

ELIANE DE MARCO FERREIRA KAMINSKI

**MODELO EXPERIMENTAL DE
CARCINOGENESE
GÁSTRICA EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS
À PILOROPLASTIA DE FINNEY**

PORTO ALEGRE

1999



ELIANE DE MARCO FERREIRA KAMINSKI

**MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOGENESE
GÁSTRICA EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS
À PILOROPLASTIA DE FINNEY**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
para obtenção do título de Mestre em Medicina:
Gastroenterologia

Orientador: Dr. Cleber Dario Pinto Kruel

PORTO ALEGRE

1999

MED
T
WI320 K15m 1999

05187511

[000273704] Kaminski, Eliane de Marco
Ferreira. Modelo experimental de carcinogênese
gástrica em ratos wistar submetidos à
piloroplastia de Finney. 1999. 103 f. : il.

K15m Kaminski, Eliane de Marco Ferreira

Modelo experimental de carcinogênese gástrica
em ratos Wistar submetidos à piloroplastia de Finney
/ Eliane de Marco Ferreira Kaminski ; orient. Cleber
Dario Pinto KrueI. – Porto Alegre, 1999.
103 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do
Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de
Pós-Graduação em Medicina : Gastroenterologia.

1. Piloroplastia de Finney. 2. Neoplasias gástricas.
3. Ratos Wistar. 4. Neoplasias experimentais. I.
Kruel, Cleber Dario Pinto. II. Título.

NLM: WI 320

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Dedico esta dissertação :

*- aos meus pais, **Tito e Ivaema**, por terem sido sempre pais amorosos e os melhores exemplos de vida e porque a memória que trago deles é muito grata, forte e feliz, apesar de já não os ter comigo;*

*- aos meus irmãos, **Cleusa, Tito César** (in memoriam) e **Irene**, porque sempre foram maravilhosos espelhos para a irmã caçula;*

*- ao **Ney**, meu esposo, pelo carinho, paciência e por assumir, muitas vezes, o papel de pai e mãe dos nossos filhos;*

*- ao **Vitor**, ao **Luciano** e ao **Rodrigo**, meus filhos, sentido da vida e motivos essenciais para querer sempre crescer, melhorar e ser feliz.*

AGRADECIMENTOS

A realização desta pesquisa envolveu a participação de muitas pessoas. Para algumas, gostaria de expressar meu agradecimento especial :

Ao Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Krueel, pela orientação, estímulo à realização desta pesquisa e serenidade transmitida nos momentos de grandes questionamentos.

Ao meu irmão Tito César de Marco Ferreira, que me apresentou ao computador e ajudou na digitação e formatação do embrião desse projeto.

À colega Dra. Lúcia Maria Kliemann, pela análise histológica, realização de fotos de microscopia, pelo apoio e colaboração.

Ao Dr. Ricardo Moacir Silva, pelo auxílio na realização do experimento.

Ao colega Dr. Levi Lorenzo Melo, que, como pioneiro na realização de estudo experimental na FEPPS , me deu valiosas indicações para realização do experimento e apronto final do trabalho.

Às Dra. Luisa Maria Gomes de Macedo Braga e Dra. Mara de Souza Motta, médicas veterinárias da FEPPS, pelo apoio na realização do experimento.

Ao Sr. Carlos Alberto Araújo, representando os funcionários da FEPPS, responsável pelo cuidado com os ratos, no biotério.

À Dra. Maria Izabel Edelweiss, que, com muita prestimosidade, ofereceu sua sala, onde pude realizar a análise macroscópica dos espécimes e preparo do material para inclusão na parafina.

À Sra. Elhane Gomes e Sr. Jorge Alberto Lopes, funcionários dos Serviço de Patologia do HCPA, responsáveis pelo corte e coloração de lâminas para análise histológica.

À Prof. Dra. Norma Marroni, que orientou a análise do pH, no Laboratório de Fisiologia Digestiva do Instituto de Biociências.

Ao Bioquímico Jarbas de Oliveira, que realizou as dosagens da concentração de ácidos biliares, no Laboratório de Pesquisa do HCPA.

Ao Analista de Sistemas Roberto Karst Kaminski, meu cunhado, que desde o início ajudou colocando os programas necessários no computador, e proporcionou, na reta final, condições ideais para a conclusão do trabalho.

Ao Dr. Cláudio Tarta, pela simpatia e gentileza de algumas indicações bibliográficas.

A Vânia Naomi do Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do HCPA, pela análise estatística.

À Dra. Lúcia Pellanda Zimmer, pelo auxílio na interpretação e apresentação dos resultados.

À Bibliotecária Regina Otília F. Maciel de Marco Ferreira, minha cunhada, pelo auxílio na organização das referências bibliográficas.

À Professora Helena Maria Totta da Silveira, pela revisão do texto.

Ao Dr. Jaques Vissocky, pelo auxílio com a versão para o inglês.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) HCPA, pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 EPIDEMIOLOGIA	1
1.2 FATORES DE RISCO	4
1.2.1 Dieta	4
1.2.2 Gastrite.....	6
1.2.3 <i>Helicobacter pylori</i>	7
1.2.4 Estômago operado	8
1.2.5 Outros	9
1.3 REFLUXO DUODENO-GÁSTRICO	10
1.4 BIOLOGIA MOLECULAR NO CÂNCER GÁSTRICO.....	13
1.5 CARCINOGENESE GÁSTRICA EXPERIMENTAL	18
2 OBJETIVOS	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23

3.1 ANIMAIS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO.....	23
3.2 ALIMENTAÇÃO E ÁGUA	25
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
3.4 CIRURGIA	28
3.4.1 Laparotomia	28
3.4.2 Píloroplastia	28
3.5 SACRIFÍCIO.....	32
3.6 NECRÓPSIA	32
3.7 COLETA DE AMOSTRAS DO SUCO GÁSTRICO.....	33
3.8 ANÁLISE DO PH	33
3.9 DOSAGEM DOS ÁCIDOS BILIARES	33
3.10 MACROSCOPIA	34
3.11 HISTOLOGIA	34
3.12 ANÁLISE HISTOLÓGICA	36
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4 RESULTADOS.....	40
4.1 DESENVOLVIMENTO DO EXPERIMENTO	40
4.2 ACHADOS HISTOLÓGICOS	42
4.3 CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS BILIARES E pH	59
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÕES	73
7 PERSPECTIVAS	74
ANEXO A	75
ANEXO B	76

ANEXO C	77
ANEXO D	78
ANEXO E	79
ANEXO F	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
BIBLIOGRAFIA	
ABSTRACT	

LISTA DE ABREVIATURAS

EUA : Estados Unidos da América

RDG : Refluxo Duodeno-gástrico

DNA : Ácido desoxirribonucleico

VEGF : Vascular endothelial growth factor

MNNG : N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidina

DPEA : Divisão de Produção e Experimentação Animal

FEPPS : Fundação Estadual de Proteção e Pesquisa em Saúde

DMAE : Departamento Municipal de Água e Esgotos

NaNO₂ : Nitrito de sódio

UFRGS : Universidade Federal do Rio Grande do Sul

HCPA : Hospital de Clínicas de Porto Alegre

AEQ : Amplitude entre quartis

BI : Billroth I

BII : Billroth II

HE: Hematoxilina e eosina

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Hipótese de CORREA para carcinogênese gástrica **Página 17**
- FIGURA 2 – Disposição das caixas plásticas no Biotério do DPEA da FEPPS
Página 24
- FIGURA 3 – Diagrama seqüencial evolutivo do experimento, em semanas
Página 27
- FIGURA 4 – Desenho da piloroplastia realizada nos grupos III e IV **Página 30**
- FIGURA 5 – Fotografias seqüenciais da piloroplastia realizada nos grupos III e IV. **A:** duodeno e antro pré-pilórico, indicados pelas setas e sutura seroserosa entre eles, indicada pela seta maior; **B:** incisão em “U” invertido, no estômago, duodeno e através do piloro; **C:** sutura total entre estômago e duodeno, iniciando na extremidade da sutura seroserosa, vindo para baixo e retornando para cima, unindo o bordo direito do duodeno com o bordo esquerdo da parede gástrica; **D:** Aspecto final da cirurgia. **Página 31**
- FIGURA 6 – Terminologia anatômica utilizada: rato 9, grupo III **Página 35**
- FIGURA 7 – Gráfico da variação de peso dos ratos durante o experimento
Página 41
- FIGURA 8 – Macroscopia : úlcera de esôfago, rato 2, grupo III **Página 46**

- FIGURA 9 – Tumor obstrutivo de estômago, rato 2, grupo III **Página 47**
- FIGURA 10 – **A:** macroscopia estômago normal (estágio 1) e **B:** microscopia(HE-50x) estômago normal, epitélio foveolar, rato 72, grupo II **Página 48**
- FIGURA 11 – **A:** (HE-50x) e **B:** (HE-100x): papiloma pré-estômago, proliferação de células escamosas, crescimento exofítico e queratinização, rato 58, grupo II **Página 49**
- FIGURA 12 – Macroscopia adenocarcinoma (estágio 6), **A:** rato 8, grupo III; **B:** rato 61, grupo IV **Página 50**
- FIGURA 13 – **A**(HE-100x) e **B**(HE-400x)Adenocarcinoma bem diferenciado (estágio 6), estrutura glandular definida com atipias, hipercromasia e pseudoestratificação nuclear, rato 1, grupo III **Página 51**
- FIGURA 14 – Gráfico da incidência de adenocarcinoma nos diferentes grupos **Página 52**
- FIGURA 15 – Macroscopia úlcera de duodeno (estágio 2), rato 77, grupo IV **Página 53**
- FIGURA 16 – Macroscopia granuloma de corpo estranho (estágio 3), rato 74, grupo IV **Página 54**

FIGURA 17 – **A**(HE-100x) e **B**:(HE-400x) Implantação mucosa e granuloma de corpo estranho (estágio 3), glândulas dentro da muscular com padrão de fibrose concêntrica (seta maior) e granuloma (seta menor), rato 74, grupo IV **Página 55**

FIGURA 18 – **A**: (HE-25x) e **B**:(HE-50x) Adenoma (estágio 4), lesão polipóide com proliferação glandular e padrão de organização estrutural bem preservado, com poucas atipias celulares e sem invasão de tecidos, rato 64, grupo IV

Página 56

FIGURA 19 – **A**:(HE-100x) e **B**:(HE-400x) Displasia de alto grau (estágio 5), proliferação glandular sem invasão de submucosa e com marcadas atipias celulares. Setas indicando núcleos mitóticos, rato 77, grupo IV **Página 57**

FIGURA 20 – **A**:(HE-50x) e **B**:(HE-100x) Adenocarcinoma moderadamente diferenciado(estágio 6): glândulas com padrão arquitetônico pouco organizado com atipias celulares como hipercromasia nuclear, pseudoestratificação nuclear, e invasão de submucosa, rato 78, grupo IV **Página 58**

FIGURA 21 – Gráfico de *BOX-PLOT*, comparando pH, nos diferentes grupos **Página 60**

FIGURA 22 – Gráfico de *BOX-PLOT*, comparando concentração de ácidos biliares, nos diferentes grupos **Página 61**

FIGURA 23 – Gráfico de *BOX-PLOT*, comparando concentração de ácidos biliares nos ratos com e sem tumores obstrutivos, nos diferentes grupos **Página 62**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Macroscopia nos diferentes grupos **Página 44**

TABELA 2 – Achados histológicos no estômago nos diferentes grupos, por

Estágios **Página 45**

RESUMO

O Refluxo duodeno-gástrico tem sido implicado como potencial carcinógeno para o estômago e esôfago e é um dos fatores que podem explicar o desenvolvimento de câncer no coto gástrico. Modelos experimentais de carcinogênese no estômago ressecado ou nas gastrojejunoanastomoses estão bem definidos. Os objetivos deste estudo foram desenvolver um modelo experimental de carcinogênese gástrica através de piloroplastia de Finney, avaliar a influência da ingesta de nitrito de sódio nesse modelo e analisar as concentrações de ácidos biliares e o valor do pH gástrico. Foram operados 110 ratos *Wistar* divididos em quatro grupos: grupo I (15 ratos) submetidos à laparotomia (*Sham's operation*); grupo II (15 ratos) submetidos à laparotomia (*Sham's operation*) e à ingesta de nitrito de sódio na água de beber; grupo III (40 ratos) submetidos à piloroplastia de Finney; grupo IV (40 ratos) submetidos à piloroplastia de Finney e à ingesta de nitrito de sódio na água de beber. Após 50 semanas da cirurgia, os ratos foram sacrificados, coletadas amostras de suco gástrico para análise do pH, dosagem dos ácidos biliares, e realizada análise histológica. A mortalidade pós-operatória imediata foi de 9% e, ao longo do experimento, 10 ratos morreram. O grupo controle (I) (14 ratos) não apresentou lesões gástricas; o grupo controle com nitrito de sódio (II) desenvolveu papilomas no pré-estômago em 16,6%(2/12) dos ratos; os grupos operados com piloroplastia apresentaram adenomas em 10,3%(3/29) dos ratos no grupo III e 14,2%(5/35) dos ratos no grupo IV, e adenocarcinoma em 55,1%(16/29) dos ratos, no grupo III e 14,2%(5/35) dos ratos,

no grupo IV. A implantação de glândulas para dentro da submucosa e muscular, na zona de anastomose (implantação mucosa), não foi critério suficiente para decidir sobre a malignidade das lesões, sendo necessária a presença simultânea de atipias celulares. A concentração de ácidos biliares do suco gástrico foi maior nos grupos III e IV. A medida do pH gástrico não foi diferente nos grupos estudados. Conclui-se que: 1) a piloroplastia de Finney é um modelo experimental adequado de carcinogênese gástrica; 2) esta cirurgia induziu refluxo duodenogástrico; 3) o refluxo duodenogástrico atuou como carcinógeno para o estômago dos ratos; 4) não houve relação entre o pH gástrico e o desenvolvimento de carcinoma; 5) o nitrito de sódio não atuou como carcinógeno para o estômago dos ratos.

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer gástrico é um dos problemas mais importantes de saúde pública em todo o mundo, sendo o segundo câncer mais comum, atrás apenas do câncer de pulmão, com 755000 novos casos estimados por ano (PARKIN et al.,1992). É uma doença com alta taxa de mortalidade, com uma sobrevida em cinco anos, em geral menor do que 20%. Poucas neoplasias mostram uma variação tão grande, na incidência, como o câncer de estômago; mesmo em um só país os seus índices podem variar significativamente (NEUGUT, HAYEK, HOWE,1996). No período 1981-86, existia uma diferença maior do que seis vezes na mortalidade, indo de 39.2 por 100000 homens no Japão, a 5.7 por 100000 nos Estados Unidos da América (FORMAN,1991).

Os países com maior incidência incluem o Japão, a maior parte da América Central e América do Sul, e outros países do sudeste asiático, com baixos índices nos EUA, Canadá e países de origem Britânica e com índices intermediários na maioria dos países da Europa (PARKIN et al.,1992). Na América do Sul, os países com maior incidência são o Chile e a Colômbia (COLEMAN et al.,1993). No Brasil, dados do Ministério da Saúde revelam que o câncer de estômago tem a segunda maior taxa bruta de mortalidade nos homens, atrás do câncer de pulmão,

e a terceira nas mulheres, atrás do câncer de mama e de colo de útero (BRASIL, 1999). Em 1997 ocorreram 10643 óbitos por neoplasia maligna de estômago no nosso País (BRASIL).

Uma das razões do grande interesse dos epidemiologistas pelo câncer gástrico é a mudança na incidência ocorrida nos últimos sessenta anos. Em 1930, esta patologia era a primeira causa de morte por câncer nos EUA e hoje é a oitava (MENK et al., 1995). Em 1950, a neoplasia maligna de estômago era a causa mais comum de morte por câncer na velhice (65-84 anos) em ambos os sexos. Nos países do norte e oeste da Europa, uma queda na incidência, da ordem de 50 à 70%, foi observada, primeiro, nas mulheres e, por volta de 1960, também nos homens. Nos países do sul e leste Europeu, essa queda iniciou entre 1960 e 1970; substancial declínio em ambos os sexos também foi observado na Austrália e Nova Zelândia e, no final dos anos sessenta e meados de 1970, no Japão e América do Sul (LEVI et al., 1996).

Segundo a Sociedade Americana do Câncer e o Colégio Americano de Cirurgiões, a incidência e mortalidade do câncer gástrico se mantém em um platô desde a década de oitenta (MENCK et al., 1995). COLEMAN et al. (1993) relatam que existe uma desaceleração no ritmo do declínio na incidência de câncer gástrico em todo mundo. LOCKE et al. (1995) estudando a incidência de adenocarcinoma gástrico em residentes de Olmsted County, Minnesota (EUA) no período de 1941-1990 observaram que a diminuição da mesma ocorreu quase que exclusivamente devido à diminuição de incidência dos tumores localizados no estômago distal. Apesar disto, os cânceres de estômago distal apresentaram

incidência igual ao adenocarcinoma de estômago proximal (cardia, junção esofagogástrica e fundo), em torno de 5 casos /100000 pessoas ano.

Os fatores responsáveis por essas grandes diferenças e importantes alterações na epidemiologia do câncer gástrico, no último século, não estão esclarecidos, mas dados relacionados com a dieta podem ter um papel importante. A mudança na distribuição anatômica dos subtipos pode refletir a existência de fatores de risco ainda não definidos (NEUGUT,HAYEK,HOWE,1996). O declínio “espontâneo” na incidência do adenocarcinoma gástrico, observado em vários países, pode ser estendido para populações de alto risco, aplicando-se estratégias de prevenção primária e secundária, baseadas no progresso feito ao elucidarmos a carcinogênese gástrica (CORREA, 1992).

O carcinoma gástrico é caracterizado por dois padrões histopatológicos que diferem drasticamente, nas características fenotípicas, dos estágios precursores. O padrão mais comum em populações de alto risco é o tipo intestinal, no qual as células malignas são unidas umas as outras, formando estruturas glandulares que lembram as glândulas do trato gastrointestinal. A maioria dos fatores etiológicos são de natureza ambiental relacionados à dieta e/ou infecções. O tipo intestinal é precedido por uma longa cadeia de alterações identificáveis: gastrite crônica, atrofia, metaplasia intestinal, displasia, carcinoma “in situ” e adenocarcinoma. Em populações de baixo risco, o segundo tipo histológico, chamado difuso, é relativamente mais freqüente. Neste tipo as células neoplásicas são independentes umas das outras e invadem o estômago sem formar nenhuma estrutura bem definida. Nenhuma lesão pré-maligna foi identificada, ainda, neste tipo e os fatores

ambientais parecem ser menos importantes do que as influências genéticas (LAUREN, 1965; CORREA & SHIAO, 1994).

1.2 FATORES DE RISCO

1.2.1 DIETA

Uma hipótese que tem recebido considerável atenção é a de que compostos *N*-nitrosos estejam envolvidos na carcinogênese gástrica (CORREA et al.,1975; MIRVISH,1983). Esta hipótese é sustentada por estudos experimentais em animais e estudos epidemiológicos, nos quais foram encontradas associações positivas com o consumo de alimentos preservados, defumados, curados e salgados (KONO & HIROHATA,1996) e associações negativas com dietas ricas em frutas e vegetais frescos que são ricos em carotenóides e antioxidantes como vitamina C (KAAKS et al.,1998). Em estudo experimental já foi demonstrado que o ascorbato inibe a formação de compostos nitrosos, diminuindo a indução de tumores (MIRVISH et al.,1972), e em estudo epidemiológico, que a dieta rica em ascorbato reduz o risco de câncer gástrico (LA VECCHIA et al.,1994). A formação endógena de compostos *N*-nitrosos pode ocorrer no estômago quando ambos, uma amina ou amida e um agente nitrosante, como o nitrito, nitrato ou óxidos de nitrogênio, estejam presentes e é bloqueada pelos agentes antioxidantes (BARSTCH et al., 1989). O nitrito presente no estômago pode se originar da dieta (20%), a partir da redução de nitratos pelas bactérias da cavidade oral e bactérias presentes no estômago (80%). O suco gástrico contém muitos compostos de nitrogênio

derivados dos alimentos, aminas primárias, secundárias ou terciárias, ácidos biliares, guanidinas, uréias, que podem ser potenciais formadores de compostos nitrosados (KYRTOPOULOS,1989).

A formação endógena de compostos nitrosos também pode ocorrer em sítios de infecção e inflamação, através de bactérias, macrófagos ativados e outros tipos de células mediada pela enzima sintetase do óxido nítrico (BARTSCH & FRANK,1996). A super produção de óxido nítrico em tecidos com inflamação crônica leva à geração de peroxinítrito, um agente de lesão oxidativa no DNA (OHSHIMA & BARTSCH, 1994) e o próprio óxido nítrico é mutagênico *in vitro* para células humanas (NGUYEN et al.,1992).

Estudos epidemiológicos, avaliando a exposição ao nitrato ou nitrito (via alimento, água de beber ou ocupacional) e câncer gástrico, têm produzido resultados inconsistentes e controversos (ZATONSKI et al.,1989; KNIGHT et al.,1990; BOTTERWECK et al.,1998). Isto parece ocorrer porque muitos fatores podem modificar a nitrosação intragástrica e, também, porque os vegetais são uma fonte importante de nitratos e, ao mesmo tempo, de micronutrientes que inibem a nitrosação, o que torna difícil detectar nesses estudos qualquer efeito causado pela exposição aos nitratos e nitritos.

Estudos clínicos em pacientes com risco elevado de câncer gástrico têm encontrado dados que sustentam a hipótese da nitrosação endógena: CAYGILL et al. (1987) ao medir o pH, a concentração de bactérias redutoras de nitratos, nitratos e nitritos no suco gástrico em pacientes com o estômago operado, com anemia perniciosa e controles, encontraram resultados que confirmam a hipótese de que

metabólitos dos nitritos, provavelmente compostos nitrosados, estão relacionados ao risco excessivo de câncer nos pacientes com acidez gástrica diminuída. GUADAGNI et al. (1996) encontraram níveis elevados de nitritos, compostos *N*-nitrosos no suco gástrico de pacientes gastrectomizados e pacientes com câncer gástrico. MELICHAR et al.(1995) observaram uma concentração elevada de nitritos no suco gástrico de pacientes *H.pylori* positivos. GUADAGNI et al. (1999), estudando a histologia, a infecção pelo *H. pylori* e o suco gástrico, encontraram os mais altos e significativos índices de compostos *N*-nitrosos nos pacientes com histologia mais severa e com infecção por *H.pylori*.

Vários estudos relatam uma associação entre o consumo de alimentos salgados e o carcinoma de estômago e isto tem sido atribuído ao excesso de sal (cloreto de sódio) (KONO & HIROHATA,1996). Estudos experimentais demonstraram que a dieta rica em sal tem efeito promotor na carcinogênese do estômago glandular de ratos (TAKAHASHI et al., 1983).

1.2.2 GASTRITE

A gastrite crônica atrófica está correlacionada com o risco elevado de lesões pré-malignas e adenocarcinoma gástrico. A metaplasia intestinal aumenta o risco de câncer gástrico proporcionalmente ao tamanho da área de mucosa com metaplasia (LECHAGO & CORREA, 1993; FENOGLIO-PREISER et al.,1996; NEUGUT,HAYEK,HOWE, 1996). PIGNATELLI et al.(1998), utilizando métodos histoquímicos, analisaram a atividade da enzima sintetase do óxido nítrico e a consideraram como um marcador do “stress oxidativo”, o qual parece ter um papel importante na carcinogênese gástrica, nos casos de gastrite severa e displasias.

1.2.3 *Helicobacter pylori*

O *H.Pylori* é um carcinógeno da classe I para humanos, reconhecido pela Organização Mundial da Saúde em 1994 (IARC, 1994; SASAKO et al.,1998). Aproximadamente 60% das cepas desta bactéria possuem o *cagA*, um gene que codifica uma família de proteínas de alto peso molecular (120-140kD). A infecção com *H.pylori cagA* positivo é associada a uma maior inflamação da mucosa, com conseqüente atrofia e diminuição da acidez gástrica (KUIPERS & MEUWISSEN,1996; RICHTER,FALK, VAEZI, 1998). A infecção com *H. pylori* causa proliferação celular, gastrite atrófica, diminuição da concentração de vitamina C luminal, aumenta a geração de metabólitos de oxigênio e induz à hipocloridria . Todos esses fatores podem potencializar a carcinogênese, mas a associação direta da infecção pelo *H. pylori* com mutações do DNA não foi comprovada (SASAKO et al.,1998). Em estudo experimental com *mongolian gerbil*, utilizando o carcinógeno N-Methyl-N'-nitro-Nitrosoguanidina (MNNG), 17% dos animais desenvolveram câncer em um ano e nos animais infectados pelo *H.pylori* este índice subiu para 67%, sugerindo que o papel da bactéria não seja o de iniciador da carcinogênese e, sim, o de promotor (TOKIEDA et al.,1999).

Algumas populações com alta prevalência de infecção pelo *H.pylori* na infância apresentam, contraditoriamente, baixa incidência de carcinoma gástrico (WYATT et al.,1987; MUÑOZ et al.,1992). Pode-se pensar que essas populações apresentem incidência aumentada de câncer no futuro ou que esta infecção seja inócua, na ausência de algum cofator. Segundo STALTE &MEINING (1998)

somente uma parte das pessoas infectadas pelo *H. pylori* desenvolverão câncer e deve ser objetivo de pesquisas futuras descobrir aqueles indivíduos que o farão e que fatores contribuem para isso. NYREN (1998) relata que a associação entre a infecção pelo *H.pylori* e o câncer gástrico depende da cepa envolvida e da possível ação de cofatores presentes no hospedeiro ou no micro ambiente gástrico.

1.2.4 ESTÔMAGO OPERADO

Em 1922, BALFOUR descreveu, pela primeira vez, um adenocarcinoma de coto gástrico, após cirurgia por doença péptica. Outros autores têm descrito este câncer (KOBAYASHI, PROLLA, KIRSNER, 1970; KOBAYASI et al.,1995), que é definido como o carcinoma que ocorre no estômago remanescente, após a ressecção gástrica ter sido realizada por doença benigna. Uma latência mínima de cinco anos, após a cirurgia, é exigida para evitar erro de diagnóstico. Usando essa definição, a prevalência do carcinoma de coto gástrico, segundo a literatura, varia entre 0.8-8.9% dos pacientes submetidos a ressecções gástricas (SAFATLE-RIBEIRO et al.,1996). Duas meta-análises mostram um risco significativo de câncer gástrico, após gastrectomia com reconstrução a Billroth I ou Billroth II que, se torna aparente 15 anos após a cirurgia. Embora o risco seja o mesmo para os diferentes tipos de gastrectomias, ele se torna substancialmente elevado quando também é realizada a vagotomia (STALNIKOWICZ & BENBASSAT, 1990; TERSMETTE et al.,1990). Numerosos fatores podem explicar o desenvolvimento de gastrite e câncer no estômago remanescente, a saber: a exposição da mucosa gástrica ao refluxo de bile e secreções pancreaticoduodenais, a acloridria ou hipocloridria, a população bacteriana atípica, ação de compostos *N*-nitrosos, dieta

alimentar e a junção de dois tipos diferentes de epitélio na linha de sutura (ANDREOLLO,1994).

1.2.5 OUTROS

Embora outros fatores de risco para o câncer gástrico tenham sido identificados, entre eles: radiação, história familiar, anemia perniciosa, grupo sanguíneo A, polipose adenomatosa de estômago, exposição ocupacional ao asbesto e infecção pelo vírus Epstein-Barr, sua ocorrência é baixa e o risco atribuído também é baixo (NEUGUT, HAYEK, HOWE,1996).

1.3 REFLUXO DUODENO-GÁSTRICO

O refluxo duodeno-gástrico (RDG) tem sido descrito como causa da síndrome clínica chamada gastrite de refluxo ou gastrite alcalina (RITCHIE,1980). A maior causa de RDG é a cirurgia gástrica prévia, onde tenha ocorrido remoção ou dano ao esfíncter pilórico; está bem estabelecido que, nessas intervenções cirúrgicas, o excesso de refluxo duodenal bílio-pancreático pode lesar a mucosa gástrica (BERGER et al.,1999; KLINGER,1999). O RDG é, sob certo aspecto, um evento fisiológico normal no período pós-prandial ou de jejum prolongado e, portanto, sua patogenicidade depende do ritmo, volume e duração da exposição gástrica ao seu conteúdo.

A gastrite de refluxo em estômago não operado tem sido descrita (WARSHAN,1979; GOWEN,1985). LADAS et al.(1996), estudando o refluxo duodeno-gástrico em pacientes com úlcera duodenal, esofagite e gastrite e sem cirurgia prévia, encontraram relação entre o RDG e a infecção pelo *H. pylori*, sugerindo que ambos podem agir sinergicamente, agredindo a mucosa gástrica e causando gastrite. A entidade RDG sem cirurgia prévia é chamada de RDG primário, apresenta quadro clínico com ausência de cirurgia prévia, sintomas como dor epigástrica, náuseas e vômitos biliosos, evidência de gastrite na endoscopia, presença de bile na endoscopia e, pelo menos, dois dos seguintes critérios : escore histológico alcalino elevado, hiperplasia folicular de moderada a severa, evidência

de RDG na cintigrafia hepatobiliar, evidência de refluxo na pHmetria (WILSON et al.,1993).

O tratamento clínico, nestes casos, tem sido usado, porém, com pouco sucesso. Para pacientes em que o tratamento clínico, após vários meses, não foi eficaz ou que apresentam complicações, tem sido proposta uma cirurgia de diversão do fluxo biliar, a duodenojejunostomia supra-papilar também chamada “*duodenal switch*” (DeMEESTER,1987; BONAVINA et al.,1999). Existem algumas evidências de que o refluxo duodeno-gástrico excessivo pode promover a carcinogênese :

a- Estudos epidemiológicos, aqui já referidos, mostram que pacientes gastrectomizados por patologias benignas têm risco aumentado de desenvolver adenocarcinoma de coto gástrico (STALNIKOWICZ & BENBASSAT, 1990; TERSMETTE et al.,1990).

b- Existe uma associação positiva entre a concentração de ácidos biliares no suco gástrico e alterações pré-malignas da mucosa, a saber : gastrite atrófica, metaplasia intestinal e displasia (WATT, SLOAN, KENNEDY, 1984; HOUGHTON et al.,1986; SOBALA et al., 1993).

c- Pacientes com carcinoma gástrico apresentam prevalência aumentada de refluxo biliar (THOMAS et al.,1984; ANDREICA et al.,1987; YASUI et al.,1993).

d- Os ácidos biliares e as enzimas pancreáticas podem , através da quebra da barreira mucosa, expor o epitélio proliferativo a carcinógenos endoluminais (MIWA, HATTORI,MIYAZAKI,1995; GIRELLI et al.,1996) e os ácidos biliares solúveis podem entrar nas células da mucosa, quando estão em forma

e- O refluxo de conteúdo duodenal para o estômago e para o esôfago tem sido implicado no desenvolvimento de gastrite, úlceras gástricas, esofagite erosiva, metaplasia de Barret, displasia e adenocarcinoma de esôfago (MARSHALL, ANGGIANSAH, OWEN, 1997).

f- Estudos experimentais, em ratos, mostram que a derivação biliar em Y de Roux protege a mucosa do coto gástrico das lesões proliferativas induzidas pelo refluxo biliopancreático (KOBAYASI et al., 1991; 1993, 1996).

g- Estudos experimentais., em ratos, mostram que o refluxo duodeno-gástrico produz adenocarcinoma no estômago glandular, carcinoma epidermóide no pré-estômago, e promove o aparecimento de esôfago de Barret, adenocarcinoma de esôfago e carcinoma epidermóide de esôfago (HASEGAWA, 1991; TAYLOR et al., 1991; MIWA et al., 1994; KONDO et al., 1995; MELO, 1997; FEIN et al., 1998; WETSCHER et al., 1999).

1.4 BIOLOGIA MOLECULAR NO CÂNCER GÁSTRICO

Existem muitas evidências de que alterações genéticas são de grande relevância na patogênese dos tumores gástricos. A existência de fatores hereditários parece estar confirmada pela predisposição familiar ao desenvolvimento de neoplasias gástricas relatada na literatura (SHINMURA et al.,1999).

Os achados relacionados a alterações genéticas no câncer gástrico são confusos. Não existe nenhuma definição clara que indique quais anomalias são patognomônicas de carcinoma gástrico e em quais estágios do processo carcinogênico elas aparecem. As alterações genéticas ocorrem nos oncogenes, genes supressores do tumor, reguladores do ciclo celular e genes reparadores do DNA. Segundo TAHARA (1993,1998), a amplificação e transcrição anormal do gene *c-met*, ativação do gene *p53* e transcrição anormal do CD44 são comuns no adenocarcinoma pouco diferenciado (tipo difuso) e bem diferenciado (tipo intestinal). Entretanto, o padrão de múltiplas alterações genéticas difere nos dois tipos histológicos, embasando a hipótese de que eles têm diferentes vias patogênicas.

Os genes *ras*, que incluem o *Ha-ras*, *K-ras* e o *N-ras*, têm um papel importante na transdução, proliferação e diferenciação celular. Os estudos relatam diferenças substanciais na frequência e tipo de alterações nesses genes, mas parece existir um consenso de que mutações no *K-ras* estão associadas à metaplasia intestinal (CORREA & SHIAO,1994).

A inativação de genes supressores de tumores ocorre através da perda da heterozigocidade e mutações no gene *p53*. A perda de um alelo ocorre com mais frequência nos cromossomos 5q,7q,13q,17p e 18q, nas séries de câncer gástrico estudadas (MALTONI et al.,1998). A mutação no gene *p53* representa um dos mais importantes eventos genéticos que ocorrem no carcinoma gástrico. Em uma série comparativa entre carcinomas gástricos e carcinomas de estômago operado, a maioria das mutações encontradas envolveu transições G:C - A:T e foram encontradas tanto no tumor quanto em áreas adjacentes ao mesmo, sugerindo que a alteração no *p53* é um evento precoce na carcinogênese gástrica (SAFATLE-RIBEIRO et al.,1996).

Analisando cento e vinte casos de câncer gástrico de diferentes estágios, RANZANI et al.(1995), encontraram nos tumores precoces, mutações do *p53* em frequência muito maior nos carcinomas do tipo intestinal (41%) do que nos do tipo difuso (4%). Quando comparados estágios precoces e avançados, foi observada uma similaridade de mutações entre os dois tipos histológicos. A maioria das lesões displásicas mostravam mutações, o que não ocorria com a metaplasia intestinal. Estes achados sugerem que as alterações do gene *p53* têm um papel importante no início da carcinogênese dos tumores do tipo intestinal, agindo, provavelmente, na transição entre metaplasia e displasia. CORREA & SHIAO (1994) sugerem que as alterações no *p53* ocorrem no processo de carcinogênese, antes de que possam ser detectadas com técnicas de imunohistoquímica e que elas podem estar ligadas ao óxido nítrico ou outros carcinógenos, porque o óxido nítrico também pode induzir mutações do tipo C-T; este óxido nítrico se originaria a partir de leucócitos

polimorfonucleares que são observados nos tecidos vizinhos às zonas de metaplasia, displasia e carcinoma.

Recentemente, tem sido relatado que o gene *p53* tem um papel importante no controle da angiogênese tumoral, por regular a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (vascular endothelial growth factor /VEGF). MAEDA et al.(1998), encontraram uma coincidência entre a positividade para o *p53* e o VEGF em 72% dos tumores estudados. A densidade microvascular esteve muito aumentada nos tumores *p53* positivos e VEGF positivos e estes dois fatores mostraram correlação positiva com um pior prognóstico.

A dosagem de DNA celular, através da citometria de fluxo, fornece informações a respeito da presença de anomalias clonais do DNA (aneuploidia do DNA) e do ciclo celular das células tumorais. ABAD et al.(1998) estudaram espécimes frescos (ainda não incluídos em parafina) de tumores gástricos e encontraram clones aneuplóides de DNA em 62% dos casos e uma alta atividade proliferativa (proporção de células na fase S) nesses tumores aneuplóides, quando comparados com os diplóides. Nesta série, a aneuploidia estava significativamente associada a um pior prognóstico.

Anormalidades nos sistemas receptores de fatores de crescimento têm sido encontradas no carcinoma gástrico. Os tumores bem diferenciados têm mostrado uma alta frequência na super expressão dos receptores EGFR, ERBB2 E ERBB3 (WRIGHT & WILLIAMS, 1993). Recentes estudos sobre a expressão de moléculas cálcio dependentes, responsáveis pela adesão celular, chamadas cadherinas, mostram que estas são glicoproteínas localizadas nas bordas laterais das células

epiteliais, responsáveis pela ligação intercelular. Elas estão ausentes ou funcionalmente defeituosas nos adenocarcinomas do tipo difuso e isto pode ser relevante na história natural dos dois tipos de carcinoma gástrico: na presença de E-cadherina, as células tumorais podem formar glândulas e na sua ausência, as células podem proliferar e invadir os tecidos, desordenadamente (CORREA & SCHIAO,1994).

Nas células normais, os telômeros vão encurtando progressivamente e este encurtamento funciona como um relógio da mitose através do qual as células contam a sua divisão, caminhando para a senescência. A atividade da enzima telomerase confere imortalidade celular, através da estabilização dos cromossomos, participando no desenvolvimento da maioria dos cânceres humanos. A transcriptase reversa da telomerase está super expressa em 25% das metaplasias intestinais, em 50% dos adenomas e na maioria dos carcinomas gástricos, sugerindo que a ativação da telomerase seja um degrau crítico nos estágios precoces da carcinogênese gástrica (TAHARA, SEMBA, TAHARA,1996;YASUI et al.,1999).

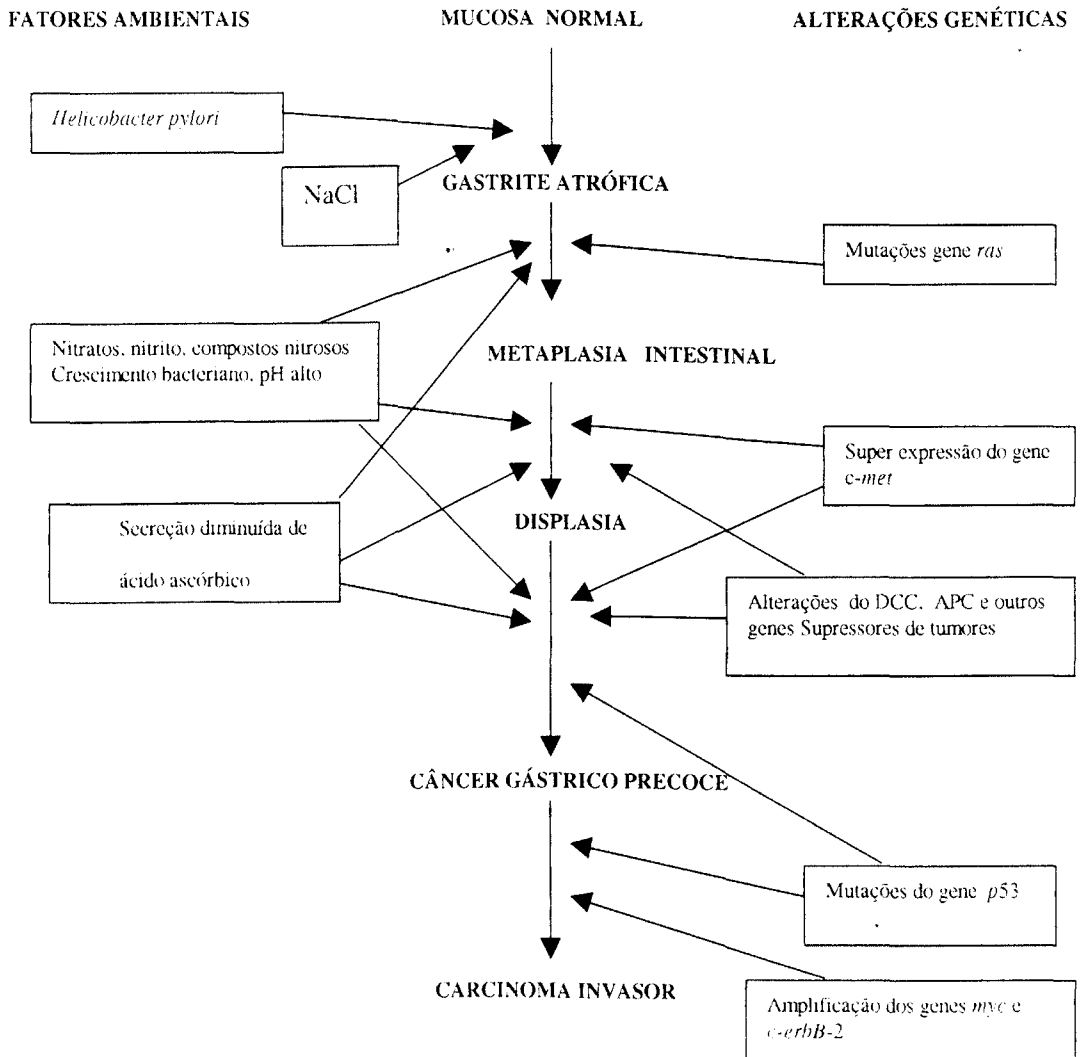


FIGURA1: Hipótese de CORREA para carcinogênese gástrica.[modificado de MALTONI et al.,1998]

1.5 CARCINOGENESE GÁSTRICA EXPERIMENTAL

O carcinoma de estômago é um dos cânceres espontâneos mais raros em animais. Não existe nenhuma cepa na qual o câncer gástrico se desenvolva regularmente; somente casos raros e isolados têm sido descritos (BRALOW,1972). O primeiro modelo que desenvolveu adenocarcinoma gástrico em ratos usava o carcinógeno N,N'-2,7-fluorenylenebisacetamida(2,7-FAA) (MORRIS et al.,1961). SUGIMURA & FUJIMURA relataram, em 1967, que o N-Metil-N'-nitro-Nitrosoguanidina (MNNG) é efetivo na produção de adenocarcinoma gástrico e este tem sido o carcinógeno mais amplamente utilizado na indução desses tumores para estudos do desenvolvimento histopatológico e de fatores moduladores da carcinogênese.

SCHLAKE & NOMURA (1979) foram os primeiros a descrever a gênese de câncer no estômago operado de rata, sem a adição de carcinógeno, após a realização de uma ressecção gástrica com reconstrução gastroduodenal tipo Billroth I. A maioria dos estudos posteriores têm utilizado, como base, o experimento de LANGHANS et al. (1981a,1981b) no qual se valoriza o papel do refluxo biliar-pancreático no desenvolvimento das lesões gástricas, modificando a intensidade do refluxo mediante variações cirúrgicas e onde foi encontrada uma incidência de alterações malignas da mucosa gástrica proporcional ao grau de refluxo duodeno-gástrico: 70,9% de carcinoma nos ratos submetidos à gastroenteroanastomose sem ressecção, 30% nos ratos com ressecção gástrica e reconstrução tipo Billroth II, 23,1% nos casos com ressecção e reconstrução tipo Billroth II com

enteroenteroanastomose de Braun, 10% nos casos de ressecção com reconstrução tipo Billroth I e nenhum caso nos ratos submetidos à ressecção com reconstrução tipo Billroth II com Y de Roux.

Outras pesquisas têm confirmado que o refluxo duodeno-gástrico aumenta a incidência de carcinoma em ratos operados e tratados com MNNG (NISHIDOI, KOGA, KAIBARA, 1984). Estudos recentes de carcinogênese esofágica em ratos têm demonstrado que o câncer ocorre com maior frequência na presença de refluxo duodenal (DeMEESTER et al.,1992; DeMEESTER et al.,1996; MELO,1997). O refluxo duodeno-gástrico, sem a presença de carcinógenos exógenos, produz adenocarcinoma em ratos com estômagos ressecados ou não (THEURING, DITTRICH, WOLTER,1985; TAYLOR et al.,1991; MIWA et al.,1992b; KONDO et al.,1995). Isto introduz a hipótese de que alguns componentes do suco duodenal possam agir como carcinógenos. Qual componente do suco duodenal é responsável pela carcinogênese, ainda permanece obscuro.

MASON (1986), através de diferentes técnicas cirúrgicas para produzir refluxo biliar e refluxo pancreático duodenal isolados e combinados, estudou 40 ratos durante 9 meses e observou que no grupo com refluxo biliar isolado não ocorreram neoplasias e que a incidência maior de carcinoma recaiu sobre os grupos com refluxo pancreático duodenal (78%) e refluxo bílio-pancreático (58%), sugerindo que a secreção pancreático duodenal, em detrimento da bile, é a responsável pelo potencial carcinógeno do refluxo duodeno-gástrico (RDG). Estes achados foram confirmados em estudo posterior (MASON et al.,1988). Outros estudos que também utilizaram procedimentos cirúrgicos para produzir refluxos

isolados e combinados, concluíram que a bile é o maior responsável pela carcinogênese gástrica (FUJIMURA,1991; MIWA et al.,1992a).

MIRVISH et al. (1998), estudando o efeito dos componentes do suco duodenal na carcinogênese esofágica, concluíram que a bile isolada não aumenta a incidência de carcinoma, mas o suco pancreático isolado ou associado ao refluxo biliar o faz, mesmo na ausência de carcinógeno exógeno. KITAJIMA et al. (1992),observando endoscopicamente o desenvolvimento e crescimento de adenocarcinomas induzidos por MNNG em ratos *Wistar*, encontraram refluxo biliar excessivo por volta de 24 semanas, diretamente relacionado ao aparecimento dos tumores. A análise morfológica e estudo dos achados microangiográficos sugerem que existem similaridades entre o câncer gástrico nos ratos e nos humanos e, também, que o excesso de bile no estômago pode causar alterações qualitativas na mucina da mucosa gástrica.

O mecanismo pelo qual o refluxo duodenal induz à carcinogênese ainda não está esclarecido. As enzimas proteases pancreáticas e a pepsina podem lesar a mucosa (MIRVISH,1997). Os ácidos biliares isolados não são mutágenos (GIRELLI et al.,1996), mas vários estudos comprovam que eles agem como promotores da carcinogênese gástrica em ratos (KOBORI et al., 1984; YOSHIDA et al.,1992). No entanto, a carcinogênese gástrica e esofágica, induzida pelo RDG, na ausência de carcinógeno externo, não pode ser explicada totalmente pela promoção dos ácidos biliares. Pode-se pensar que um carcinógeno se forma no suco duodenal em algum estágio. A hipótese de CORREA et al.(1975) sugere a formação intragástrica de carcinógenos a partir de nitritos, provenientes da redução de nitratos

por bactérias proliferadas no suco gástrico com pH elevado, e aminas ou amidas. No estômago, operado ou não, a bile do conteúdo refluído é uma boa fonte de amidas (MIRVISH,1983). Os sais biliares podem reagir com nitritos para formar nitrosamidas como, por exemplo, o ácido N-Nitrosoglicólico, o qual é carcinógeno para o fígado e, provalvemente, para o estômago de ratos (BUGSY et al.,1985).

Este trabalho pretende estudar a carcinogênese gástrica, analisando dois fatores até aqui discutidos : refluxo duodeno-gástrico através de piloroplastia, oferecendo a presença de bile no estômago , e ingestã de nitrito de sódio na água, oferecendo um agente nitrosante .

2 OBJETIVOS

Neste estudo pretende-se:

- 2.1 – desenvolver modelo experimental de carcinogênese gástrica em ratos *Wistar* operados com piloroplastia de Finney;
- 2.2 – avaliar a influência da ingestão de nitrito de sódio na água de beber, neste modelo;
- 2.3 – analisar as concentrações de ácidos biliares e valor do pH gástrico em ratos *Wistar* com piloroplastia de Finney ou laparotomia e submetidos ou não à ingestão de nitrito de sódio.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

A amostra foi constituída de 110 ratos (*ratus norvegicus*) machos da cepa *Wistar*, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas. Com 6 semanas de vida, os animais foram transferidos para o Biotério da Divisão de Produção e Experimentação Animal (DPEA) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) para adaptação por duas semanas. Os animais foram mantidos em caixas plásticas, com tampa gradeada zincada e fundo forrado com serragem esterilizada em autoclave. Havia cinco ratos por caixa. As gaiolas eram higienizadas três vezes por semana. Todos os animais foram mantidos no biotério por períodos diários de 12 horas de luz, sob fluxo contínuo de ar e à temperatura ambiente (Figura 2). Os ratos eram pesados a cada quatro semanas, durante o experimento. Todos os itens pertinentes ao experimento como : aquisição, transporte, condições do biotério, nutrição, cuidados veterinários e registros foram seguidos de acordo com os Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (GOLDIM,1995) e os pesquisadores procuraram tratar os animais como seres sencientes, evitando ou minimizando os desconfortos, riscos ou dor, como imperativos éticos. Todos os dados foram registrados e armazenados em um banco de dados em Excel, elaborado especificamente para esse fim.



FIGURA 2 : Disposição das caixas plásticas no Biotério do DPEA da FEPPS

3.2 ALIMENTAÇÃO E ÁGUA

Os animais foram alimentados, desde o nascimento até 21 dias de vida, com aleitamento materno. Após esse período, com água e ração para roedores (ANEXO A), “ad libitum”. A ração era trocada duas vezes por semana. A água de beber provinha da rede de abastecimento de Porto Alegre (DMAE) e era trocada a cada dois dias. O nitrito de sódio (NaNO_2) (BASF Aktiengesellschaft)(ANEXO B) era diluído na água de beber, na dose de 3 g/litro, e oferecido como única opção de ingesta hídrica aos animais dos grupos II e IV, a partir da 11ª semana de vida, até o final do experimento. A solução de nitrito de sódio era conservada em refrigerador entre 8 e 11° e trocada duas vezes por semana.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

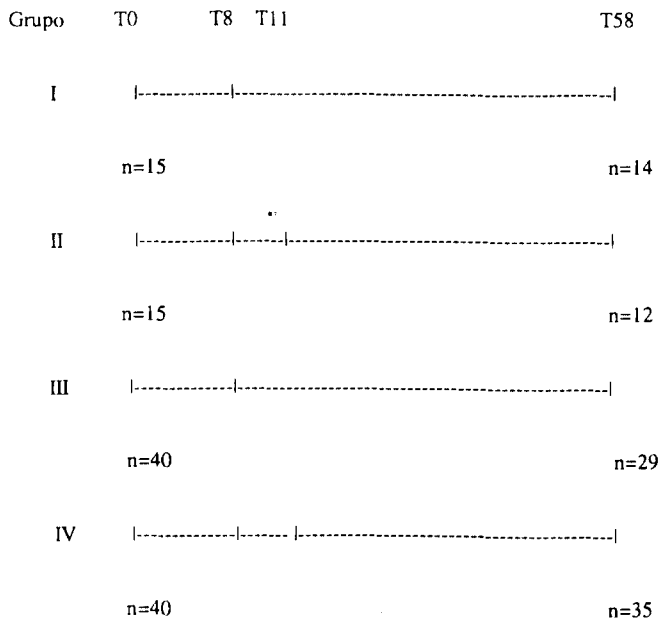
O experimento consistiu na realização de cirurgia (laparotomia ou piloroplastia) em associação, ou não, com o uso de nitrito de sódio na água de beber. Os 110 ratos foram distribuídos em grupos assim constituídos (Figura 3):

GRUPO I - submetidos à laparotomia com manipulação de alças (*Sham's operation*), recebiam somente água durante todo o experimento.

GRUPO II - submetidos à laparotomia com manipulação de alças (*Sham's operation*), recebiam nitrito de sódio diluído na água de beber a partir de 3 semanas após a cirurgia e durante todo o experimento.

GRUPO III - submetidos à piloroplastia tipo Finney, recebiam somente água durante todo o experimento.

GRUPO IV - submetidos à piloroplastia tipo Finney, recebiam nitrito de sódio diluído na água de beber durante todo o experimento.



T0 = DATA DO NASCIMENTO

Onde T= tempo em semanas

T8 = DATA DA CIRURGIA

n = número de ratos

T11 = DATA DO INÍCIO DO USO DE NITRITO DE SÓDIO

T58 = DATA DO SACRIFÍCIO

FIGURA 3 : Diagrama seqüencial evolutivo do experimento, em semanas.

3.4 CIRURGIA

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em todos os grupos, quando os ratos atingiam 8 semanas de vida, com peso médio entre 250 e 350g. Após jejum de 12 horas para ração e água, os ratos eram anestesiados, através de injeção intramuscular de cloridrato de zolazepam e cloridrato de tiletamina (ZOLETIL®) (ANEXO C), na dose de 50 mg/kg..Após realização de tricotomia, os animais eram colocados sobre uma placa cirúrgica e realizada antissepsia com álcool iodado. Iniciava-se, então, o procedimento, com uma incisão mediana e abertura da cavidade abdominal.

3.4.1 Laparotomia – *Sham's operation*

Após a abertura da cavidade, realizava-se a manipulação das vísceras abdominais e fechamento da incisão, com sutura contínua com fio de nylon.

3.4.1 Píloroplastia

Após a abertura da cavidade procedia-se à tração leve do estômago no sentido caudal, proporcionado a perfeita identificação do esôfago terminal, pré-estomago, estômago glandular e todo o duodeno. Realizava-se uma sutura contínua seroserosa unindo a parede anterior do antro pré-pilórico (grande curvatura) com a primeira e segunda porções do duodeno. A seguir era feita uma incisão paralela às linhas da sutura na parede gástrica e duodenal e, na extremidade superior, através do píloro, de modo que a incisão ficava parecendo um “U” invertido. A sutura total, unindo estômago e duodeno, iniciava na extremidade superior da sutura seroserosa, vindo

para baixo até a extremidade das incisões e, depois, continuando para cima, unindo o bordo direito do duodeno com o bordo esquerdo da parede gástrica, cirurgia chamada piloroplastia de Finney (Figura 4 e 5) (KIRK,1989). Todas as suturas no estômago e duodeno foram realizadas com fio de prolene nº 7-0 cardiovascular (ANEXO D).

No pós-operatório, os animais ficavam sem receber água por 12 horas e ração por 24 horas.

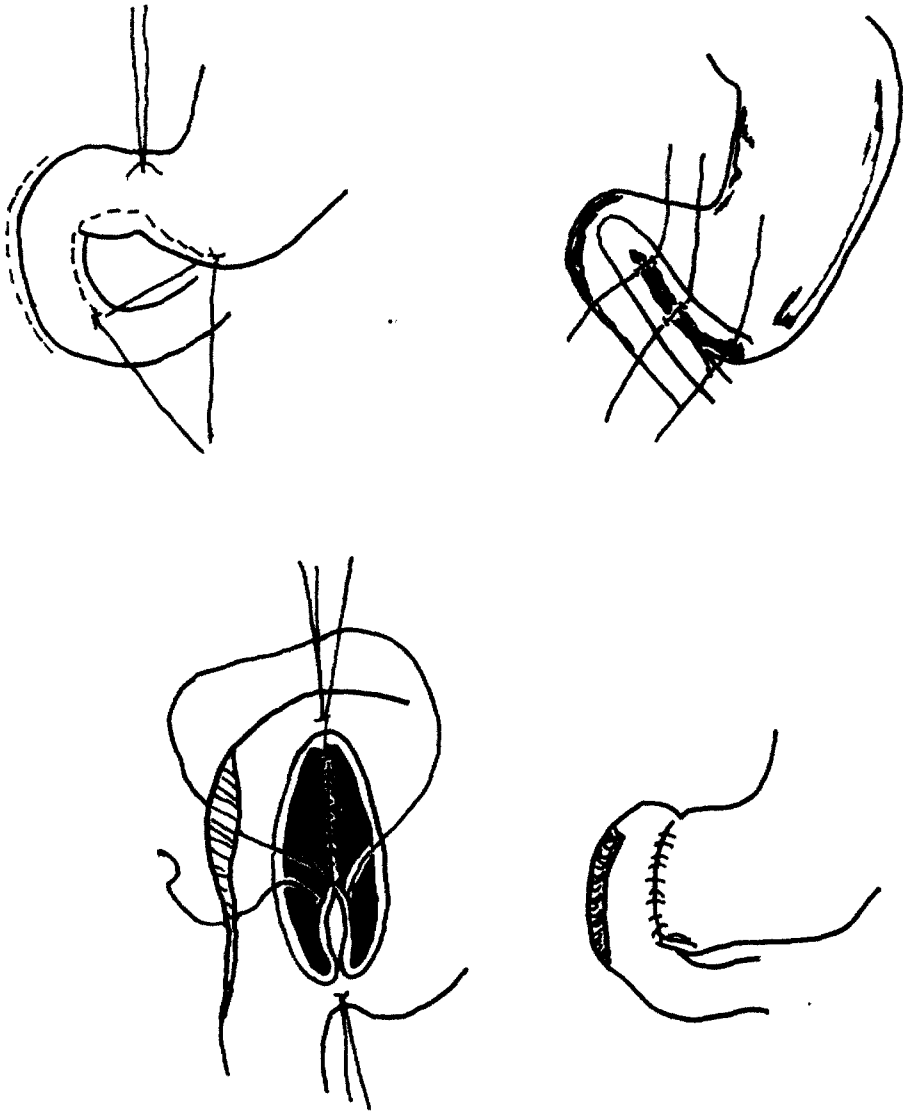


FIGURA 4 : Modelo de piloroplastia realizada nos grupos III e IV.

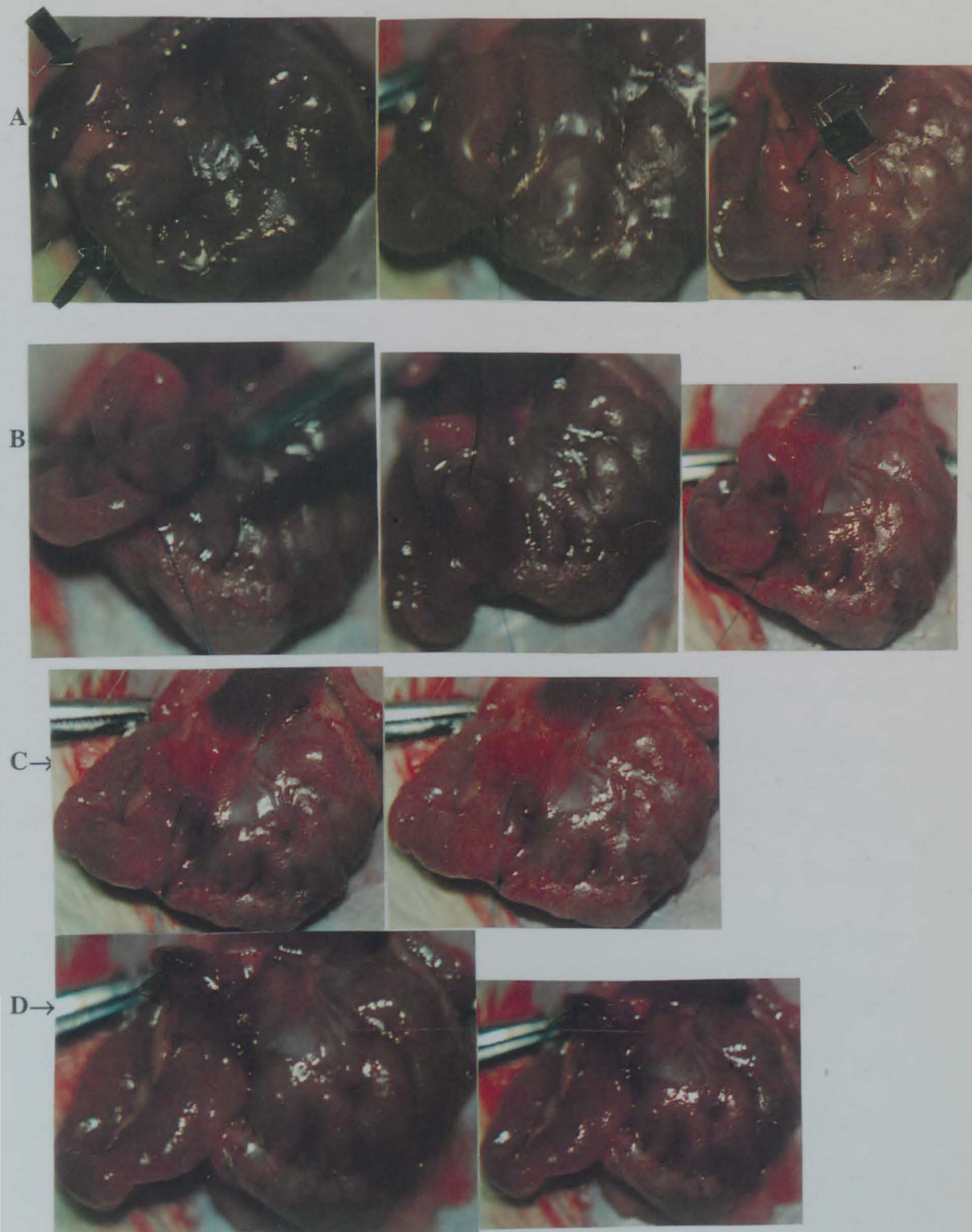


FIGURA 5: Fotografias seqüenciais da piloroplastia realizada nos grupos III e IV. **A:** duodeno e antro pré-pilórico, indicados pelas setas e sutura seroserosa entre eles, indicada pela seta maior; **B:** incisão em “U” invertido no estômago, duodeno e através do piloro; **C:** sutura total entre estômago e duodeno, iniciando na extremidade da sutura seroserosa, vindo para baixo e retornando para cima, unindo o bordo direito do duodeno com o bordo esquerdo da parede gástrica; **D:** aspecto final da cirurgia.

3.5 SACRIFÍCIO

Quando se completaram 50 semanas de pós-operatório os ratos foram sacrificados, através de inalação de éter etílico em campânula fechada, de forma indolor.

3.6 NECRÓPSIA

O tempo decorrido entre a morte do animal e a necrópsia nunca excedeu a cinco minutos. Uma incisão mediana era feita desde o apêndice xifóide até o púbis, procedia-se à ligadura do duodeno, logo após a anastomose, e à coleta de suco gástrico, para análise. Ampliava-se a incisão em direção cranial com ressecção do plastrão condroesternal. Realizava-se a liberação do estômago, duodeno, jejuno proximal e esôfago torácico até a região cervical com ressecção, em bloco, do esôfago, estômago e duodeno. Os conjuntos eram abertos através de incisão ao longo da grande curvatura gástrica, lavados em água corrente, estendidos sobre cartolina e fixados com alfinete. Após identificação fotográfica, todos os espécimes eram colocados, um a um, em frascos com formol a 10% para posterior descrição macroscópica.

3.7 COLETA DE AMOSTRAS DO SUCO GÁSTRICO

Após a ligadura do duodeno, para que não houvesse refluxo devido à manipulação, fazíamos a entubação oroesôfagogástrica com sonda de Nelaton nº12 e instilação de 5ml de solução salina no estômago. O conteúdo gástrico era, então, aspirado e colocado em dois frascos identificados e armazenados em freezer a -70°C, para posterior análise do pH e concentração de ácidos biliares.

3.8 ANÁLISE DO pH

Realizada no Laboratório de Fisiologia Digestiva do Instituto de Biociências da UFRGS, através de um pHmetro B374 marca micronal.

3.9 DOSAGEM DOS ÁCIDOS BILIARES

A dosagem dos ácidos biliares foi realizada no Laboratório de Pesquisa do HCPA, através do kit BILE ACIDS fornecido pelo laboratório Sigma (ANEXO C) que usa um método colorimétrico e enzimático pela enzima 3-alfa-Hydroxysteroid dehydrogenase conforme técnica descrita por FAUSA & SKALHEGG(1974).

3.10 MACROSCOPIA

O exame macroscópico foi realizado com o auxílio de uma lupa. O número, tamanho, posição e características de cada lesão foram anotados conforme ANEXO E. Para descrição utilizou-se a terminologia anatômica proposta por ROBERT (1971) (Figura 6).

3.11 HISTOLOGIA

Após a observação macroscópica, o estômago era seccionado em sentido tangencial ao seu maior eixo e incluídos em parafina cortes do esôfago (1/4), pré-estômago (2/4), estômago glandular (anastomose) (3/4) e duodeno(4/4). Os cortes histológicos, de 4 micrômetros de espessura, cortados em micrótomo AOTEC, com navalhas descartáveis, foram corados por hematoxilina-eosina.

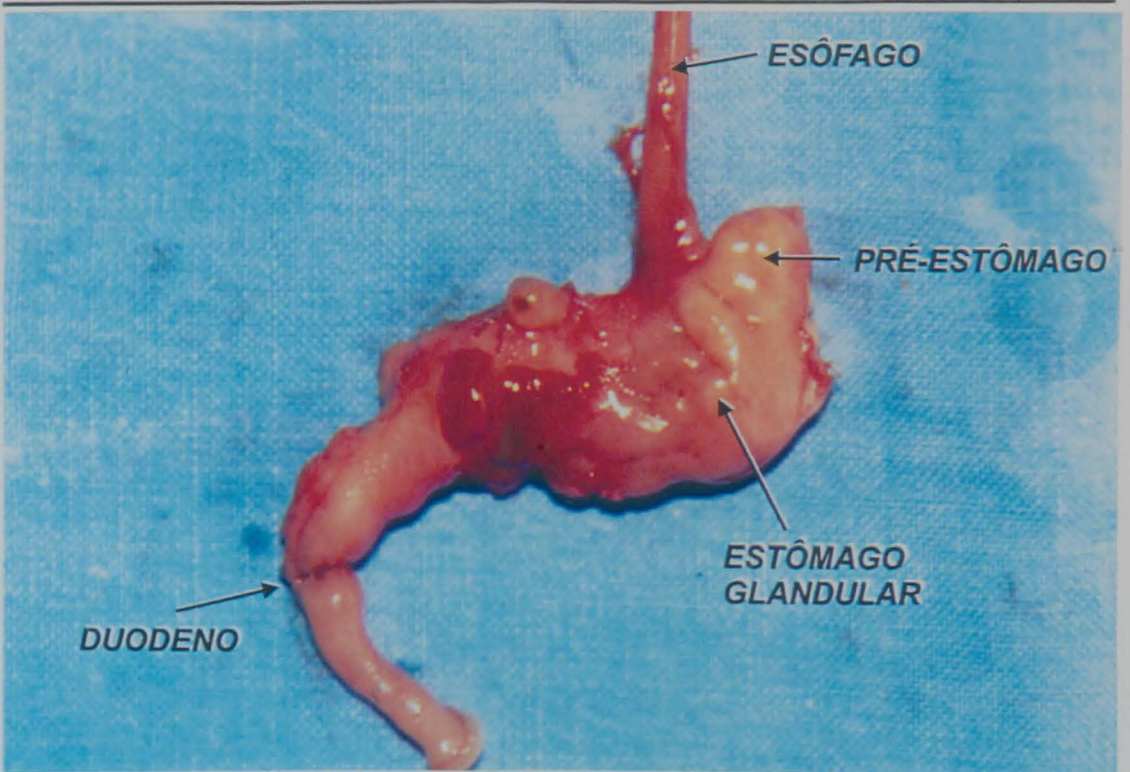


FIGURA 6: Terminologia anatômica utilizada, rato 9, grupo III

3.12 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os cortes histológicos foram todos examinados em microscópio óptico comum, por uma mesma patologista que desconhecia o tipo de tratamento realizado no espécime em estudo. As alterações histopatológicas, conforme descrições de NAGAYO (1973), BRALOW(1972), SCHLAKE&NOMURA(1979), THEURING, DITTRICH,WOLTER(1985), TAYLOR et al. (1991), KOBAYASI et al. (1991), foram classificadas como:

2) Estômago normal: Pré-estômago com epitélio escamoso. Estômago glandular com mucosa constituída por dois componentes : epitélio foveolar, cobrindo a camada superficial com células colunares uniformemente distribuídas e tecido glandular com glândulas pilóricas, fundicas ou cárdicas, dependendo da zona estudada.

3) Gastrite crônica: leve - pequeno número de células inflamatórias mononucleares (linfócitos e plasmócitos) na mucosa e/ou lâmina própria; moderada - número de células inflamatórias maior; acentuada - numerosas células inflamatórias disseminadas pela mucosa.

4) Úlcera: padrão morfológico de reação inflamatória que se caracteriza por defeito local ou escavação, com perda de substância, comprometendo toda a espessura do epitélio, com necrose no fundo.

5) Hiperplasia epitelial escamosa: espessamento do epitélio às custas do aumento do número de células.

6) Hiperplasia glandular: proliferação da mucosa glandular sem atipia ou destruição da arquitetura tecidual.

7) Implantação de mucosa: aparecimento de glândulas benignas, abaixo da submucosa ou muscular da mucosa na zona de anastomose, por invaginação ou implantação, sem evidência de atipias.

8) Granuloma de corpo estranho: agregado de macrófagos ao redor de partícula estranha (fio cirúrgico) formando granuloma .

9) Papiloma escamoso: neoplasia benigna do epitélio escamoso, geralmente de padrão exofítico, com hiperplasia-epitelial e queratinização.

10) Adenoma: neoplasia benigna do epitélio glandular, geralmente de padrão de crescimento exofítico. Há aumento do número de glândulas bem organizadas e atipia celular mínima, sem qualquer sinal de invasão da camada basal.

11) Displasia: leve (baixo grau)- alteração das camadas celulares basais, atingindo até um terço da espessura do epitélio, com núcleos pleomórficos; ocorrem mitoses no terço inferior do epitélio, fora da camada basal; acentuada (alto grau) : as alterações displásicas atingem toda espessura do epitélio, que é composto de células marcadamente anormais; a polaridade nuclear está perdida.

12) Adenocarcinoma : neoplasia maligna de epitélio glandular, com estrutura glandular relativamente preservada, polimorfismo nuclear, aumento da atividade mitótica e mitoses atípicas, com atipias celulares e com invasão da membrana basal.

Depois de realizada a tabulação, os dados foram classificados em seis estágios, em ordem crescente , sempre conforme a maior severidade do diagnóstico de cada peça em estudo:

- Estágio 1 : esôfago e estômago normais, gastrite leve e moderada;
- Estágio 2 : hiperplasia epitelial, hiperplasia glandular, gastrite acentuada e úlcera;
- Estágio 3 : granuloma de corpo estranho e implantação mucosa ;
- Estágio 4 : papiloma e adenoma;
- Estágio 5 : displasia;
- Estágio 6 : adenocarcinoma.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foram utilizados os seguintes testes:

3.13.1 - Qui –Quadrado, para comparar proporções entre mais do que dois grupos, com correção de Yates, para comparações entre os grupos 2 a 2;

3.13.2 - Teste de Kruskal-Wällis, para comparar dados contínuos e variáveis ordinais entre mais do que dois grupos;

3.13.3 - Teste de Mann-Whitney U , para comparar dados contínuos e variáveis ordinais entre grupos individuais;

O nível de significância utilizado foi de 5% ($p=0.05$). Os dados das variáveis: concentração de ácidos biliares e pH, por apresentarem distribuição assimétrica, foram expressos através da mediana e a medida de dispersão utilizada foi a amplitude entre quartis (AEQ)(percentil 25 e percentil 75)(WAGNER,1998). O banco de dados foi convertido para análise no pacote estatístico SPSS versão 8.0 para WINDOWS (SPSS Inc).

4 RESULTADOS

4.1 DESENVOLVIMENTO DO EXPERIMENTO

Foram operados um total de 110 ratos, destes 10 (9%) morreram no pós-operatório imediato. A causa da morte foi dilatação gástrica sem etiologia definida em três ratos, perfuração do pré-estômago em dois ratos e indeterminada em cinco ratos. Dez ratos morreram durante o desenvolvimento do experimento, sendo um do grupo I, três do grupo II, três do grupo III e três do grupo IV. Em quatro ratos identificou-se uma infecção, provavelmente fúngica, no pulmão e nos outros casos não foi possível determinar a causa da morte. Os noventa ratos restantes sobreviveram até 50 semanas pós-cirurgia e são objeto deste estudo.

As variações do peso dos ratos, nos diferentes grupos, no decorrer do experimento, estão representadas na Figura 7. Não houve diferença entre os grupos, com relação ao peso.

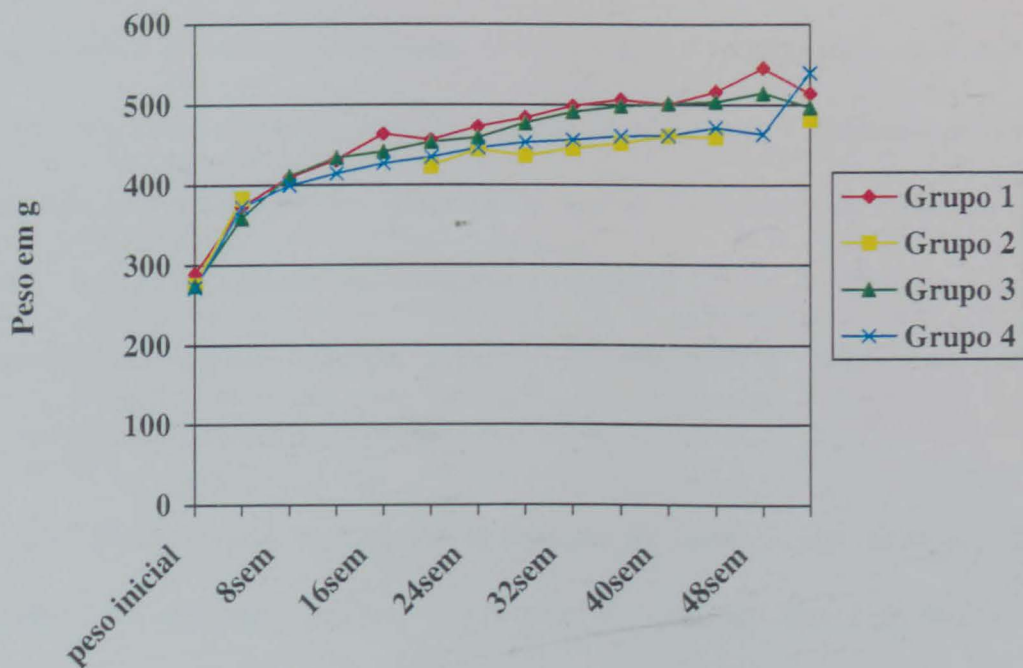


FIGURA 7: Gráfico da variação de peso dos ratos durante o experimento.

4.2 ACHADOS HISTOLÓGICOS

As alterações macroscópicas encontradas no esôfago, estômago e duodeno dos ratos estão descritas na Tabela 1. Somente um rato apresentou alteração macroscópica no esôfago, uma úlcera de terço médio e esôfago terminal (Figura 8). Nesse caso havia obstrução total do trânsito devido a tumor gástrico e refluxo de conteúdo para o esôfago com dilatação do mesmo. Os tumores de estômago foram assim definidos, quando eram maiores ou iguais à 1,5 cm de diâmetro e quando apresentavam aspecto nacarado sugestivo de malignidade; todos eram tumores parcial (11) ou totalmente (1) obstrutivos (Figura 9).

As alterações microscópicas estão descritas na Tabela 2. Não estão descritos os achados dos esôfagos porque, à exceção do caso de úlcera esofágica, cuja microscopia correspondia também à úlcera, todos foram considerados normais. No grupo controle (I), todos os estômagos foram considerados como histologicamente normais (estágio 1). No grupo controle com Nitrito de sódio (II), 83,4% dos estômagos foram considerados normais (estágio 1) (Figura 10) e 16,6% desenvolveram papilomas no pré-estômago (estágio 4) (Figura 11). Não houve diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos. Pode-se notar que houve desenvolvimento de adenocarcinoma (estágio 6) (figura 12 e 13) no estômago dos ratos submetidos à piloroplastia (grupos III e IV). A incidência de adenocarcinoma nos diferentes grupos está representada na Figura 14.

No grupo submetido à piloroplastia isolada (grupo III), em 10 ratos (34,4%), o achado histológico foi considerado normal (estágio 1), 3 ratos (10,3%)

desenvolveram adenomas (estágio 4) e 16 ratos (55,1%) desenvolveram adenocarcinoma. Comparando o grupo III com os grupos I e II, encontrou-se uma diferença significativa, $p=0.0001$. No grupo submetido à piloroplastia e que recebeu NaNO_2 na água de beber (grupo IV), em 12 ratos (34,2%) o achado histológico foi considerado normal; em 2 ratos (5,7%) foram encontradas alterações inflamatórias reacionais como úlcera, gastrite acentuada, hiperplasia glandular e epitelial (estágio 2) (Figura 15); 10 (28,5%) apresentaram implantação mucosa e granuloma, de corpo estranho, na zona de anastomose (estágio 3) (Figura 16 e 17); 5 (14,2%) desenvolveram adenomas (estágio 4) (Figura 18); em 1 rato (2,8%) foi encontrada displasia de alto grau (estágio 5) (Figura 19); 5 ratos (14,2%) desenvolveram adenocarcinoma gástrico (estágio 6) (Figura 20). A diferença foi significativa entre o grupo IV e o grupo I, $p=0.0001$, e o grupo II, $p=0.01$. Comparando o grupo III e o grupo IV, a diferença também foi significativa, $p=0.03$. Não foi encontrada metaplasia intestinal. Todos os adenocarcinomas encontrados eram do tipo intestinal, bem ou moderadamente diferenciados.

Não foram encontradas metástases nos ratos que desenvolveram adenocarcinoma, bem como tumores de intestino delgado, fígado ou cólons.

TABELA 1 - Macroscopia nos diferentes grupos

	GRUPO I n 14	GRUPO II n 12	GRUPO III n 29	GRUPO IV n 35	TOTAL n 90
Normal	14	12	7	20	53
Úlcera de esôfago	0	0	1	0	1
Úlcera gástrica	0	0	2	0	2
Nódulo anastomose	0	0	9	8	17
Tumor de estômago	0	0	11	1	12
Úlcera duodenal	0	0	4	2	6
Granuloma de corpo estranho	0	0	2	7	9

TABELA 2 - Achados histológicos no estômago nos diferentes grupos, por estágios*

Gr n°	Experimento	n	Estágio 1 n	Estágio 2 n	Estágio 3 n	Estágio 4 n	Estágio 5 n	Estágio 6 n
I	Laparotomia	14	14(100%)	0	0	0	0	0
II	Laparotomia + Nitrito de sódio	12	10 (83,4)	0	0	2 (16,6)	0	0
III	Piloroplastia	29	10 (34,4)	0	0	3 (10,3)	0	16 (55,1) ^{a,b}
IV	Piloroplastia + Nitrito de sódio	35	12 (34,2)	2 (5,7)	10 (28,5)	5 (14,2)	1 (2,8)	5 (14,2) ^c

* Os dados são apresentados como o número de ratos em cada grupo e seu respectivo achado histológico; a incidência (%) está entre parênteses.

a - $p=0.0001$ versus grupo I e grupo II

b - $p=0.03$ versus grupo IV

c - $p=0.0001$ versus grupo I; $p=0.01$ versus grupo II



FIGURA 8: Macroscopia : úlcera de esôfago, rato 2, grupo III



FIGURA 9: Tumor obstrutivo de estômago, rato 2, grupo III

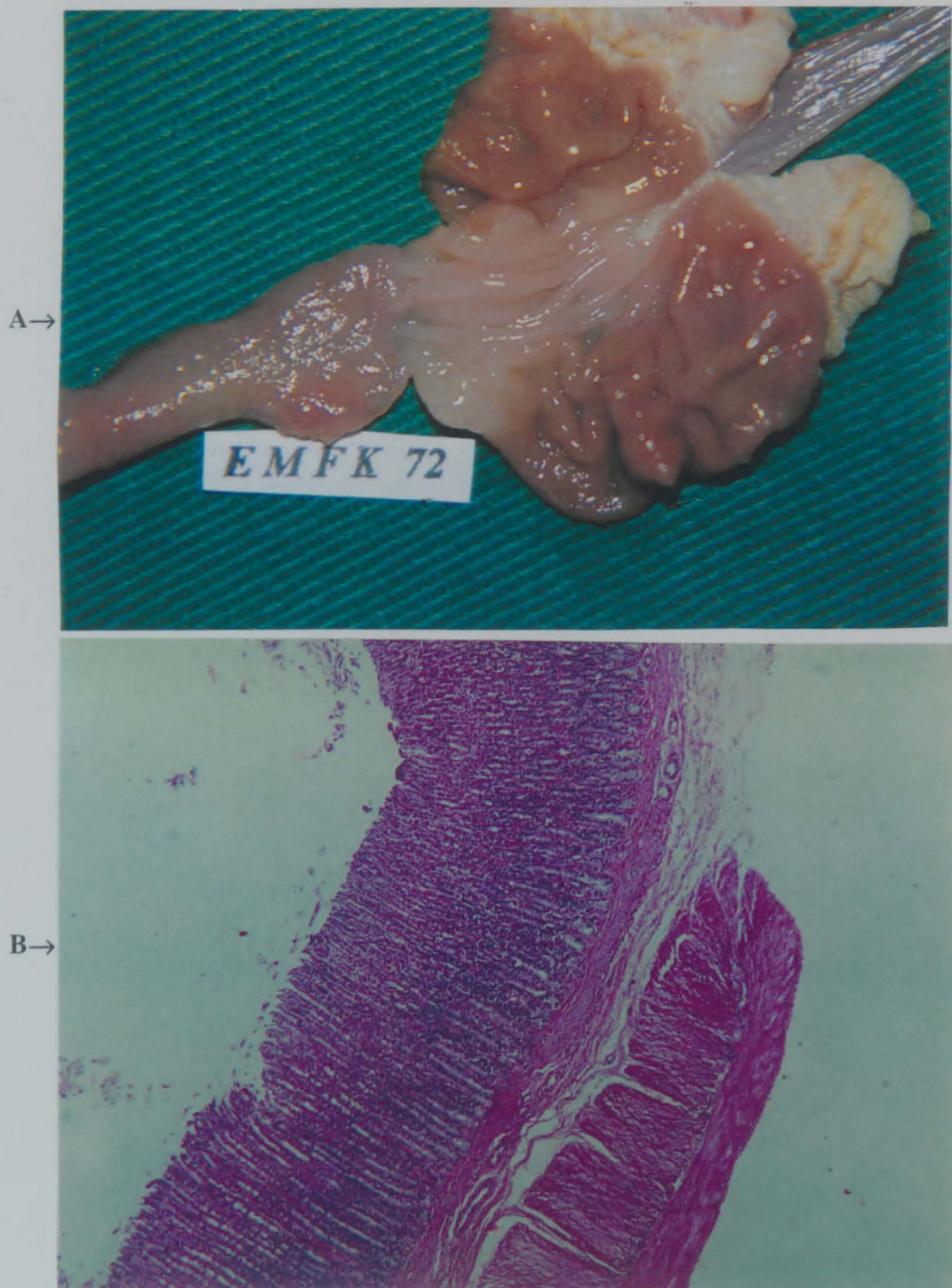


FIGURA 10: A- macroscopia estômago normal (estágio 1) e B microscopia (HE - 50X): estômago normal, epitélio foveolar, rato2, g grupo II

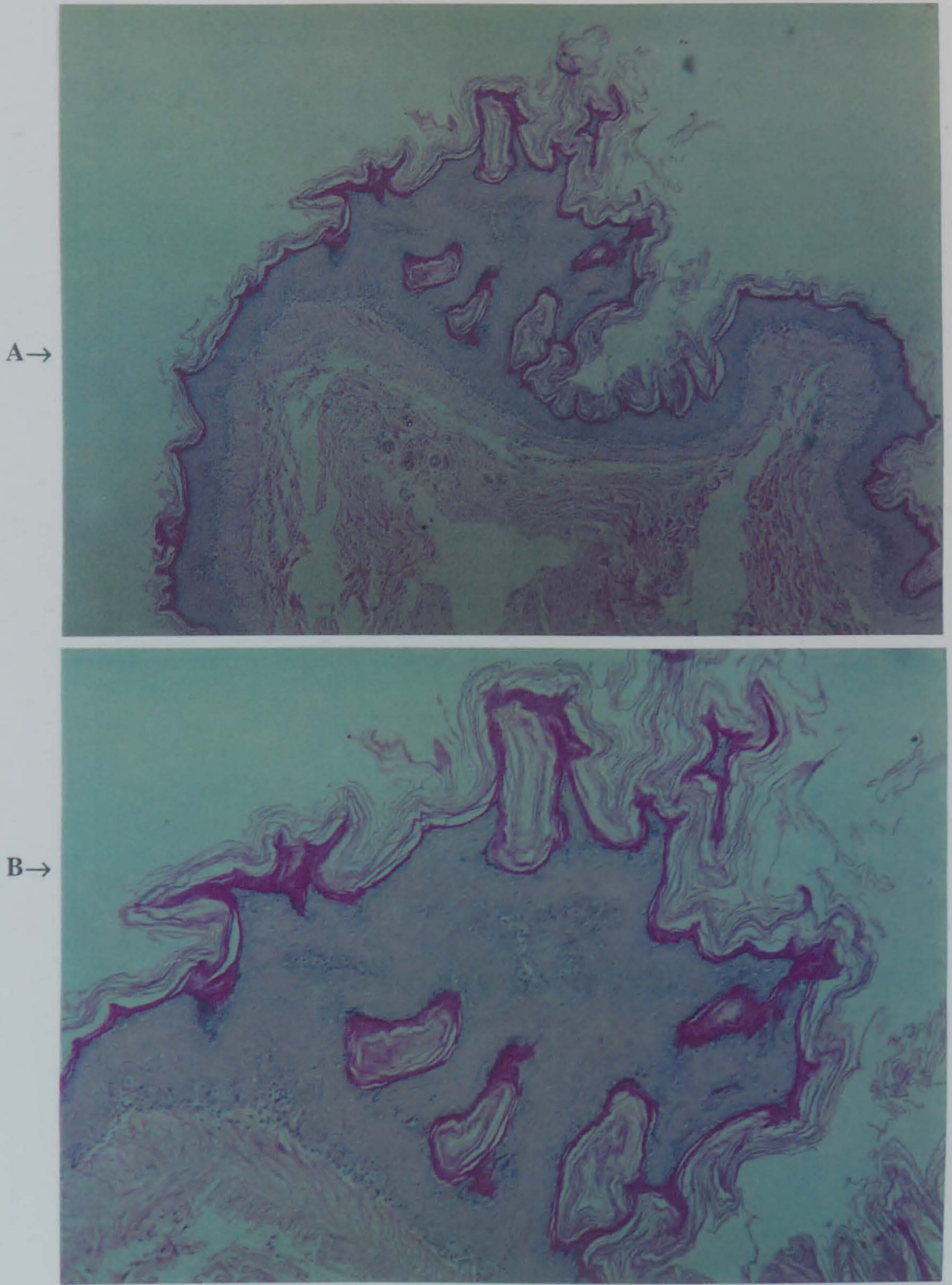


FIGURA 11: A (HE - 50 X) e B (HE - 100 X): Papiloma pré-estômago, proliferação das células escamosas, crescimento exofítico e queratinização, rato 58, grupo II

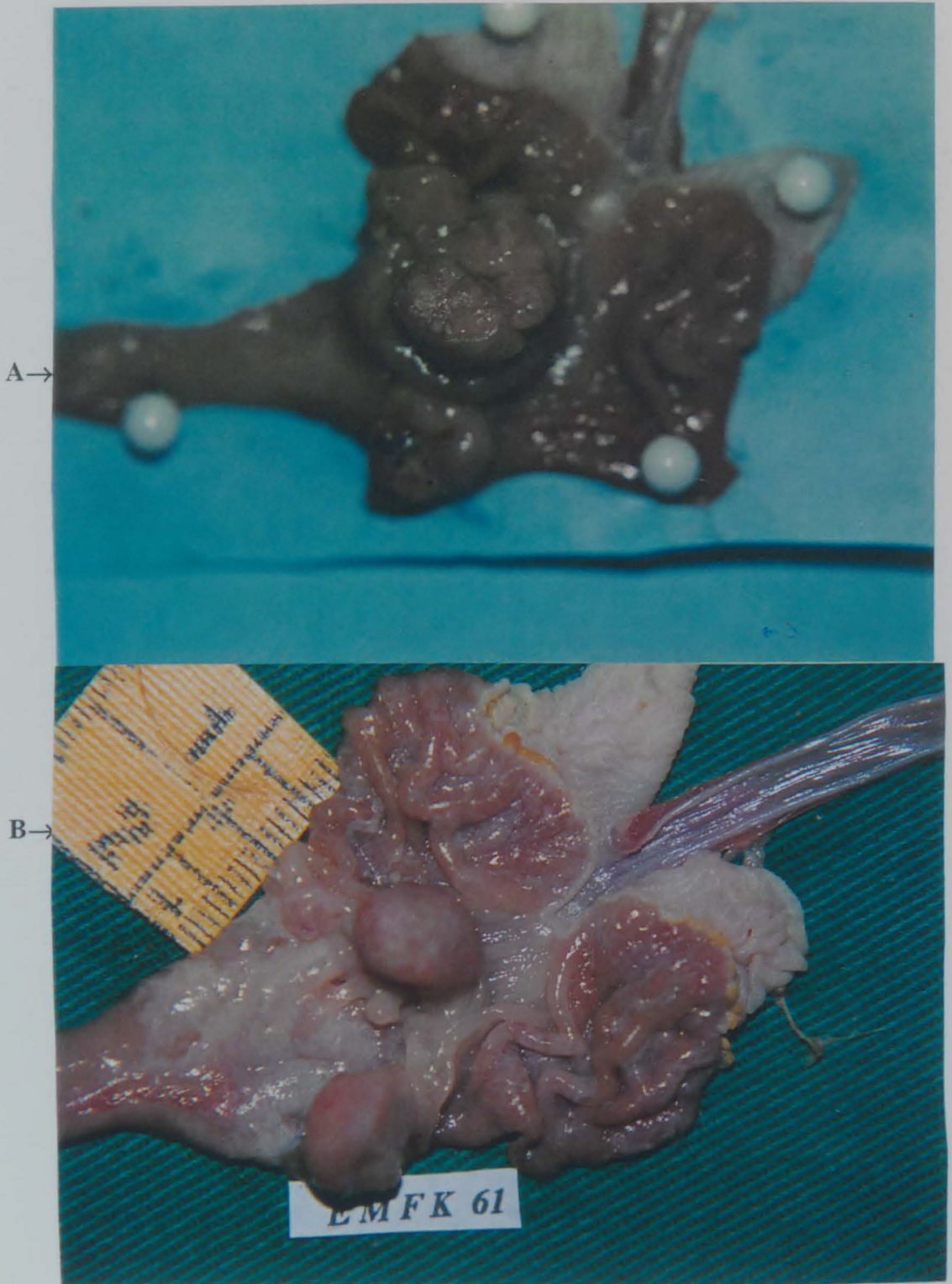


FIGURA 12: Macroscopia adenocarcinoma (estágio 6), **A:** rato 8, grupo III; **B:** rato 61, grupo IV

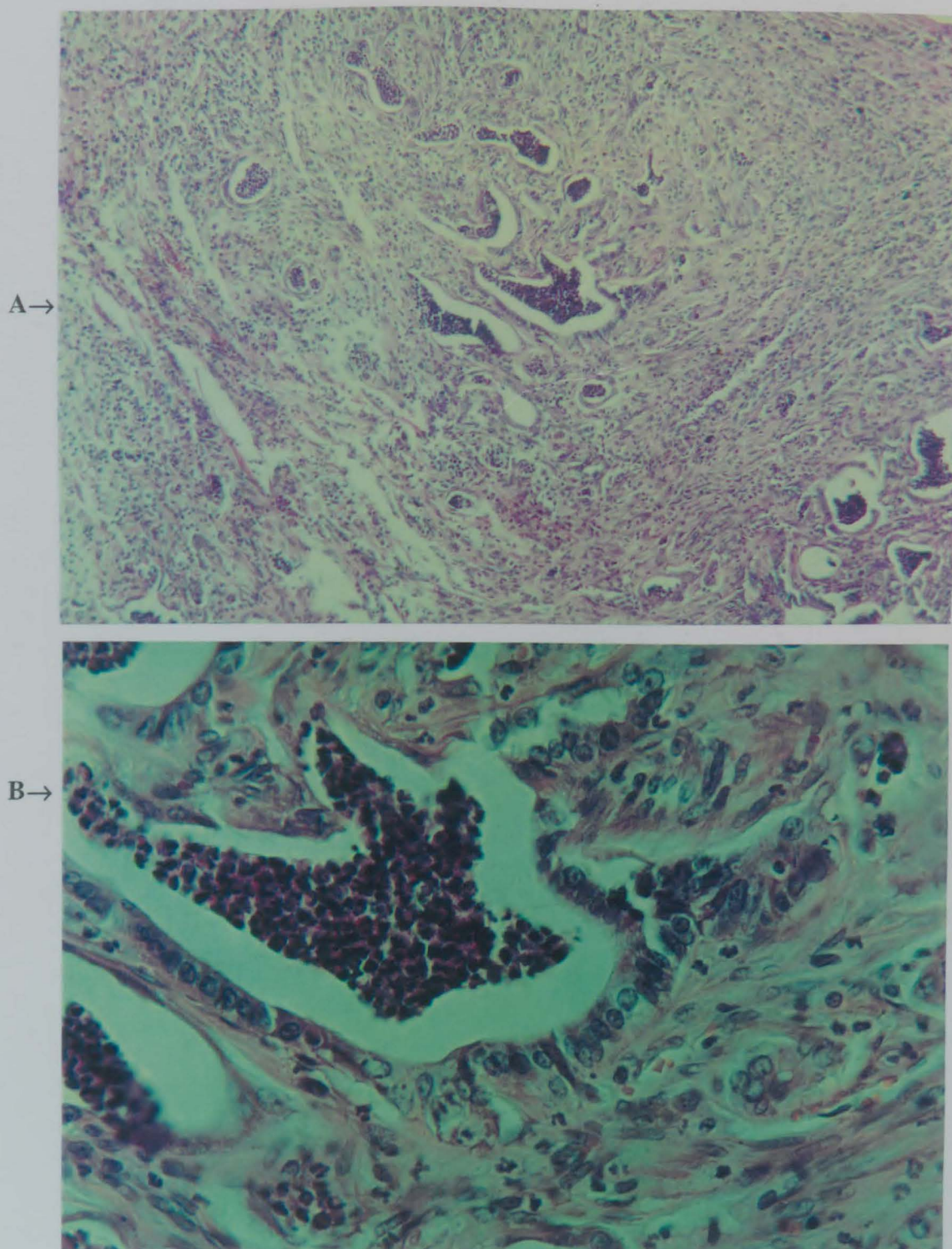


FIGURA 13: A (HE-100x) e B (HE-400x): Adenocarcinoma bem diferenciado (estágio 6), estrutura glandular definida com atipias , hiperchromasia e pseudo estratificação nuclear, rato 1, grupo III

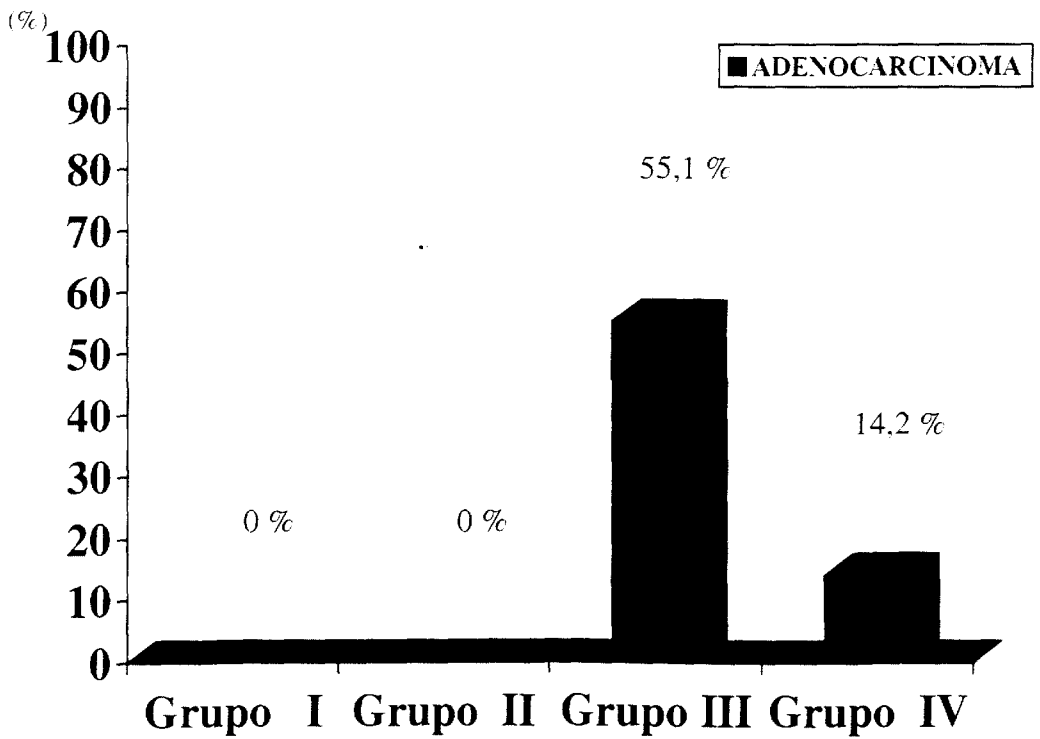


FIGURA 14: Gráfico da incidência de adenocarcinoma nos diferentes grupos



FIGURA 15: Macroscopia úlcera de duodeno (estágio 2) , rato 77, grupo IV

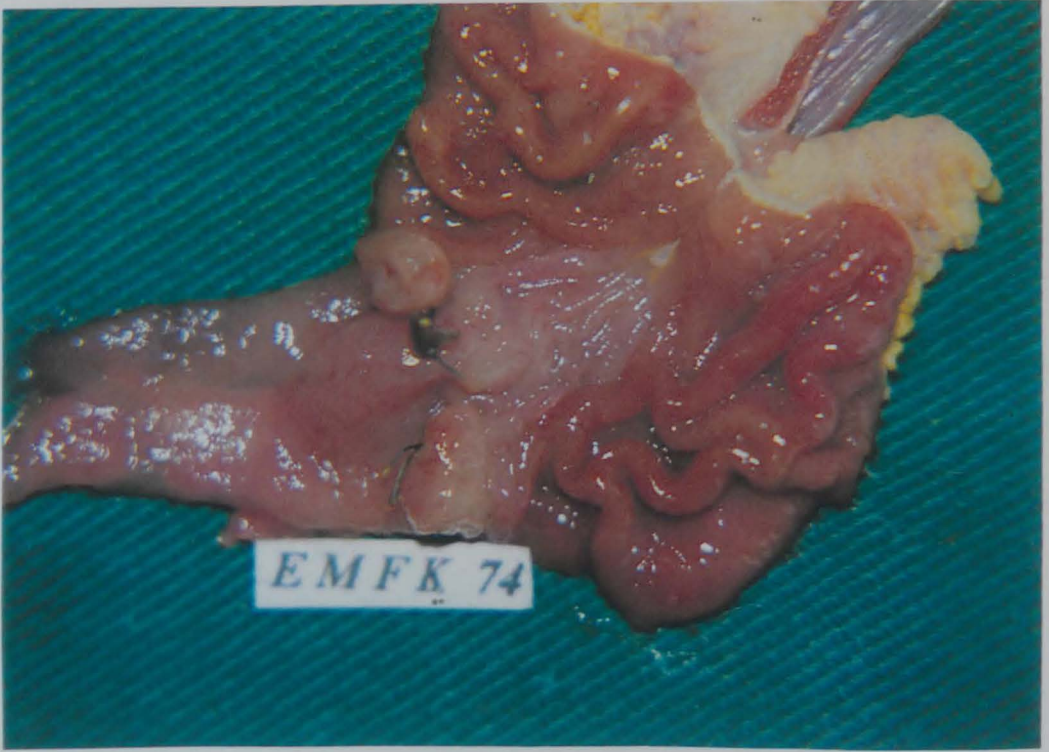


FIGURA 16: Macroscopia granuloma de corpo estranho (estágio 3), rato 74, grupo IV

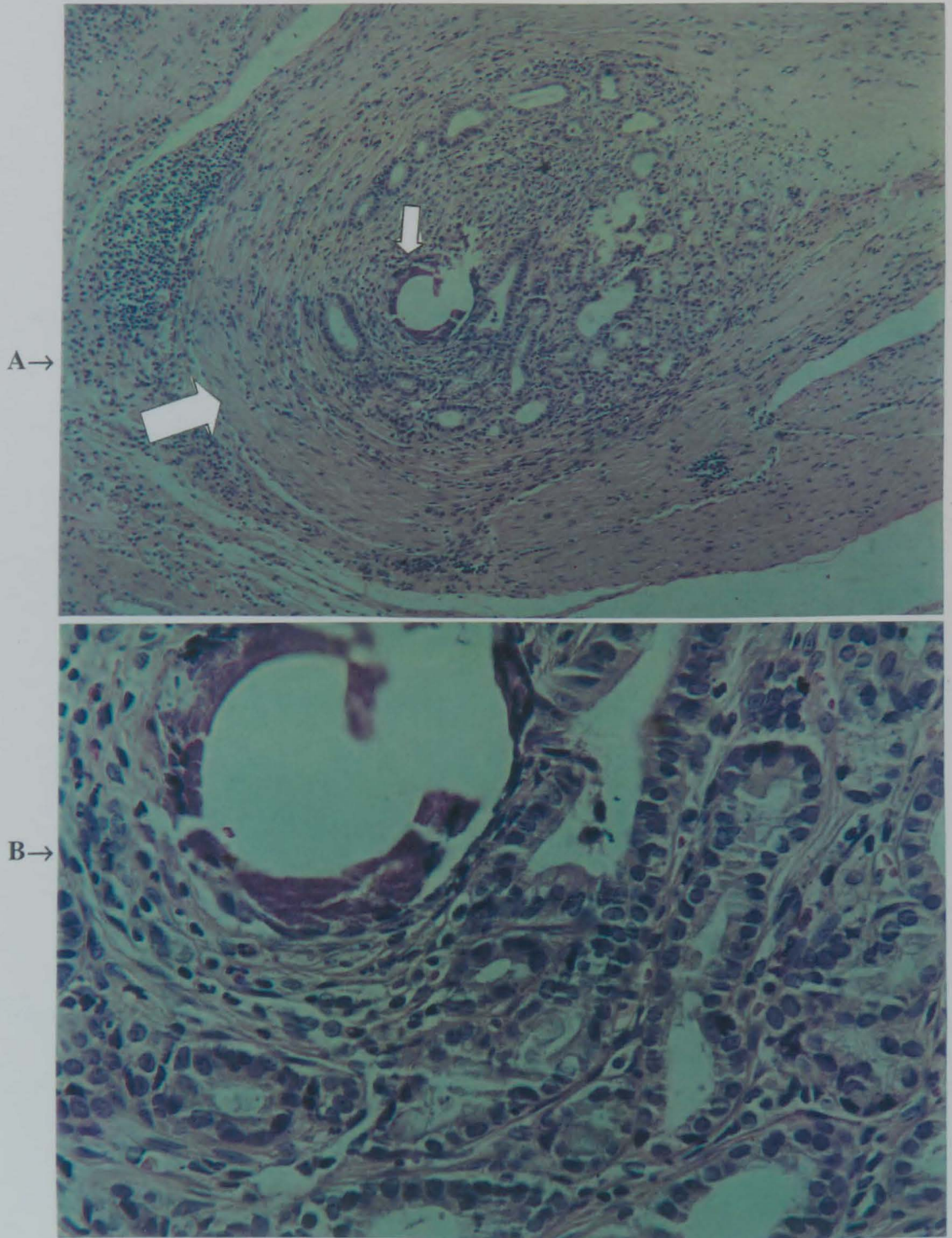


FIGURA 17: A (HE-100x) e B (HE-400x) Implantação mucosa e granuloma de corpo estranho (estágio 3), glândulas dentro da muscular, com padrão de fibrose concêntrica (seta maior) e granuloma (seta menor), rato 74, grupo IV

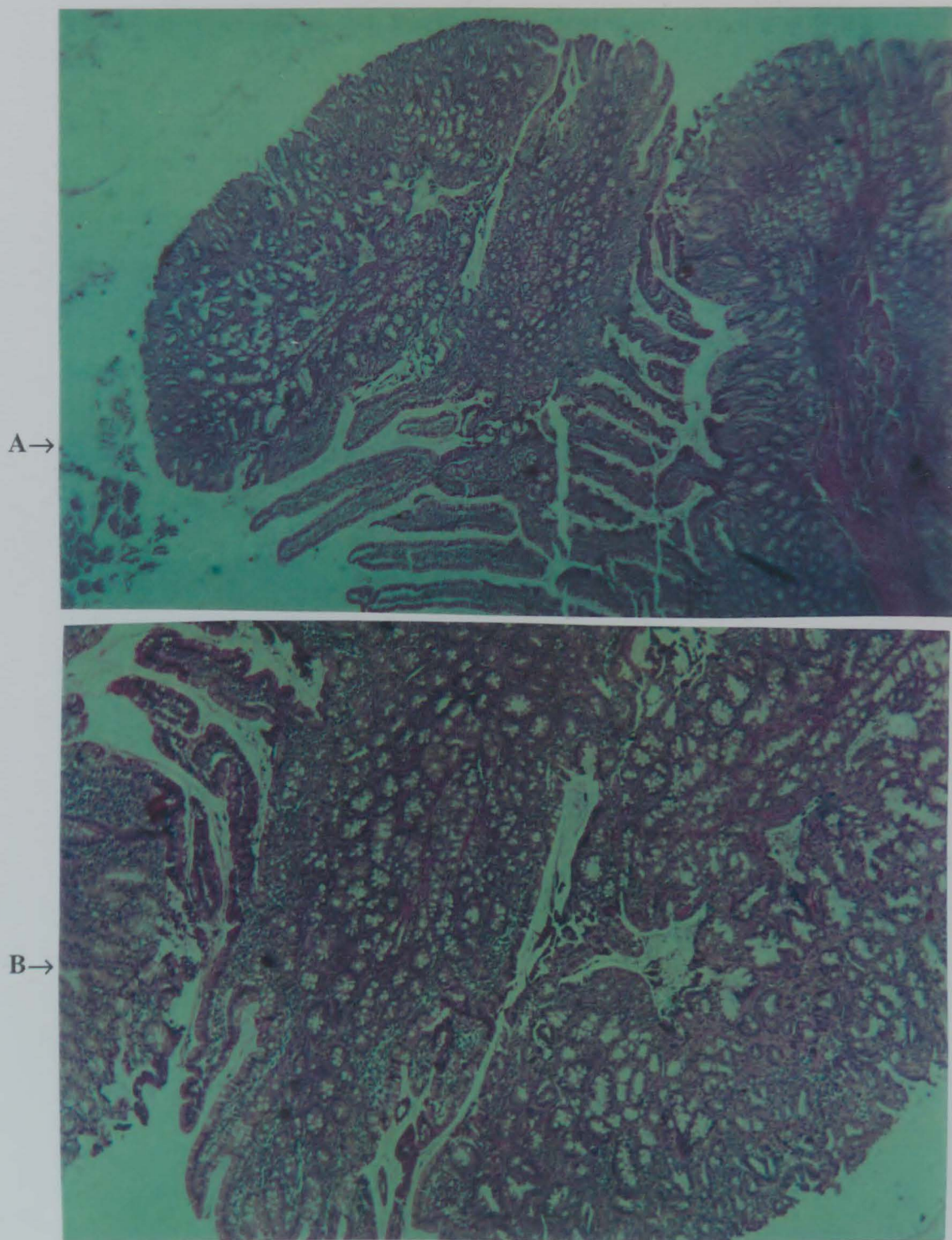
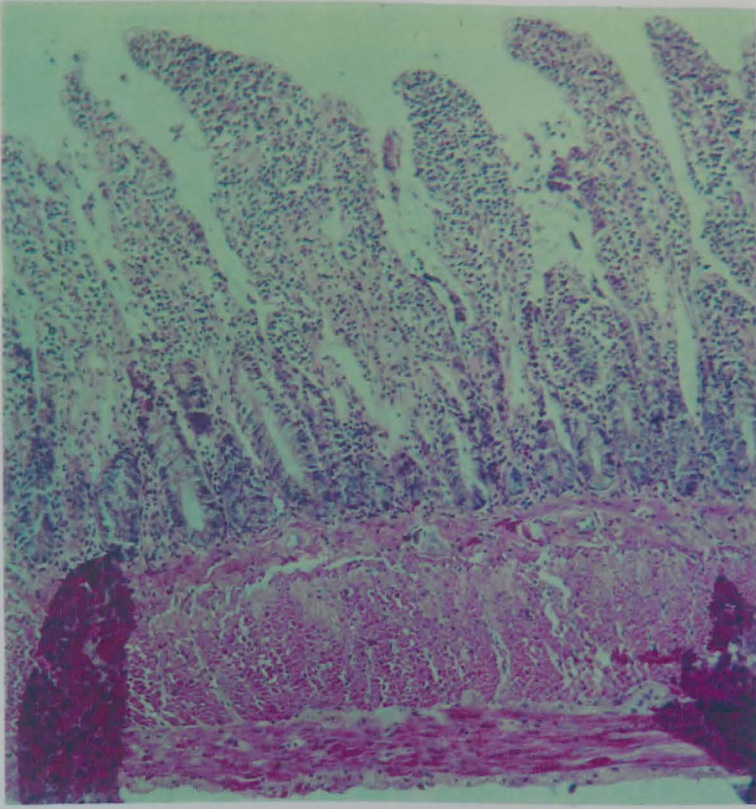


FIGURA 18 : A (HE-25x) e B (HE-50x): Adenoma (estágio 4), lesão polipóide com proliferação glandular e padrão de organização bem preservado, com poucas atypias celulares e sem invasão de tecidos, rato 64, grupo IV

A→



B→

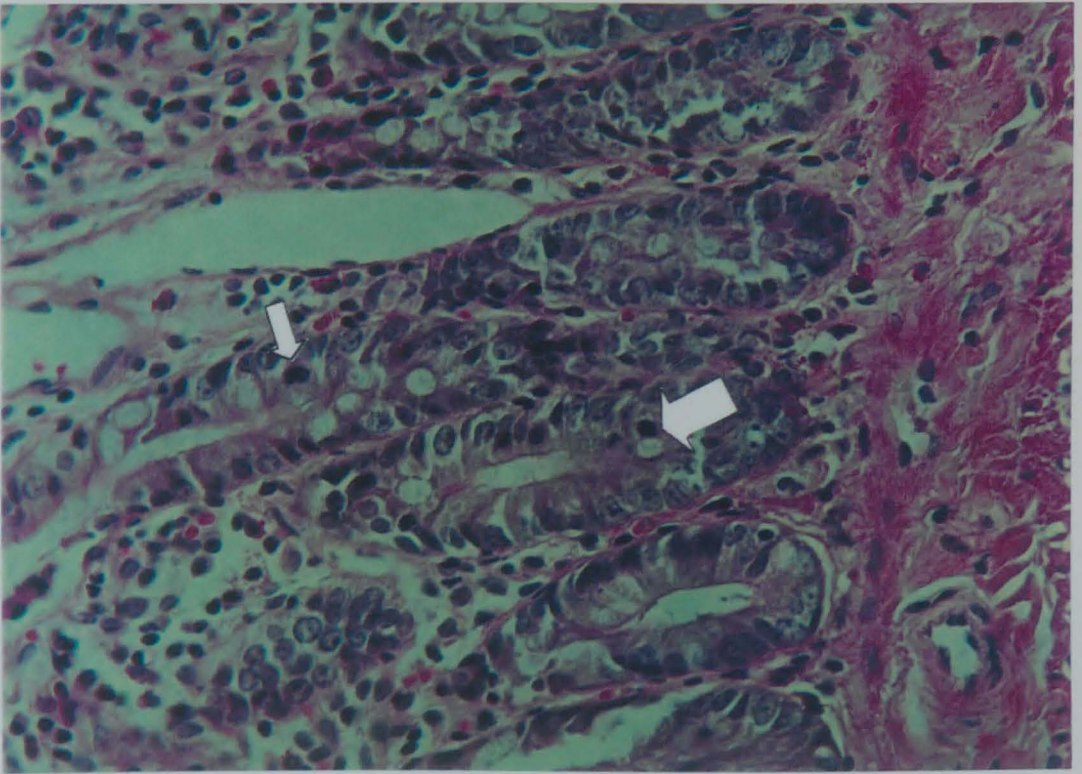


FIGURA 19: A (HE-100x) e B (HE-400x): Displasia de alto grau (estágio 5), proliferação glandular sem invasão de submucosa e com marcadas atipias celulares. Setas indicando núcleos mitóticos, rato 77, grupo IV

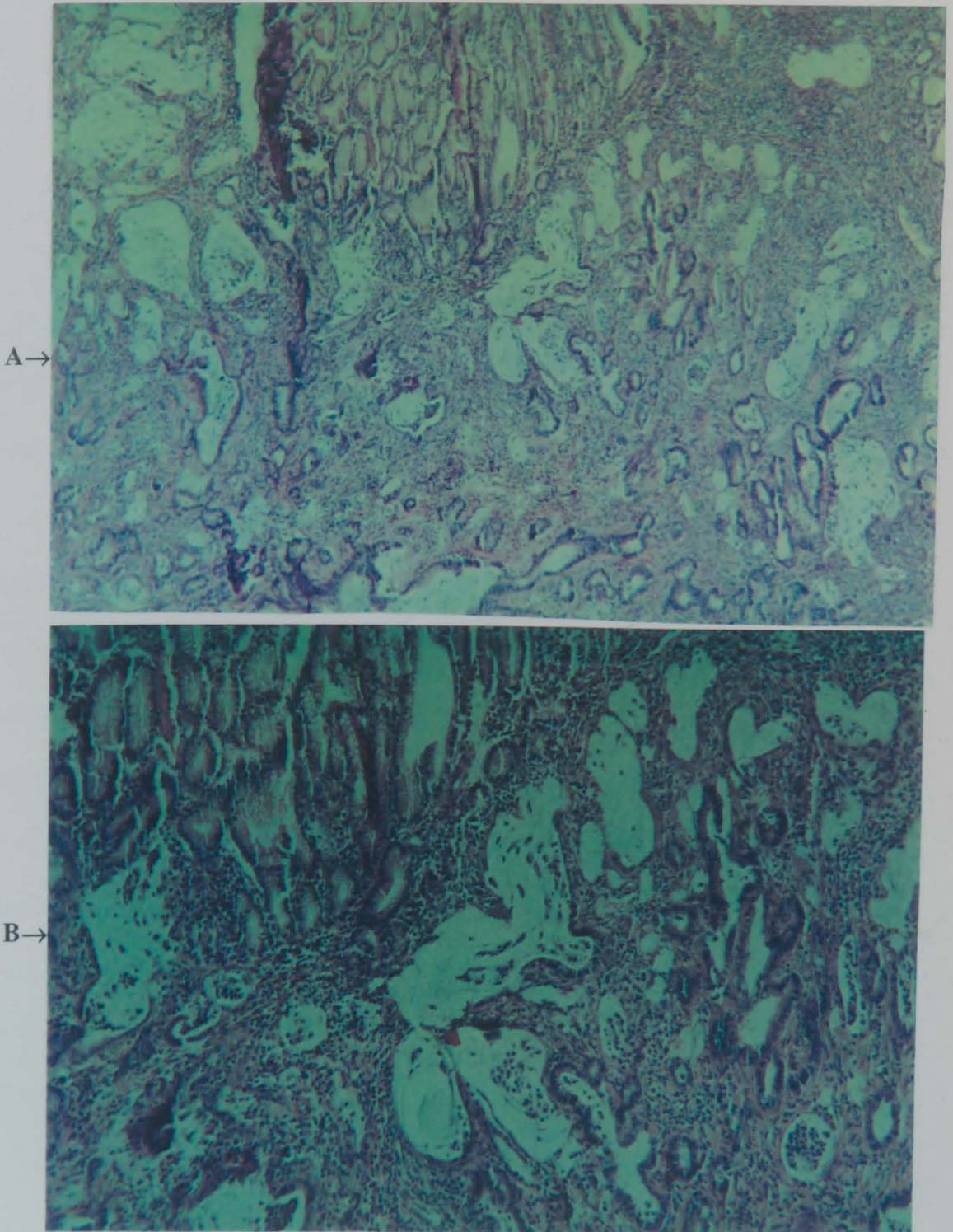


FIGURA 20: A (HE-50x) e B (HE-100x) Adenocarcinoma moderadamente diferenciado (estágio 6): glândulas com padrão arquitetônico pouco organizado com atipias celulares como hiperchromasia e pseudoestratificação nuclear, mitoses, e invasão da submucosa, rato 78, grupo IV

4.3 CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS BILIARES E pH

O valor do pH e a concentração de ácidos biliares no suco gástrico estão demonstrados nas Figuras 21 e 22 , respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa no valor do pH entre os grupos; a mediana foi 2.9 (grupo I), 2.6(grupo II), 3.2 (grupo III) e 2.6 (grupo IV). A concentração de ácidos biliares no suco gástrico foi significativamente maior no grupo IV (mediana 255 μ mol/l) em relação aos grupos I (22 μ mol/l) ($p=0.002$) e II (76.5 μ mol/l) ($p=0.01$). A Figura 23 demonstra a concentração dos ácidos biliares nos casos com tumores obstrutivos, ou não, nos diferentes grupos. No grupo III, a mediana da concentração dos ácidos biliares foi 59 μ mol/litro no geral. Analisando-se somente os casos com tumores, parcial ou totalmente obstrutivos, verifica-se que a mediana caiu para 25 μ mol/litro e nos casos sem obstrução , a mediana foi de 114 μ mol/litro.

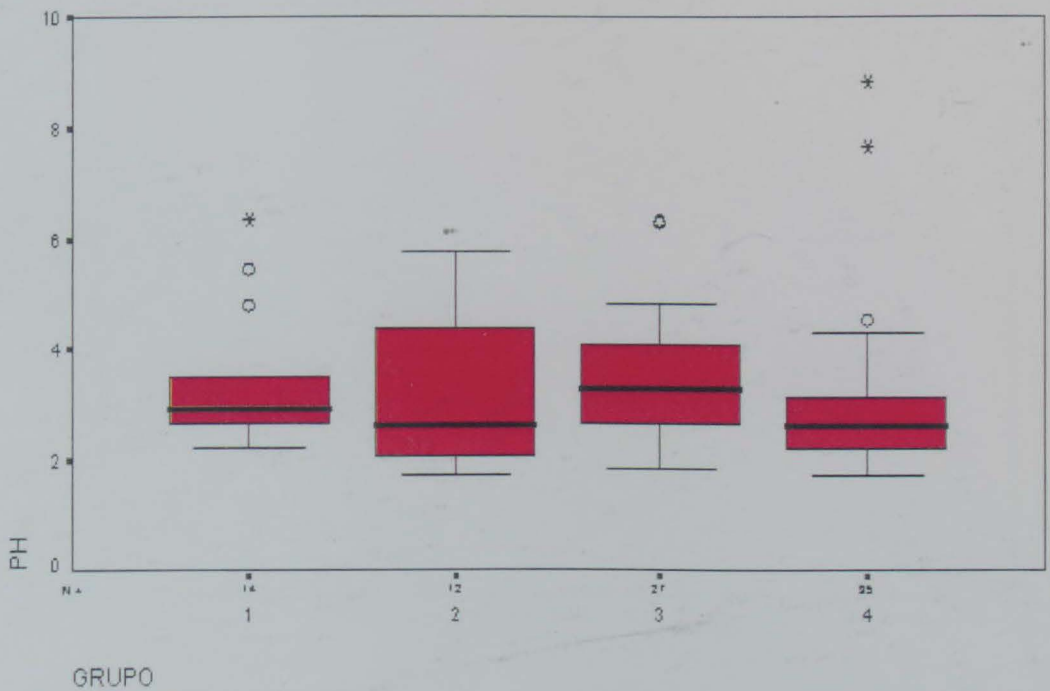


FIGURA 21: Gráfico de *BOX-PLOT*, comparando o valor do pH nos diferentes grupos. A mediana é representada pela linha horizontal central do *box* (em negrito) e os quartis inferior (P25) e superior (P75) pelas linhas inferior e superior que delimitam o *box*. Os valores mínimos e máximos são representados pelas linhas verticais que saem do *box* (whiskers) e os valores discrepantes estão assinalados por $^{\circ}$ e $*$. Não houve diferença significativa entre os grupos.

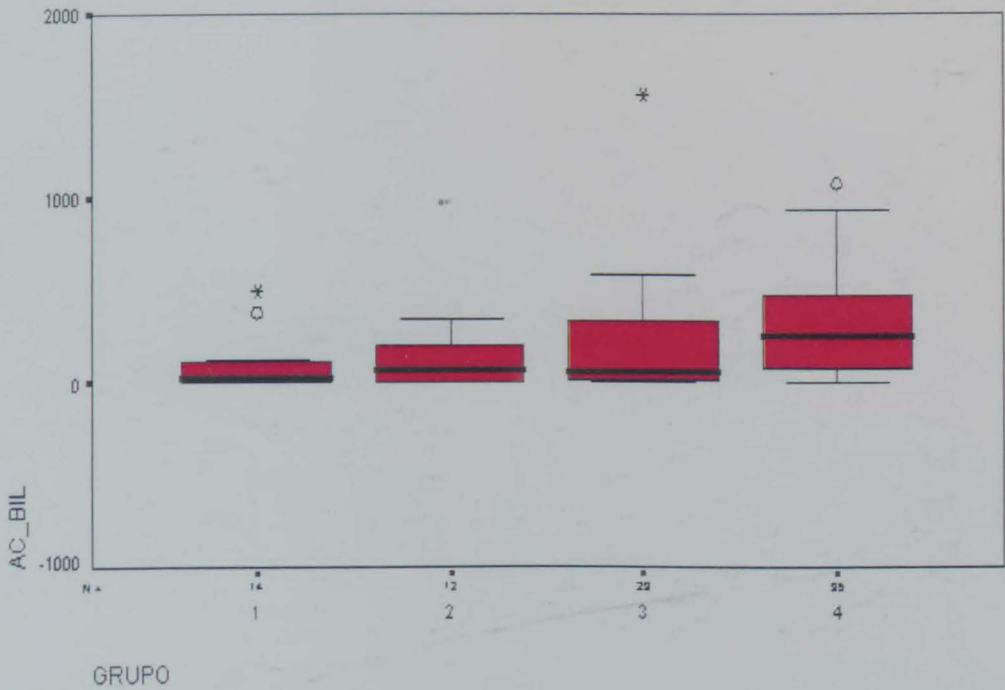


FIGURA 22: Gráfico de *BOX-PLOT*, comparando concentração de ácidos biliares nos diferentes grupos. A mediana é representada pela linha horizontal central do *box* (em negrito) e os quartis inferior (P25) e superior (P75) pelas linhas inferior e superior que delimitam o *box*. Os valores mínimo e máximo são representados pelas linhas que saem do *box* (whiskers) e os valores discrepantes são assinalados por ° e *.

Grupo IV > I e II, $p = 0.01$

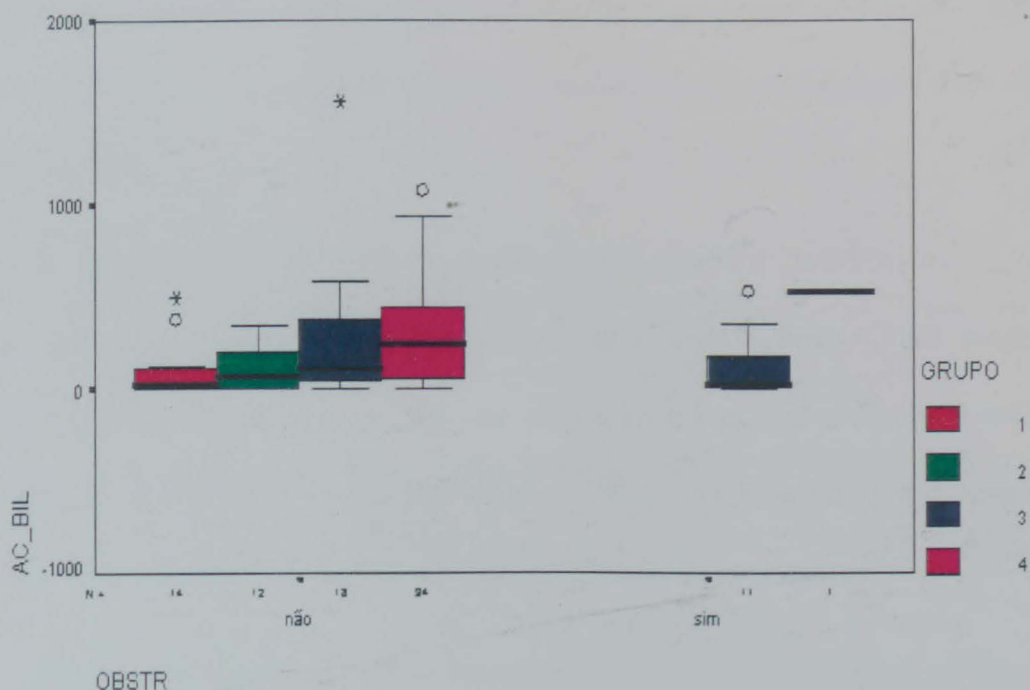


FIGURA 23: Gráfico de *BOX-PLOT*, comparando concentração de ácidos biliares nos ratos com ou sem tumores obstrutivos, nos diferentes grupos. A mediana é representada pela linha horizontal central do *box* (em negrito) e os quartis inferior (P25) e superior (P75) pelas linhas inferior e superior que delimitam o *box* caixa. Os valores mínimo e máximo são representados pelas linhas verticais que saem do *box* (whiskers) e os valores discrepantes são assinalados com ° e *. Grupo IV > I e II, $p=0.01$.

5 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo experimental de carcinogênese gástrica através de piloroplastia de Finney, analisar as concentrações de ácidos biliares e valor do pH e avaliar a influência da ingestão de nitrito de sódio nesse modelo.

A sensibilidade dos ratos à carcinogênese gástrica pelo MNNG é cepa dependente, com a cepa *Wistar* mais sensível e a cepa *Búfalo* mais resistente (BRALOW, 1972). Os ratos machos são mais sensíveis do que as fêmeas à indução de tumores pelo MNNG (FURUKAWA et al.,1979). Por estes motivos e , também, pela disponibilidade existente, foram utilizados ratos *Wistar* machos.

Existem evidências de que o carcinoma no estômago operado e o câncer no estômago virgem de cirurgia possuem processo carcinogênico semelhante , baseadas em aspectos clínicos, achados histopatológicos e alterações do gene *p53* comuns a ambos (SAFATLE-RIBEIRO et al.,1996). Estudos que avaliaram aspectos genéticos, biologia molecular e infecções em carcinomas de estômagos operados ou não, encontram diferença com relação à infecção por *H. pylori* e vírus Epstein-Barr, sugerindo que possam existir alguns fatores etiológicos diferentes (BASS et al.,1998; VAN REES et al.,1999). O estudo da carcinogênese no estômago operado e de seus fatores etiológicos pode levar a esclarecimentos sobre os mecanismos de desenvolvimento e progressão do câncer gástrico.

Revisando a literatura , verificou-se que têm sido utilizadas diferentes técnicas cirúrgicas na indução de cânceres gástricos . Técnicas com ressecção gástrica e reconstrução do trânsito gastrointestinal proporcionando refluxo duodeno-gástrico de várias intensidades, cujas incidências de adenocarcinoma variam até 71% e técnicas onde não é ressecado o estômago mas existe refluxo de conteúdo duodenal, a saber: gastroenteroanastomoses - 50 a 70% de câncer (LANGHANS,HEGER,STEGEMANN,1984; THEURING,DITTRICH, WOLTER, 1985; TAYLOR et al.,1991); refluxo através do piloro com secção do jejuno, fechamento do coto proximal e sutura do coto distal à grande curvatura gástrica - 30 à 40% de câncer (HASEGAWA,1991; MIWA et al., 1992b; MATSUMOTO,1994); piloroplastia tipo Heineke-Mikulicz com vagotomia troncular - 0 à 23% (LANGHANS, HEGER, STEGEMANN,1984; DITTRICH,SFFENER, SEIDEL,1988); piloroplastia tipo Heineke Mikulicz - 5,6% (LANGHANS, HEGER, STEGEMANN,1984). Outros dois estudos que avaliaram a piloroplastia tipo Heineke-Mikulicz associada ou não à vagotomia troncular e ao carcinógeno MNNG, não demonstraram efeito promotor destas cirurgias na carcinogênese gástrica (DOMELLOF et al.,1981; SALMON et al.,1982).

Neste estudo, realizou-se a piloroplastia pela técnica descrita por Finney, a qual consiste em uma anastomose entre o estômago e a primeira porção do duodeno, proporcionando uma ampla comunicação e, teoricamente, um grau de refluxo aumentado em relação à piloroplastia tipo Heineke-Mikulicz. Não encontramos, na literatura, nenhuma referência que houvesse utilizado esta técnica cirúrgica na indução de tumores gástricos. Em uma gastroenteroanastomose, o suco duodenal

passa necessariamente pela zona de anastomose para seguir o trânsito e na piloroplastia não existe esta obrigatoriedade. Portanto, poderíamos esperar que a incidência de carcinoma fosse menor na piloroplastia. Nesse estudo, a incidência de adenocarcinoma encontrada nos grupos submetidos à piloroplastia foi 55,1% no grupo III e 14,2% no grupo IV.

Os grupos controles usados nesses estudos experimentais têm sido constituídos de duas maneiras : ratos submetidos à laparotomia exploradora com manipulação de vísceras , *Sham's operation*, (THEURING, DITTRICH, WOLTER, 1985; DITTRICH, SEFFNER, SEIDEL, 1988; MIWA et al., 1994) e laparotomia com gastrotomia (MIWA et al., 1992a; MIWA et al., 1992b; MATSUMOTO, 1994). Em ambos os casos não se têm encontrado alterações significativas na mucosa gástrica. NISHIDOI, KOGA, KAIBARA (1984) utilizaram um grupo com gastrotomia e um controle, nos ratos que receberam o carcinógeno MNNG, o carcinoma se desenvolveu no estômago glandular longe da cicatriz de gastrotomia. TAYLOR et al. (1991) estudaram as alterações encontradas na gastroenteroanastomose e na gastrotomia sequencialmente em ratos sacrificados a cada oito semanas, pelo período de 56 semanas e encontraram adenocarcinoma nos ratos com gastroenteroanastomose com 32, 48 e 56 semanas. Analisando o índice de labilidade celular observaram proliferação celular aumentada na mucosa gástrica adjacente à anastomose quando comparada à zona próxima à cicatriz de gastrotomia e sugerem que o refluxo duodeno-gástrico está associado com 100% de aumento neste índice. Todos os tumores encontrados neste estudo estavam na zona da anastomose ou próximos a ela. Este achado coincide com os relatos da literatura de que as lesões induzidas

aparecem na área anastomótica, o que parece deixar clara uma relação com a cirurgia. No entanto, como referimos acima, somente a gastrotomia não induz lesão proliferativa ou câncer e nenhum autor encontrou esse tipo de lesão nos ratos onde foi feita reconstrução a Billroth II com alça em Y de Roux, o que sugere que a cirurgia não é estímulo suficiente, sendo necessária a presença do suco duodenal para o desenvolvimento de lesões proliferativas.

Os critérios histológicos para o diagnóstico das lesões na zona cicatricial da anastomose precisam ser bem definidos. As características anatômicas de arquitetura da parede gástrica e duodenal são destruídas pela secção cirúrgica, nesse processo é destruída a camada muscular da mucosa, uma das referências para o critério de invasão epitelial (KOBAYASI et al.,1994). Alguns autores têm considerado somente os critérios de invasão de submucosa ou muscular para definir como adenocarcinoma a proliferação glandular excessiva (NISHIDOI , KOGA, KAIBARA,1984). Outros, consideram absolutamente necessários padrões rígidos, baseados em critérios citológicos, para diferenciar as distopias intramucosas causadas pelo traumatismo cirúrgico dos carcinomas genuínos (TAYLOR et al., 1991; KONDO et al.,1995). Neste estudo, a proliferação glandular , sem atipias celulares, na zona de anastomose, não foi usada para decidir sobre a malignidade das lesões. KOBAYASI et al. (1991) definem a invaginação de mucosa glandular para dentro da submucosa, subserosa ou muscular, na zona de anastomose, como “ mucosa implantada”. TAYLOR et al.(1991), denominam essa invaginação de glândulas como “Downward glandular growth”. Nos casos em que ocorreu essa invaginação de glândulas para baixo da muscular, havia uma padrão de fibrose concêntrica ao redor da mucosa com tecido

cicatricial e, invariavelmente, granuloma de corpo estranho; esses casos foram classificados como estágio 3.

Padrão semelhante na zona de anastomose foi descrito por SCHLAKE & NOMURA (1979) analisando o estômago de ratos submetidos à ressecção a BI. É destes autores, também, a descrição de que o carcinoma do estômago do rato se desenvolve através de duas diferentes vias: o crescimento circular de adenocarcinoma, em um pólipó adenomatoso perianastomótico, que tem como precursor o adenoma; o crescimento de adenocarcinoma orientado para a serosa, que tem como precursor a proliferação adenocística intramural. Todos os adenocarcinomas encontrados neste experimento apresentavam características polipóides com crescimento exofítico, infiltrando a parede gástrica, mas nenhum chegava até a serosa. No grupo IV, somente em 5 ratos foi encontrado adenocarcinoma mas, considerando-se as vias de desenvolvimento de câncer no estômago operado de ratos, descritas por SCHLAKE & NOMURA (1979), os 5 adenomas e um caso de displasia de alto grau poderiam ser classificados como lesões pré-malignas.

A dosagem do pH e da concentração de ácidos biliares foi utilizada para que se pudesse avaliar se o modelo produziu, na prática, o refluxo duodeno-gástrico esperado. A concentração total de ácidos biliares no conteúdo gástrico dos ratos do grupo IV foi significativamente maior do que no grupo I e II ($p=0.002$; $p=0.01$), confirmando a ocorrência de refluxo duodeno-gástrico (Figura 22). No grupo III, embora a concentração de ácidos biliares tenha sido alta, não houve diferença estatisticamente significativa para com os grupos controles (I e II). No grupo III,

37,9% dos ratos apresentaram tumores total ou parcialmente obstrutivos, o que pode ter dificultado e diminuído o refluxo no momento da coleta de suco gástrico (Tabela 1). Comparando as concentrações de ácidos biliares no conteúdo gástrico dos ratos do grupo III onde havia tumores obstrutivos e tumores não obstrutivos ou outras alterações foram encontradas concentrações mais altas nestes últimos (Figura 23) Com medidas seriadas dos ácidos biliares, durante o desenvolvimento do experimento, provavelmente seriam encontrados valores elevados em estágios mais precoces, quando ainda não se haviam desenvolvido os tumores. A mediana do valor de pH variou de 2,9 à 3,2 e não foi observada diferença significativa entre os grupos. Embora no grupo III, onde houve a maior incidência de carcinoma, tenha se encontrado a maior mediana (3.2), não houve diferença entre o pH gástrico dos ratos que desenvolveram adenocarcinoma e os que não desenvolveram alterações malignas, o que está de acordo com a literatura. NISHIDOI, KOGA, KAIBARA, (1984) ao estudarem ratos operados com ressecção gástrica e reconstrução a BII e Y de Roux, encontraram valores médios de pH de 5.1 e 4.4 respectivamente, valores significativamente diferentes do grupo controle (pH=2.6). No entanto, não mostraram evidências de que os ratos com câncer tinham pH mais alto do que os ratos sem neoplasia em cada grupo. MASON (1986) no experimento onde estudou os refluxos biliar e pancreático duodenal isolados e combinados no estômago ressecado, não encontrou diferença significativa entre o pH gástrico dos ratos que desenvolveram adenocarcinoma e dos que não desenvolveram alterações malignas. MIWA et al. (1992a; 1992b), no seu modelo, estudando os refluxos biliar e pancreático duodenal isolados e combinados no estômago não ressecado, encontraram um pH médio de 3.2 à 3.8, significativamente

diferente do pH médio do grupo controle (2.6), concluindo que nesse modelo, a teoria da formação de compostos nitrosos, a partir da diminuição da acidez gástrica, proliferação bacteriana e redução de nitratos para nitritos pelas bactérias, não foi comprovada porque o pH médio de 3.2 pressupõe um microambiente gástrico estéril.

Embora a proliferação de bactérias redutoras de nitritos possa ser quantificada , não foi objetivo deste estudo avaliar estes degraus da hipótese de CORREA pois oferecemos o agente nitrosante (nitrito de sódio) na água de beber.

A indução de tumores pelo nitrito de sódio (NaNO_2) poderia ser causada pela nitrosação *in vivo* de amins ou amidas. A nitrosação de amins é proporcional à concentração de nitritos e , portanto, a concentração pode ser crítica na avaliação da carcinogenicidade. A dose letal para 50% dos ratos (LD50) é de 180 mg /kg/peso e a metahemoglobinemia é usada como índice de toxicidade (GANGOLLI, et al.,1994). Utilizamos a concentração máxima de NaNO_2 tolerada pelo rato , 3 g/l, conforme descrito por MIRVISH et al.(1980) e não observamos metahemoglobinemia.

Os trabalhos que estudaram a carcinogênese experimental dos nitritos apresentam resultados controversos. WEISBURGER et al.(1980) conseguiram induzir carcinoma epidermóide no pré-estômago e adenocarcinoma (16,6%) no estômago glandular após 18 meses do uso de extratos de peixes tratados com nitritos, em ratos *Wistar*. MIRVISH et al. (1980) conseguiram induzir papilomas no pré-estômago de 18% dos ratos MRC *Wistar* usando NaNO_2 na água de beber durante toda a vida. DITTRICH, SEFFNER & SEIDEL (1988), utilizando nitrato de sódio na água de beber em ratos F1 híbridos submetidos à gastroenterostomia, vagotomia troncular com piloroplastia tipo Heineke Mikulicz e Sham laparotomia, por 33

semanas, não encontraram diferença entre os grupos que receberam nitrato e os que não o receberam . HIROSE et al. (1993), utilizando NaNO_2 3g/l na água de beber durante 28 semanas, associado a antioxidantes fenólicos e carcinógenos, demonstraram aumento na proliferação celular e um efeito promotor fraco da carcinogênese no pré-estômago de ratos e uma diminuição significativa nas lesões induzidas por catecol, no estômago glandular. KAWABE et al.(1994) , demonstraram que o NaNO_2 , na dose de 2g/l durante 52 semanas, aumentou a proliferação celular e a hiperplasia do pré-estômago e estômago glandular de ratos causada pelo catecol. Neste modelo, o nitrito de sódio oferecido na água de beber não induziu desenvolvimento de adenocarcinoma de estômago dos ratos operados com laparotomia. ANDREOLLO et al.(1995) encontraram carcinoma em 5,6% dos ratos operados com gastrojejunostomia ou gastrectomia com ressecção a BII associadas à vagotomia troncular, acompanhados por 8 meses, e que receberam nitrito de potássio na água de beber. Em extensa revisão sobre nitritos, nitratos e compostos nitrosos, GANGOLLI et al. (1994) concluíram que não existem evidências nos estudos experimentais de que o nitrito seja carcinógeno para animais.

Ao compararmos o grupo III e o grupo IV , que só diferem no desenho experimental devido à ingesta de nitrito de sódio na água de beber, observamos que houve diferença significativa nos achados histológicos. O grupo que recebeu nitrito de sódio (IV) teve uma incidência menor de adenocarcinoma (estágio 6) e maior de alterações pré-malignas como adenomas e displasia (estágio 4 e 5). Parece que o nitrito não potencializou a carcinogênese induzida pelo refluxo duodeno-gástrico ou,

então, prolongou o processo carcinogênico e o tempo de seguimento do experimento não foi suficiente para desenvolvimento de adenocarcinoma no grupo IV. No microambiente gástrico, em ratos, com pH abaixo de 5, o nitrito desaparece rapidamente e sua destruição é acelerada pela presença de alimento (MIRVISH et al.,1975). Por outro lado, sabe-se que para o nitrito ser um agente nitrosante, ele precisa ser acidificado para formar HNO_2 (MIRVISH,1995). Além disto, o rato é capaz de sintetizar o ácido L-ascórbico, o qual sabemos ser efetivo em bloquear a nitrosação intragástrica (OTSUKA et al.,1992). Talvez, nesse experimento, o nitrito tenha sido eliminado antes de poder interagir com os ácidos biliares. Não foi dosada a excreção urinária de nitritos e a concentração de compostos nitrosados no suco gástrico, mas parece não ter ocorrido nitrosação intragástrica nesse modelo.

O refluxo duodeno-gástrico induzido através de piloroplastia de Finney, teve efeito carcinogênico no estômago glandular dos ratos. A composição do conteúdo refluído pode ser a chave para explicar esse efeito. As enzimas pancreáticas podem lesar a barreira da mucosa gástrica, deixando as células expostas para potenciais carcinógenos. Antes da secreção no trato biliar, 98% dos ácidos biliares são conjugados com taurina e glicina, o que aumenta a solubilidade dos mesmos. Os ácidos biliares solúveis podem entrar nas células da mucosa quando estão em sua forma lipofílica não ionizada, isto é, em um pH entre 2 e 5. Estudos mostram que o acúmulo intracelular de ácidos biliares é dirigido pelo gradiente de pH entre o meio ácido luminal e o meio neutro citoplasmático, ou seja, o acúmulo intracelular é maior e ocorre mais rapidamente no pH mais ácido (STEIN et al.,1999). Contraditoriamente, WETSCHER et al. (1999) mostram que o bloqueio da acidez

gástrica com omeprazol, em ratos operados com gastroenteroanastomose e cardioplastia, potencializa o efeito carcinogênico do RDG no estômago e promove a proliferação celular na mucosa esofágica; DeMEESTER et al.(1996) mostram que a acidez gástrica modula a indução de adenocarcinoma esofágico em ratos; quando o refluxo de suco gástrico ácido para o esôfago diminui, aumenta a incidência de adenocarcinoma.

Existem evidências de dano molecular causado pela bile, através da quebra de DNA, aumento da proliferação celular medido pela citometria de fluxo e pelo antígeno de proliferação nuclear, alterações na apoptose celular, e de dano tecidual através da diminuição na atividade da enzima anidrase carbônica, que é uma enzima protetora celular presente em alta concentração na mucosa gástrica normal (KIVILAAKSO,1982; CHEAH & BERNSTEIN,1990; ATTWOOD et al., 1991; BYRNE & ATTWOOD,1999).

6 CONCLUSÕES

Ao finalizar o experimento conclui-se que:

- 6.1 a cirurgia piloroplastia de Finney , sem a necessidade de carcinógeno externo, é um modelo experimental adequado de carcinogênese gástrica em ratos *Wistar*;
- 6.2 a piloroplastia de Finney causou refluxo duodeno-gástrico;
- 6.3 o refluxo duodeno-gástrico atuou como carcinógeno para o estômago;
- 6.4 não houve relação entre o pH gástrico dos ratos e o desenvolvimento de adenocarcinoma, neste experimento;
- 6.5 o nitrito de sódio não atuou como carcinógeno para o estômago dos ratos, neste experimento.

7 PERSPECTIVAS

A partir da revisão da literatura, verifica-se que o processo de carcinogênese gástrica envolve múltiplos fatores que ainda não estão totalmente esclarecidos e entendidos. Muito, ainda, precisa ser estudado. Com base neste modelo experimental de carcinogênese gástrica podem-se estudar vários aspectos, a saber:

- fatores moduladores da carcinogênese, protetores ou promotores;
- aspectos da biologia molecular do câncer gástrico como: mutações nos genes *p53*, *c-met*, *CD44*, expressão das cadherinas, expressão da enzima telomerase e avaliação da aneuploidia do DNA ;
- o conteúdo do suco duodenal e qual(uais) componente(s) pode(m) estar induzindo o câncer;
- o potencial efeito nocivo dos ácidos biliares para mucosa gástrica e esofágica , modulados por um dieta rica em gorduras;
- utilização dos espécimes deste estudo para análise. através de métodos histoquímicos, da atividade da enzima sintetase do óxido nítrico com objetivo de avaliar se ocorreu nitrosação intramucosa e o índice de “stress oxidativo ” dos tecidos neoplásicos e áreas adjacentes.

ANEXO A: Purina ® - Animais de Laboratório- Descrição do Manual

Alimentos Purina ® para animais de laboratório

Manual para Bioteristas e Pesquisadores

Alimento utilizado: Labina

Alimentação para fêmeas em crescimento: 12-15g/dia de ração

Consumo de água *Ad libitum*

Início de uso de ração: pode ser utilizada a partir de 12 dias de vida

Labina: Fórmula constante, específica para camundongos, ratos e hamsters

ANEXO B: Nitrito de Sódio (No.CAS 632-00-0) BASF Akt engesellschaft

NaNO₂ – nitrito de sódio - 99,1%

NaNO₃ - 0,7%

NaCl - 0,02%

H₂O - 0,3%

Ponto de fusão/intervalo de fusão: 280°C

Ponto de inflamação: incombustível

Solubilidade em água: (20°C) 818 g/l (água)

ANEXO C: Zoletil ® 50 - Virbac do Brasil Ind. e Com. LTDA.

Cloridrato de Tiletamina.....125mg

Cloridrato de Zolazepam.....125mg

Solução de Zoletil 50 apresenta concentração de 50 mg/ml

Via de administração: injetável, por via intramuscular e endovenosa.

Dose recomendada para Rattus spp.....50mg/kg IM

ANEXO D: Descrição dos fios utilizados nas cirurgias

Fio Prolene 7-0
M8702
2 shine – 1,0 cm – BV – 1 Master
Cardiovascular
Polipropileno azul
Monofilamento
N.Abs.
60 cm
ETHICON ®

Fio Mononylon 5-0
15501
Ethipoint – 2,5 cm – CP – 25
Cuticular
Nylon Preto/Negro
Monofilamento
N.Abs.
45 cm
ETHICON ®

Fio Catgut Cromado 5-0
N°1.1555.005.001-4
205722 – 75cm – Mr 20mm – ½ circ.
Point Suture do Brasil
Indústria de Fios Cirúrgicos

ANEXO E: Bile acids (procedure No. 450)- SIGMA DIAGNOSTICS ®

KIT

Catalog. No. 405-A**Contents – catalog Numbers**

Bile Acids Reagent A, 450-1	16x10ml
Bile Acids Reagent B, 450-2	4x5ml

Other required reagents**Catalog. No.** 450-100

Bile Acids calibrator, 100 micromol/L	5ml
---------------------------------------	-----

Catalog. No. 450-3

Bile Acids stop reagent	50ml
-------------------------	------

Optional reagents**Catalog. No.** 450-1-50

Bile Acids reagent A	50ml
----------------------	------

Catalog. No. 450-2-25

Bile Acids reagent B	25ml
----------------------	------

ANEXO F: Descrição Macroscópica dos espécimes

Rato No..... grupo caixa fotos ()sim ()não

Achados no esôfago: () sim () não

.... lesões, sendo:

..... ulceradas

..... vegetantes

..... outras:.....

observações:.....

Achados no pré-estômago: () sim () não

....lesões, sendo:

..... ulceradas

..... vegetantes

..... outras:.....

observações:.....

Achados no estômago : () sim () não

.... lesões,sendo:

..... ulceradas

..... vegetantes

..... polipóides: () até 1 cm

() > 1 cm

() > 1,5 cm

() > 2 cm

..... outras:.....

observações:.....

Achados no duodeno : () sim () não

.....lesões, sendo:

..... ulceradas

..... vegetantes

..... outras:.....

observações:.....

Outras observações pertinentes, em relação ao espécime examinado:.....

.....

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M.; CIUDAD, J.; RINCON, M.R.; SILVA, I.; PAZ-BOUZA, J.I.; LOPEZ, A.; ALONSO, A.G.; BULLON, A.; ORFAO, A. DNA aneuploidy by flow cytometry is an independent prognostic factor in gastric cancer. **Anal. Cell. Pathol.**, v.16, n.4, p.223-31,1998.

ANDREICA, V.; DUMITRASCU, D.; SUCIU, A.; SENDREA, D.; ERDOSY, S.; DRAGHICI, A.; PASCU, O.; PARAU, N.; GALU, A. Contributions study of gastric carcinogenesis. **R. Roam. Méd. Int.**, v.25, p.15-24,1987.

ANDREOLLO, N.A. Contribuição à etiopatogenia do câncer do coto gástrico: estudo experimental. Campinas,1994. 173p [Tese- Livre Docente. Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas.]

ANDREOLLO, N.A; BRANDALISE,N.A.; LOPES,L.R.; LEONARDI,L.S.; ALCANTARA,F. Are the nitrites and nitrates responsible for the carcinoma in the operated stomach ? **Acta Cir. Bras.**, v.10, n.3, p.103-6, 1995.

ATTWOOD, S.E.A.; MURPHY, J.; MURPHY, B.; STELE, P.; DEMEESTER, T.R.; MIRVISH, S.S.; HINDER, R.A. Effect of duodenal juice on DNA index and cell proliferation in a model of oesophageal carcinoma. **Br. J. Surg.**, v.78, n.6, p.754, 1991.

- BARTSCH, H.; FRANK, N. Blocking the endogenous formation of *N*-nitroso compounds and related carcinogens. **IARC Sci Publ.**, v.139, p.189-201, 1996.
- BARTSCH, H.; OHSHIMA, H.; PIGNATELLI, B.; CALMELS, S. Human exposure to endogenous *N*-nitroso compounds: quantitative estimates in subjects at high risk for cancer of the oral cavity, oesophagus, stomach and urinary bladder. **Cancer Surv.**, v.8, p.335-62, 1989.
- BASS, I.O.; VAN REES, B.P.; MÜSLER, A.; CRAANEN, M.E.; TYTGAT, G.N.; VAN DEN BERG, F.M.; OFFERHAUS, G.J. *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infection and the *p53* tumour suppressor pathway in gastric stump cancer compared with carcinoma in the non-operated stomach. **J. Clin. Pathol.**, v.51, n.9, p.662-6, 1998.
- BERGER, Z.; GIL, L.C.; LATORRE, R.; MADRID, A.M.; MAIZA, E.; OKSENBERG, R.; PIMENTEL, C.; BRAHM, J. Duodenogastric reflux. **Rev Méd Chile**, v.127, p.243-5, 1999.
- BONAVINA, L.; INCARBONE, R.; SEGALIN, A.; CHELLA, B.; PERACCHIA, A. Duodeno-gastro-esophageal reflux after gastric surgery: surgical therapy and outcome in 42 consecutive patients. **Hepatogastroenterology**, v.46, n.25, p.92-6, 1999.

BOTTERWECK, A.A.M.; VAN LOON, A.J.M. ; GOLDBOHM, R.A.; BRANTS, H.A.M.; VAN KLAVEREN, J. D.; VAN DER BRANDT, P.A. Intake of nitrate and nitrite and the risk of gastric cancer: a prospective cohort study. **Br. J. Cancer**, v.78, n.1, p. 129-35, 1998.

BRALOW, S.P. Experimental gastric carcinogenesis. **Digestion**, v.5, p.290-310, 1972.

BRASIL. Ministério da Saúde. Informações de Saúde Mortalidade. Disponível na Internet: www.datasus.gov.br

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de Incidência e Mortalidade por câncer no Brasil para 1999. Rio de Janeiro. INCA, 1999.

BUGSY, W.F.; SCHUKER, D.E.G.; CHARNLEY, G.; NEWBERNE, P.M.; TANNENBAUM, S.S.R.; WOGAN, G.N. Carcinogenicity in rats of the nitrosated bile acid conjugates N-Nitrosoglycocholic acid and N-Nitrotaurocholic acid. **Cancer Res.**, v. 45, p.1367-71, 1985.

BYRNE, J.P.; ATTWOOD, S.E. Duodenogastric reflux and cancer. **Hepatogastroenterology**, v 46, n.25, p.74-85, 1999.

CAYGILL, C.P.J.; LEACH, S.A.; KIRKHAM, J.S.; NORTHFIELD, T.C.; HALL, C.N.; HILL, M.J. Gastric hypoacidity as a risk factor for gastric and other cancers. **IARC Sci Publ.**, v 84, 1987.

CHEAH, P.Y.; BERNSTEIN, H. Modification of DNA by bile acids: a possible factor in the etiology of colon cancer. **Cancer Let.**, v 49, n.3, p.207-10, 1990.

COLEMAN, M.P.; ESTÈVE, J.; DAMIEKI, P.; ARSLAN, A.; RENARD, H. Trends in Cancer incidence and mortality. **IARC Sci Publ.**, v. 121, p.193-224, 1993.

CORREA, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. **Cancer Res.**, v 52, p. 6735-40, 1992.

CORREA, P.; SHIAO, Y. Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.54, p.1941-43, 1994.

CORREA, P.; HAENSZEK, W.; CUELLO, C.; TANNENBAUM, S.; ARCHER, M. A model for gastric cancer epidemiology. **The Lancet**, v.2, p.58-60, 1975.

DeMEESTER, T.R.; FUCHS, K.H.; BALL, C.S.D.; ALBERTUCCI, M.; SMYRK, T.C.; MARCUS, J.N. Experimental and clinical results with proximal end-to-end duodenojejunostomy for pathologic duodenogastric reflux. **Ann. Surg.**, v.206, p.414-24, 1987.

DeMEESTER, T.R.; ATTWOOD, S.E.A.; SMYRK, T.C.; MIRVISH, S.S.; STEIN, H.J.; HINDER, R.A. Duodeno-esophageal reflux and the development of esophageal adenocarcinoma in rats. **Surgery**, v.111, n.5, p.503-10, 1992.

- DeMEESTER, T.R.; IRELAND, A.P.; PETERS, J.H.; SMYRK, T.C.; CLARK, G.W.B.; MIRVISH, S.S.; ADRIAN, T.E. Gastric juice protects against the development of esophageal adenocarcinoma in the rat. *Ann. Surg.*, v.224, n.3, p.358-71, 1996.
- DITTRICH, S.; SEFFNER, W.; SEIDEL, R. Einflub von nitrat und ascorbinsäure auf die Karzinogenese im operierten rattenmagen. *Arch. Geschwulstforsch*, v.58, n.4, p.235-242, 1988.
- DOMELLÖF, L.; ERIKSSON, S.; MORI, H.; WEISBURGER, J.H.; WILLIAMS, G.M. Effect of bile acid gavage or vagotomy and pyloroplasty on gastrointestinal carcinogenesis. *Am. J. Surg.*, v.142, p.551-4, 1981.
- FAUSA, O.; SKALHEGG, B.A. Quantitative determination of bile acids and their conjugates using thin-layer chromatography and a purified 3 alfa-hydroxysteroid dehydrogenase. *Scand. J. Gastroenterol.*, v.9. p.249-54, 1974.
- FEIN, M.; PETERS, J.H.; CHANDRASOMA, P.; IRELAND, A.P.; OBERG, S.; RITTER, M.P.; BREMNER, C.G.; HAGEN, J.A.; DeMEESTER, T.R. Duodeno-esophageal reflux induces esophageal adenocarcinoma without exogenous carcinogen. *J. Gastrointest. Surg.*, v.2, n.3, p.260-8. 1998.
- FENOGLIO-PREISER, C.M.; NOFFSINGER, A.E.; BELLI, J.; STEMMERMANN, G.N. Pathologic and phenotypic features of gastric cancer. *Sem. Oncol.*, v.23, n.3, p. 292-306, 1996.

- FORMAN, D. The etiology of gastric cancer. **IARC Sci Publ.**, v.105, p.22-32, 1991.
- FUJIMURA, T. Effects of reflux of bile and/or pancreaticoduodenal juice on gastric carcinogenesis in rats. **Nippon Geka Gakkai Zasshi**, v.92, n.8, p.933-9, 1991.
- FURUKAWA, H.; IWANAGA, T.; ISHIKAWA, O.; KABUTO, T.; FUKUDA, I.; MATSUI, Y.; KOYAMA, H.; TANIGUCHI, K.; AOKI, Y.; TERASAWA, T.; TANIGUCHI, H. Effect of sex hormones on experimental gastric cancer. ANNUAL MEETING OF JAPAN CANCER ASSOCIATION, 38, 1979. **Proceedings...** p.57
- GANGOLLI, S.D.; VAN DEN BRANDT, P.A.; FERON, V.J.; JANZOWSKY, C.; KOEMAN, J.H.; SPEIJERS, G.J.; SPIEGELHALDER, B.; WALKER, R.; WISHNOK, J.S. Nitrate, nitrite and *N*-nitroso compounds. **Eur. J. Pharmacol.**, v.292, p.1-38, 1994.
- GIRELLI, C.M.; CUVELLO, P., LIMIDO, E.; ROCCA, F. Duodenogastric reflux: an update. **Am. J. Gastroenterol.**, v.91, n.4, p.1648-53, 1996.
- GOLDIM, J.R. **Pesquisa em saúde**; leis, normas e diretrizes. Porto Alegre, HCPA, 1995. 68p.
- GOWEN, G.F. Spontaneous enterogastric reflux gastritis and esophagitis. **Ann. Surg.**, v.201, p.170-5, 1985.

GUADAGNI, S.; WALTERS, C.L.; SMITH, P.L.R.; VERZARO, R.; VALENTI, M.; REED, P.I. *N*-nitroso compounds in the gastric juice of normal controls, patients with partial gastrectomies, and gastric cancer patients. **J. Surg. Oncol.**, v.63, p.226-33, 1996.

GUADAGNI, S.; PISTOIA, M.A.; AMICUCCI, G.; LEOCATA, P.; VENTURA, L.; VENTURA, T.; CHIOMINTO, A.; DERACO, M. VAGLINI, M. *N*-nitroso compounds and *Helicobacter pylori* in the gastric remnant. **Tumori**, v.85, n.2, p. 108-12, 1999.

HASEGAWA, H. Duodenogastric reflux and gastric carcinogenesis in rats. **Nippon Shakakibyō Gakkai Zasshi**, v.88, n.8, p.1517-24, 1991.

HIROSE, M.; TANAKA, H.; TAKAHASHI, S.; FUTAKUCHI, M.; FUKUSHIMA, S.; ITO, N. Effects of sodium nitrite and catechol, 3-methoxycatechol, or butylated hydroxyanisole in combination in a rat multiorgan carcinogenesis model. **Cancer Res.**, v.53, p.32-7, 1993.

HOUGHTON, P.W.J.; McC.MORTENSEN, N.J.; THOMAS, W.E.G.; COOPER, M.J.; MORGAN, A.P.; BURTON, P. Intra-gastric bile acids and histological changes in gastric mucosa. **Br. J. Surg.**, v.73, n.5, p.354-6, 1986.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER. **IARC Monographs on evaluation of carcinogenic risks to human**, v.61, p.177-240, 1994.

KAAKS, R.; TUYNS, A.J.; HAELTERMAN, M.; RIBOLI, E. Nutrient intake patterns and gastric cancer risk: a case-control study in Belgium. **Int. J. Cancer**, v.78, n.4, p.415-20, 1998.

KAWABE, M.; TAKABA, K.; YOSHIDA, Y.; HIROSE, M. Effects of combined treatment with phenolic compounds and sodium nitrite on two-stage carcinogenesis and cell proliferation in the rat stomach. **Jap. J. Cancer Res.**, v.85, n.1, p.17-25, 1994.

KIRK, R.M. Drainage Procedures. In: SCHWARTZ, S.I.; ELLIS, H.; HUSSER, W.C., eds. **Maingot's abdominal operations**. Norwalk, Appleton & Lange, 1989. p.667-78.

KITAJIMA, M.; OKADA, N.; IKEDA, Y.; NAKAJIMA, M.; SHIMIZU, A.; KANETAKE, C. Histopathological development of gastric tumors induced by N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 14, suppl.1, p.S8-S14, 1992.

KIVILAAKSO, E. Inhibition of gastric mucosal carbonic anhydrase by taurocholic acid and other ulcerogenic agents. **Am. J. Surg.**, v.144, n.5, p.554-7, 1982.

KLINGER, P.J.; PERDIKIS, G. WILSON, P.; HINDER, R.A. Indications, technical modalities and results of the duodenal switch operation for pathologic duodenogastric reflux. **Hepatogastroenterology**, v.46, n.25, p.97-102, 1999.

KNIGHT, T.M.; FORMAN, D.; COMBA, P.; IANNARILLI, R.; COCCO, P.L.; ANGOTZI, G.; NINU, E.; SCHIERANO, S. Nitrate and nitrite exposure in italian populations with different gastric cancer rates. **Int. J. Epidemiol.**, v.19, n.3, p.510-5, 1990.

KOBAYASI, S.; TATEMATSU, M.; OGAWA, K.; DE CAMARGO, J.L.V.; RODRIGUES, M.A.M.; ITO, N. Reversibility of adenomatous hyperplasia in the gastric stump after diversion of bile reflux in rats. **Carcinogenesis**, v.12, n.8, p.1437-43, 1991.

KOBAYASI, S.; NARESSE, L.E.; LEITE, C. Câncer do coto gástrico: estudo experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v.8, n.1, p.2-7, 1993.

KOBAYASI, S.; SAAD, L.H.C.; NARESSE, L.E., LEITE, C.; RODRIGUES, M.A.M.; OGAWA, K.; IWATA, H.; TATEMATSU, M. Sequential analysis of mucosal lesions of the gastric stump in the rat. **Acta Cir. Bras.**, v.9, n.4, p.157-62, 1994.

KOBAYASI, S.; NARESSE, L.E.; LEITE, C.; SAAD, L.H.C.; TANAKA, C.M.; RODRIGUES, M.A.M. Alterações benignas e malignas do coto gástrico após gastrectomia parcial por doença benigna. **Ged. Gastroenterol. Endosc. Dig.**, v.14, n.2, p.65-8, 1995.

KOBAYASI, S.; RODRIGUES, P.A.; NARESSE, L.E.; LEITE, C.; RODRIGUES, M.A.M. Prevention of proliferative and ulcer lesions of the gastric stump mucosa after Roux-en-Y procedure with truncal vagotomy. **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.**, v.11, n.1, p.19-22, 1996.

- KOBAYASHI, S.; PROLLA, J.C.; KIRSNER, J.B. Late Gastric carcinoma developing after surgery for benign conditions. **Dig. Dis.**, v.15, n.10, p. 905-12, 1970.
- KOBORI, O.; SHIMIZU, T.; MAEDA, M.; ATOMI, Y.; WATANABE, J.; SHOJI, M.; MORIOKA, Y. Enhancing effect of bile and bile acid on stomach tumorigenesis induced by N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Wistar* rats. **J. Nat. Cancer Inst.**, v.73, n.4, p.853-61, 1984.
- KONDO, K.; KOJIMA, H.; AKIYAMA, S.; ITO, K.; TAKAGI, H. Pathogenesis of adenocarcinoma induced by gastrojejunostomy in *Wistar* rats: role of duodenogastric reflux. **Carcinogenesis**, v.16, n.8, p.1747-51, 1995.
- KONO, S.; HIROHATA, T. Nutrition and stomach cancer. **Cancer Causes and Control.**, v.7, p.41-55, 1996.
- KUIPERS, E.J.; MEUWISSEN, S.G.M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.31, supl. 218, p.103-5, 1996.
- KYRTOPOULOS, S.A. N-Nitroso compounds formation in human gastric juice. **Cancer Surveys**, v.8, n.2, p.422-42, 1989.
- LA VECCHIA, C.; FERRARONI, M.; D AVANZO, B.; DECARLI, A.; FRANCESCHI, S. Selected micronutrient intake and the risk of gastric cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.3, n.5, p. 393-98, 1994.

- LADAS, S.D.; KATSOGRIDAKIS, J.; MALAMOU, H.; GIANNOPOULOU, H.; KESSE-ELIA, M.; RAPTIS, S.A. *Helicobacter pylori* may induce bile reflux: link between *H pylori* and bile induced injury to gastric epithelium. **Gut**, v.38, p.15-18, 1996.
- LANGHANS, P.; HEGER, R.A.; HOHENSTEIN, J.; BUNTE, H. Operation-sequel carcinoma: an experimental study. **Hepatogastroenterology**, v.28, p.34-7, 1981a.
- LANGHANS, P.; HEGER, R.A.; HOHENSTEIN, J.; BUNTE, H.; SCHLAKE, W.; Operation-sequel carcinoma of the stomach. Experimental studies of surgical techniques with or without resection. **World J. Surg.**, v.5, n.4, p.595-605, 1981b.
- LANGHANS, P.; HEGER, R.A.; STEGEMANN, B. The cancer risk in the stomach subjected to nonresecting procedures. **Scand. J. Gastrol.**, v.19, supl.92, p.138-41, 1984.
- LAUREN, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v.64, p.31-49, 1965.
- LECHAGO, J. ; CORREA, P. Prolonged achlorhydria and gastric neoplasia: Is there a causal relationship? **Gastroenterology**, v.104, n.5, p.1554-7, 1993.

- LEVI, F.; LA VECCHIA, C.; LUCCHINI, F.; NEGRI, E. Worldwide trends in cancer mortality in the elderly, 1955-1992. **Eur. J. Cancer**, v.32A, n.4, p.652-72, 1996.
- LOCKE, G.R.; TALLEY, N.J.; CARPENTER, H.A.; HARMSSEN, W.S.; ZINSMEISTER, A.; MELTON, L.J. Changes in the site and histology-specific incidence of gastric cancer during a 50-year period. **Gastroenterology**, v.109, p.1750-56, 1995.
- MAEDA, K.; KANG, S.M.; OÑODA, N.; OGAWA, M.; SAWADA, T.; NAKATA, B.; KATO, Y.; CHUNG, Y.S.; SOWA, M. Expression of *p53* and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer. **Oncology**, v.55, n.6, p.594-9, 1998.
- MALTONI, M.; VOLPI, A.; NANNI, O.; BAJORKO, P.; BELLETI, E.; VECCI, A.M.; LIVERANI, M.; DANESI, S.; CALISTRI, D.; RICOTTI, L.; AMADORI, D. Gastric cancer: epidemiologic and biological aspects. **Forum**, (Genova), v.8, n.2, p.199-207, 1998.
- MARSHALL, R.E.K.; ANGGIANSAH, A.; OWEN, J.W. Bile in the esophagus. Clinical relevance and ambulatory detection. **Br. J. Surg.**, v.84, p.21-8, 1997.
- MASON, R.C. Duodenogastric reflux in rat gastric carcinoma. **Br. J. Surg.**, v.73, n.10, p.801-3, 1986.

- MASON, R.C.; TAYLOR, P.R.; FILIPE, M.I.; McCOLL, I. Pancreaticoduodenal secretions and the genesis of gastric stump carcinoma in the rat. *Gut*, v.29, p.830-4, 1988.
- MATSUMOTO, H. Mutagenicity of gastric and duodenal juice on gastric carcinogenesis in rats with duodenal reflux. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, v.95, n.6, p.368-75, 1994
- MELICHAR, B.; BURES, J; KOMARKOVA, O; REJCHRT, S.; FIXA, B. Increased gastric juice nitrate is associated with biliary reflux and *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Gastroenterol*, v.90, n.7. p.1190-91, 1995.
- MELO, L.L. **Influência do refluxo de conteúdos gástrico e gastroduodenal, induzidos cirurgicamente, na carcinogênese esofágica- modelo experimental em ratos *Wistar*.** Porto Alegre, 1997. 73p. [Tese Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul]
- MENCK, H.R.;LAWRENCE,W. Jr; STEELE. G.D.; WINCHESTER. D.P. The national cancer data base report on gastric cancer. *Cancer*, v.75, n.7, p.1734-5, 1995.
- MIRVISH, S.S. The etiology of gastric cancer. *J. Nat. Cancer Inst.*, v.71, n.3, p.631-47, 1983.

- MIRVISH, S.S. Role of *N*-nitroso compounds (NOC) and *N*-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. **Cancer Let.**, v.93, p.17-48, 1995.
- MIRVISH, S.S. Studies on experimental animals involving surgical procedures and/or nitrosamine treatment related to the etiology of esophageal adenocarcinoma. **Cancer Let.**, v.117, p.161-74, 1997.
- MIRVISH, S.S.; WALLCAVE, L.; EAGEN, M. ; SHUBIK, P. Ascorbate nitrite reaction: possible means of blocking the formation of carcinogenic *N*-nitroso compounds. **Science**, v.177, p.65-8, 1972.
- MIRVISH, S.S.; PATIL, K.; GHADIRIAN, P.; KOMMINEMI, V.R. Dissappearance of nitrite from the rat stomach: contribution of emptyng and other factors. **J. Nat. Cancer Inst.**, v.54, p.869-75, 1975.
- MIRVISH, S.S.; BULAY, O.;RUNGE, R.G.; PATIL, K. Study of the carcinogenicity of large doses of dimethylnitramine, *N*-Nitroso-l-proline, and sodium nitrite administredt in drinking water to rats. **J. Nat. Cancer Inst.**, v.64, n.6, p.1435-40, 1980.
- MIRVISH, S.S.; DeMEESTER, T.R.; ADRIAN, T.E.; HINDER, R.A.; SMYRK, R.C.; CLARK, G.W.; KAKO, N.; HOMMA, K.; YAMASHITA, Y. Effect of duodenal components of the refluxate on development of esophageal neoplasia in rats. **J. Gatrointest Surg.**, v.2, n.4, p.350-5, 1998.

MIWA, K.; FUJIMURA, T.; HASEGAWA, H.; KOSAKA, T.; MIYATA, R.; MIYAZAKI, I.; HATTORI, T. Is bile or are pancreaticoduodenal secretions related to gastric carcinogenesis in rats with reflux through the pylorus? **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.118, p.570-574, 1992a.

MIWA, K.; HASEGAWA, H.; FUJIMURA, T.; MATSUMOTO, H.; MIYATA, R.; KOSAKA, T.; MIYAZAKI, I.; HATTORI, T. Duodenal reflux through the pylorus induces gastric carcinoma in the rat. **Carcinogenesis**, v.13, n.12, p.2313-16, 1992b.

MIWA, K.; SEGAWA, M.; TAKANO, Y. MATSUMOTO, H.; SAHARA, H.; YAGI, M.; MIYAZAKI, I.; HATTORI, T. Induction of oesophageal and forestomach carcinomas in rats by reflux of duodenal contents. **Brit. J. Cancer**, v.70, n.2, p.185-9, 1994.

MIWA, K.; HATTORI, T.; MIYAZAKI, I. Duodenogastric reflux and foregut carcinogenesis. **Cancer**, v.75, n.6Suppl, p.1426-32, 1995.

MORRIS, H.P.; WAGNER, B.P.; RAY, F.E.; SNELL, K.C.; STEWART, H.L. Comparative study of cancer and other lesions of rats fed N,N'-2,7-fluorenylenebisacetamide or N-2-fluorenylacetylacetamide. **NCI Monogr.**, v.5, p.1-53, 1961.

- MUÑOZ, N.; SIERRA, R.; BIEMOND, I.; VAN DUJN, W.; LAMERS, C.B.; TEUCHMANN, S.; HERNANDEZ, S.; CORRES, P. Antibodies to *Helicobacter pylori* and pepsinogen levels in children from Costa Rica: comparison of two areas with different risks for stomach cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.1, n.6, p.449-54, 1992.
- NAGAYO, T. Tumors of the stomach. In: TURUSOV; ed. Pathology of tumors in laboratory animals. **IARC Sci Publ.**, v.5, p.101-18, 1973.
- NEUGUT, A.I.; HAYEK, M.; HOWE, G. Epidemiology of Gastric Cancer. **Sem. Oncol.**, v. 23 , n. 3, p. 281-91, 1996.
- NGUYEN, T.; BRUNSON, D.; CRESPI, C.L; PENMAN, B.W.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide. **Proc Nat. Acad. Sci. USA**, v.89, p.3030-39, 1992.
- NISHIDOI, H.; KOGA, S.; KAIBARA, N. Possible role of duodenogastric reflux on the development of remnant gastric carcinoma induced by N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. **J. Nat. Cancer Inst.**, v.72, n.6, p.1431-5, 1984.
- NYREN, O. Is *Helicobacter pylori* really the cause of gastric cancer? **Sem. Cancer biol.**, v.8, n.4, p.275-83, 1998
- OHSHIMA, H. BARTSCH, H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. **Mutat. Res.**, v.305, p.253-64, 1994.

- OTSUKA, M.; SAKASHITA, Y.; ARAKAWA, N.; TSUDA, M. Studies on endogenous formation of *N*-nitroso compounds in the guinea pig supplemented with proline or thioproline and sodium nitrate. **Fd. Chem. Toxic.**, v.30, n.9, p.765-769, 1992.
- PARKIN, D.M.; MUIR, C.M.; WHELAN, S.L.; GAO, Y.T.; FERLAY, J.; POWELL, J. Cancer incidence in five continents. **IARC Sci. Publ.**, v.120, p.45-173, 1992.
- PIGNATELLI, B.; BANCEL, B.; ÈSTÈVE, J.; MALANEILLE, C.; CALMELS, S.; CORREA, P.; PATRICOT, L.M.; LAVAL, M.; LYANDRAT, N.; OHSHIMA, H. Inductible nitric oxide synthase, anti-oxidant enzymes and *helicobacter pylori* infection in gastritis and gastric precancerous lesions in humans. **Eur. J. Cancer Prev.**, v.7, n.6, p.439-47, 1998.
- RANZANI, G.N.; LUINETTI, O.; PADOVAN, L.S.; CALISTRI, D. RENAULT, B.; BURREL, M.; AMADORI, D.; FIOCCA, R.; SOLCIA, E. *p53* gene mutations and protein nuclear accumulation are early events in intestinal type gastric cancer but late events in diffuse type. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.4, n.3, p.223-31, 1995
- RICHTER, J.E.; FALK, G.W.; VAEZI, M.F. *Helicobacter pylori* and gastroesophageal reflux disease: the bug may not be all bad. **Amer. J. Gastroenterol.**, v.93, n.10, p. 1800-2, 1998.
- RITCHIE, W.P. Alkaline reflux gastritis. **Ann Surg.**, v.192, n.3, p.290-8, 1980.

- ROBERT, A. Proposed terminology for the anatomy of the rat stomach. **Gastroenterology**, v. 60, n.2, p.344-5, 1971.
- SAFATLE-RIBEIRO, A.V.; RIBEIRO, U., Jr.; REYNOLDS, J.C.; GAMA-RODRIGUES, J.J.; IRIYA, K.; KIM, R.; BAKKER, A.; SWALSKY, P.A.; PINOTTI, H.W.; FINKELSTEIN, S.D. Morphology, histology, and molecular similarities between adenocarcinomas arising in the gastric stump and the intact stomach. **Cancer**, v.78, p. 2288-99, 1996.
- SALMON, R.J.; DESCHNER, E.E.; OKAMURA, T.; DECOSSE, J.J.; SHERLOCK, P. Cancer induction after pyloroplasty in rats. **Arch. Surg.**, v.117, p.768-71, 1982.
- SASAKO, M.; MANN, G.B.; VAN DE VELDE, C.J.H.; HIROHASHI, S.; YOSHIDA, S. Report of the Eleventh International Symposium of the Foundation for Promotion of Cancer Research: Basic and Clinical Research in gastric cancer. **Jap. J. Clin. Oncol.**, v.28, n.7, p.443-49, 1998.
- SCHLAKE, W.; NOMURA, K. Histogenesis of carcinoma in the glandular stomach of the rat after B I resection. **Current Topics Pathol.**, v.67, p.1-67, 1979.
- SHINMURA, K.; KAHNO, T.; TAKAHASHI, M.; SASAKI, A.; OCHIOI, A.; GUILFORD, P.; HUNTER, A.; REEVE, A.E.; SUGIMURA, H.; YAMASUCHI, N.; YAKOTA, J. Familial gastric cancer: clinicopathological characteristics, RER phenotype and germline *p53* and E-cadherin mutations. **Carcinogenesis**, v.20, n.6, p.1127-31, 1999.

SOBALA, G.M.; O'CONNOR, H.J.; DEWAR, E.P.; KING, R.F.G.; AXON, A.T.R.; DIXON, M.F. Bile reflux and intestinal metaplasia in gastric mucosa. **J. Clin. Pathol.**, v.46, p.235-40, 1993.

STALNIKOWICZ, R.; BENBASSAT, J. Risk of gastric cancer after gastric surgery for benign disorders. **Arch. Intern. Med.**, v.150, p.2022 – 26, 1990.

STALTE, M.; MEINING, A. *Helicobacter pylori* and gastric cancer **Oncologist**, v.3, n.2, p.124-28, 1998.

STEIN, H.J.; KAUER, W.K.H.; FEUSSNER, H.; SIEWERT, J.R. Bile acids as components of the duodenogastric refluate: detection, relationship to bilirubin, mechanism of injury, and clinical relevance. **Hepatogastroenterology**, v.46, n.25, p.66-73, 1999.

SUGIMURA, T.; FUJIMURA, S. Tumor production in glandular stomach of the rat by N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. **Nature**, v.216, p.943-4, 1967.

TAHARA, E. Molecular mechanism of stomach carcinogenesis. **J.Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.119, p.265-72, 1993.

TAHARA, E. Molecular mechanism of human carcinogenesis implicated in *Helicobacter pylori* infection. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v.50, n.4-6, p.375-8, 1998.

TAHARA, E.; SEMBA, S.; TAHARA, H. Molecular biological observations in gastric cancer. **Sem. Oncol.**, v.23, n.3, p.307-15, 1996.

TAKAHASHI, M.; KOKUBO, T.; FURUKAWA, F.; KUROKAWA, Y.; TATEMATSU, M.; HAYASHI, Y. Effect of high salt diet on rat gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. **Gann**, v.74, n.1, p.28-34, 1983.

TAYLOR, P.R.; MASON, R.C.; FILIPE, M.I.; VJA, S.; HANLEY, D.C.; MURPHY, G.M.; DOWLING, R.R.H.; McCOLL, I. Gastric carcinogenesis in the rat induced by duodenogastric reflux without carcinogens: morphology, mucin histochemistry, polyamine metabolism, and labelling index. **Gut** 32, p.1447-54, 1991.

TERSMETTE, A.C.; OFFERHAUS, G.J.; TERSMETTE, K.W.; GIARDIELLO, F.J.; MOORE, G.W.; TYGAT, G.N.; VANDNBROUCKE, J.P. Meta-analysis of the risk of gastric stump cancer: Detection of high risk patients subsets for stomach cancer after remote partial gastrectomy for benign conditions. **Cancer Res.** 50, p. 6486-89, 1990.

THEURING, F.; DITTRICH, S.; WOLTER, F.H. On the varying degrees of cancerogenicity of modified gastroentero-anastomoses. **Exp. Path.**27, p.179-84, 1985.

THOMAS, W.E.G.; COOPER, M.J.; MORTENSEN, N.J.; BURTON, P.A.; DAVIES, E.R. The clinical assessment of duodenogastric reflux by scintigraphy and its relation to histological changes in gastric mucosa. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.92, supl., p.195-9, 1984.

TOKIEDA, M.; HONDA, S.;FUJIOKA, T.;NASU, M. Effect of *Helicobacter pylori* infection on N-methyl-N'- nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)-induced gastric carcinogenesis in *mongolian gerbils*. **Carcinogenesis**, v.20 , n.7, p. 1261-6, 1999.

VAN REES, B.P.; MUSLER, A.; CASPERS, E.; DRILLENBURG, P. CRAANEN,M.E.; POLKOWSKI,W.; CHIBOWSKI,D. OFFERHAUS,G.J. K- *ras* mutations in gastric stump carcinomas and in carcinomas from the non-operated stomach. **Hepatogastroenterology**, v.46, n.27, p.2063-8, 1999.

WAGNER, M.B. Aspectos básicos da descrição e sumarização de informações em medicina. **J. Pediatr.** ,v.74, n.1, p.71-6, 1998.

WARSHAW, A.L. Bile gastritis without prior gastric surgery contributing role of cholecystectomy. **Am. J. Surg.**, v.137, p.527-31, 1979.

WATT, P.C.H.; SLOAN, J.M., KENNEDY, T.L. Relation between intragastric bile acid concentration and mucosal abnormality in the stomach after vagotomy and gastroenterostomy for duodenal ulcer. **J. Clin. Pathol.**, v.37, p.506-10, 1984.

WEISBURGER, J.H.; MARQUARDT, H.; HIROTA, N.; MORI, H.; WILLIAMS, G.M. Induction of cancer of the glandular stomach in rats by an extract of nitrite-treated fish. **J. Nat. Cancer Inst.**, v.64, n.1, p.163-7, 1980.

WETSCHER, G.J.; HINDER, R.A.; SMYRK, T.; PERDIKIS, G.; ADRIAN, T.E.; PROFANTER, C. Gastric acid blockade with omeprazole promotes gastric carcinogenesis induced by duodenogastric reflux. **Dig. Dis. Sci.**, v.44, n.6, p.1131-5, 1999.

WILSON, P.; WELCH, N.T.; HINDER, R.A.; ANSELMINO, M.; HERRINGTON, M.K.; DEMEESTER, T.R.; ADRIAN, T.E. Abnormal plasma gut hormones in pathologic duodenogastric reflux and their response to surgery. **Am. J. Surg.**, v.165, p.169-77, 1993.

WRIGHT, P.A.; WILLIAMS, G.T. Molecular biology and gastric carcinoma. **Gut**, v.34, p.145-7, 1993.

WYATT, J.I.; DE CAESTECKER, J.S.; RATHBONE, B.J.; HEATLEY, R.V. *Campylobacter pyloridis* in tropical Africa. **Gut**, v.28, p.A1409, 1987.

YASUI, A.; HOEFT, S.F.; STEIN, H.J.; DEMEESTER, T.R.; BREMER, R.M.; NIMURA, Y. An alkaline stomach is common to Barrett's esophagus and gastric carcinoma. In: NABEYA, K.; HANAOKA, T.; NOGAMI, H.; ed. **Recent advances in diseases of the esophagus**. Tokyo, Springer, 1993. p. 169-72.

YASUI, W.; TAHARA, E.; TAHARA, H.; FUJIMOTO, J.; NAKA, K.; NAKAYAMA, J.; ISHIKAWA, F.; IDE, T. Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in normal mucosa and precancerous lesions of the stomach. **Jpn. J Cancer Res.** , v.90, n.6, p.589-95, 1999.

YOSHIDA, Y.; TATEMATSU, M.; TAKABA, K.; SHICHINO, Y.; ITO, N. Effects of various bile acids and their sodium salts on development of pepsinogen-altered pyloric glands in rats. **Teratogen. Carcinogen. Mutagen.** , v.12, p.179-86, 1992.

ZATONSKI, W.; OHSHIMA, H.; PRZEWOZNIAK, K.; DROZIK, K.; MIERZWINSKA, J.; KRYGIER, M.; CHMIELARCZYK, W.; BARTSCH, H. Urinary excretion of *N*-nitrosamino acids and nitrate by inhabitants of high- and low-risk areas for stomach cancer in Poland. **Int. J. Cancer**, v.44, p.823-27, 1989.

BIBLIOGRAFIA

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NB 66 – referências bibliográficas**. Rio de Janeiro, ABNT, 1989. 9P.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 690-2 Information and documentation – bibliographic references; electronic documents or parts thereof**. Geneve, ISSO, 1997. 18p.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e documentação. **Estrutura e apresentação de dissertações e teses**. São Paulo, 1991.

ABSTRACT

Duodenogastric reflux (DGR) has been implied as a potential esophageal and gastric carcinogen, being one of the factors that might explain the development of gastric stump carcinoma. Experimental carcinogenic models in resected stomach or gastrojejunoanastomoses are well defined. The objectives of this study were to develop an experimental gastric carcinogenic model through Finney's pyloroplasty, to assess the influence of sodium nitrite ingestion in this model, and to assess biliary acids concentration and gastric pH value. One-hundred and ten (110) Wistar rats were divided in four groups: group I (15 rats) submitted to laparotomy (Sham's operation); group II (15 rats) submitted to laparotomy (Sham's operation) and sodium nitrite ingestion in drinking water; group III (40 rats) submitted to Finney's pyloroplasty; group IV (40 rats) submitted to Finney's pyloroplasty and sodium nitrite ingestion in drinking water. After 50 weeks of surgery, rats were slaughtered, and samples of gastric juice were collected for pH analysis, biliary acids concentration measurement, and histopathological analysis. Immediate postoperative mortality was 9%, and during the experiment 10 rats died. Control group (I) (14 rats) did not present gastric lesions; control group with sodium nitrite (II) developed forestomach papilomas in 16.6% (2/12) of the rats; the pyloroplasty groups presented adenomas in 10.3% (3/29) of the rats in group III, 14.2% (5/35) of the rats in group IV, and adenocarcinoma in 55.1% (16/29) of the rats in group III and 14.2% (5/35) of the rats in group IV. Glandular implant inside submucosa and muscularis, in the anastomosis site (mucosal implant), was not a sufficient criterion to decide about the malignancy of lesions, being necessary the simultaneous presence of cellular atypias.

The concentration of biliary acids in gastric juice was larger in groups III and IV.

The measured gastric pH was not different in the studied groups. The conclusion is:

1) Finney's pyloroplasty is an adequate experimental model of gastric carcinogenesis; 2) Finney's pyloroplasty induced duodenogastric reflux; 3) duodenogastric reflux acted as gastric carcinogen in rats; 4) there was no relation between gastric pH and the development of gastric carcinoma; 5) sodium nitrite did not act as a gastric carcinogen in rats.