC Press, 1982: 139-168.
4. Rubio C A. Epithelial lesions antedating esophageal carcinoma. Histologic study in mice. *Pathol Res Pract* 1983; 176: 269-275.
5. Rubio C A, Liu F, Chejfec G, Sveander M. The induction of esophageal tumors in mice: dose and time dependency. *In Vivo* 1987; 1: 35-38.
6. Rubio C A. Post-carcinogen interval in carcinogenesis. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988; 24: 499-500.
7. Rubio C A, Liu F S, Zhao H Z. Histological classification of intraepithelial neoplasias and microinvasive squamous carcinoma of the esophagus. *Am J Surg Pathol* 1989; 13: 685-690.
8. Hoffmann D, Castonguay A, Rivenson A, Hecht S S. Comparative carcinogenicity and metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and N'-nitrosornicotine in Syrian golden hamsters. *Cancer Res* 1981; 41: 2386-2393.
9. Lechner J F, Babcock M S, Marnett M, Narayan K S, Kaighn M E. Normal human prostate epithelial cultures. In: Harris C C, Trump B F, Stoner G D, eds. *Methods and perspectives in cell biology*, Vol. 2. New York: Academic Press, 1980: 195-225.
10. Prolla J C, Dietz J, Costa L A. Rio Grande do Sul geographic differences in esophageal cancer mortality. *Rev Ass Med Brasil* 1993; 39 (4): 217-220.
11. Williams R R, Horm J W. Association of cancer sites with tobacco and alcohol consumption and socioeconomic status of patients: interview study from the Third National Cancer Survey. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58: 525-547.
12. De Stefani E, Muñoz N, Esteve J, Vassallo A, Victora C, Teuchmann S. Male drinking, alcohol, tobacco, and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Res* 1990; 50: 426-431.
13. Hecht S S, Chi-Hong B C, Ohmori T, Hoffmann D. Comparative carcinogenicity of the tobacco-specific nitrosamines, N'-Nitrosornicotine and 4-(N-Methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res* 1980; 40: 298-302.
14. Preston Martin S. Evaluation of the evidence that Tobacco-Specific Nitrosamines (TSNA) cause cancer in humans. *Cri Rev Toxicol* 1991; 21 (4): 295-298.
15. IARC. N'-Nitrosornicotine IARC Monograph 1987; 37: 241-261.
16. Hu M W, Bondinelli W E, Hoffmann D. Chemical studies on tobacco smoke. XXIII. Synthesis of carbon-14 labeled myosmine, nornicotine and N'-nitrosornicotine. *J Labelled Compd* 1974; 10: 79-88.
17. Freund H A. Clinical manifestations and studies in parenchymatous hepatitis. *Ann Intern Med* 1937; 10: 1144.
18. Fussaenger R D, Ditschuneit H. Lethal exitus of a patient with N-nitrosodimethylamine poisoning 2.5 years following the first ingestion and signs of intoxication. *Oncology* 1980; 37: 273.
19. Harris C C, Autrup H, Stoner G D, Trump B F, Hillman E, Schafer P W, Jeffrey A M. Metabolism of benzo [a] pyrene, N-nitrosodimethylamine and N-nitrosopyrrolidine and identification of the major carcinogen - DNA adducts formed in cultured human esophagus. *Cancer Res* 1979; 39: 4401.
20. Ender F, Harve G, Helgebostad A, Koppang N, Madsen R, Cheh L. Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herringmeal produced from sodium nitrite-preserved herring. *Naturwissenschaften* 1964; 51: 637.
21. Ender F, Harve G, Madsen R, Cheh L, Helgebostad A. Studies on conditions under which N-nitrosodimethylamine is formed in herring meal produced from nitrite-preserved herring. *Z Tierphysiol Tiernachv Futtermittelkd* 1967; 22: 181.
22. IARC. Evaluations of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some N-Nitroso Compounds. IARC Monograph 1978; 17: 1-365.
23. Baker J. Induction of tumors of the stomach and esophagus in inbred Chinese hamsters by anal diethylnitrosamine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974; 146: 291-298.

24. Reuber M D. Carcinoma of the esophagus in rats by diethylnitrosamine. *Eur J Cancer* 1975; 11: 97-99.
25. Reuber M D. Effect of age and sex on lesions of the esophagus in buffalo strain rats ingesting diethylnitrosamine. *Expl Cell Biol* 1976; 44: 65-72.
26. Duckrey H, Preussman R, Blum G, Ivankovic S, Afkham J. Erzeugung van Karzinamen der Speiserohre demch un-symmetrische Nitrosamine. *Naturwissenschaften* 1963; 50: 100.
27. Napalkov N P, Pozharisski K M. Morphogenesis of experimental tumors of the esophagus. *J Natl Cancer Inst* 1969; 42: 922-940.
28. Hecht S S, Hoffmann D. The relevance of tobacco-specific nitrosamines to human cancer. *Cancer Surv* 1989; 8: 273.
29. Hoffmann D, Rivenson A, Amin S, Hecht S S. Dose-response study of the carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines in F344 rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 1984; 108: 81-86.
30. Castonguay A, Rivenson A, Trushin N et al. Effects of chronic ethanol consumption on the metabolism and carcinogenicity of N'-nitrosornicotine in F344 rats. *Cancer Res* 1984; 44: 2285-2290.
31. Hecht S S, Young R, Masura Y. Comparative carcinogenicity in F344 rats and Syrian golden hamsters of N'-nitrosornicotine and N'-nitrosornicotine-1-N-oxide. *Cancer Lett.* 1983; 20: 333-340.
32. Hecht S S. Metabolic activation and detoxification of tobacco-specific nitrosamines - a model for cancer prevention strategies. *Drug-Metab-Rev.* 1994; 26: 373-390.
33. Mandard A M, Marnay J, Herlin P, Elie H, Tuyns A J, Le Talaer J Y. Cancer de l'oesophage induit chez le rat Wistar par l'éthyl-N-Butylnitrosamine. *Bull Cancer* 1984; 71: 419-424.

ANEXO A

Ração camundongos Germani

Composição básica: farelo de trigo, farelo de soja, farinha de ostras, farinha de ossos, milho moído (54%), farinha de carne, sal e caolin.

Níveis de garantia: umidade (máx.) 12,0%
proteína bruta..... (mín.) 20,5%
extrato etéreo..... (mín.) 4,0%
matéria fibrosa.....(máx.) 6,0%
matéria mineral.....(máx.) 9,7%
cálcio (Ca).....(mín.) 2,0%
fósforo (P).....(mín.) 0,6%

Enriquecimento por kg de ração: vitamina A (8.000 UI); vitamina D3 (1498,5 UI);
vitamina K (2 mg); vitamina E (5 UI); riboflavina
(3,3 mg); ác. pantotênico (10 mg); ác. nicotínico
(2mg); vitamina B6 (2 mg); vitamina B12 (10 mg);
colina (300 mg); antioxidante (100 mg); metionina
(0,7g); ferro (Fe) (20 mg); manganês (Mn) (81
mg); zinco (Zn) (48 mg); cobre (Cu) (2mg); cobalto
(Co) (0.2 mg); iodo (I) (2 mg); farinha de ostras
(1g); sal (5g); pigmentador (20mg); antibiótico (10
mg); coccidiostático (1 g).

ANEXO B

TABELAS DE VOLUMES INGERIDOS DURANTE AS 25 SEMANAS**Tabela B1 – Soluções (ml) ingeridas nos dias 1 – 3 (2º – 4º FEIRA)**

G1 – Água G2 – Água G3 – NNN G4 – Álcool G5 - NNN+Álcool

	1 07 DEZ	2 14 DEZ	3 21 DEZ	4 28 DEZ	5 04 JAN	6 15 JAN	7 22 JAN	8 29 JAN	9 05 FEV	10 12 FEV	11 19 FEV	12 26 FEV	13 04 MAR
G1	220	243	197	232	241	222	212	291	278	265	244	219	198
G2	225	251	140	214	257	227	236	285	273	277	256	227	205
G3	125	126	120	110	143	110	101	145	111	174	122	100	105
G4	193	190	189	108	252	230	223	235	206	237	244	191	186
G5	124	113	124	99	178	113	102	140	109	155	135	85	58

	14 11 MAR	15 18 MAR	16 25 MAR	17 01 ABR	18 08 ABR	19 15 ABR	20 22 ABR	21 29 ABR	22 05 MAI	23 12 MAI	24 19 MAI	25 26 MAI	26 02 JUN
G1	255	235	249	223	208	211	199	251	230	210	218	188	172
G2	275	268	243	200	203	223	211	248	222	205	210	167	159
G3	151	100	123	100	115	118	111	92	110	101	70	56	58
G4	246	269	223	203	206	205	239	194	187	175	171	157	141
G5	144	97	112	103	114	126	134	67	104	87	83	85	54

Tabela B2 – Soluções (ml) ingeridas nos dias 4 – 7 (5º FEIRA À DOMINGO)

G1 – Água G2 – G5 - DEN

	1 11 DEZ	2 18 DEZ	3 25 DEZ	4 01 JAN	5 08 JAN	6 15 JAN	7 18 JAN	8 25 JAN	9 01 FEV	10 08 FEV	11 15 FEV	12 22 FEV	13 29 FEV
G1	213	209	180	197	165	201	219	171	145	166	270	178	238
G2	227	221	194	173	150	197	225	159	135	154	256	152	216
G3	230	218	197	168	172	192	180	160	140	175	228	182	195
G4	224	216	190	167	181	218	173	156	144	182	244	151	205
G5	222	215	218	184	217	200	149	177	144	155	235	190	215

	14 07 MAR	15 14 MAR	16 21 MAR	17 28 MAR	18 04 ABR	19 11 ABR	20 18 ABR	21 25 ABR	22 02 MAI	23 09 MAI	24 16 MAI	25 23 MAI	26 30 MAI
G1	220	211	244	223	189	190	240	200	226	218	195	203	192
G2	217	205	232	195	174	194	210	221	209	202	172	184	168
G3	230	229	217	204	198	208	213	214	206	215	179	165	162
G4	203	240	220	179	175	204	217	203	200	185	184	192	165
G5	236	250	198	185	201	212	206	210	209	208	166	197	175

ANEXO CPROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO DE ACHADOS MACRO E MICROSCÓPICOS

N° ____/____/____/____

MACROSCOPIA

TAMANHO DO ESÔFAGO : _____ CM

NÚMERO DE TUMORES: _____

ÍNDICE DE RUBIO: _____

MICROSCOPIA:*TIPO DE TUMOR*

- ADENOCARCINOMA
- CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO
 - HIPERPLASIA
 - ESOFAGITE
 - PAPILOMA
 - DISPLASIA
 - CA INVASOR
- BAIXO GRAU
- ALTO GRAU
- MUCOSA
- MUSCULARIS MUCOSAE
- SUBMUCOSA
- MUSCULAR PRÓPRIA