

Influência do refluxo duodenogástrico nas alterações histológicas da mucosa gástrica de ratos infectados com *Helicobacter pylori*

Influence of duodenogastric reflux in the gastric mucosa histological changes of rats infected with Helicobacter pylori

JOSÉ CARLOS RIBEIRO DE ARAUJO, TCBC-MA¹; JORGE JOSÉ DE CARVALHO²; HUMBERTO OLIVEIRA SERRA, TCBC-MA¹.

R E S U M O

Objetivo: avaliar a influência do refluxo duodenogástrico nas alterações histológicas da mucosa gástrica de ratos, infectados por *Helicobacter pylori*, submetidos à piloroplastia. **Método:** após duas semanas de aclimação, 30 ratos machos da raça Wistar, foram infectados com o microorganismo patogênico *H. pylori*. De forma aleatória, foram divididos em três grupos: um submetido à piloroplastia, outro à gastrectomia parcial e o terceiro, apenas infectados, não foi operado. Após seis meses de operados, procedeu-se a eutanásia. Os fragmentos gástricos foram estudados por microscopia óptica, para a contagem da quantidade de *H. pylori*, e para a observação das alterações histológicas (gastrite, metaplasia, displasia e neoplasia). A confirmação dessas alterações foi feita por imuno-histoquímica, utilizando os marcadores moleculares PCNA e TGFbeta. **Resultados:** os animais submetidos à piloroplastia tiveram maior percentual de colonização por *H. pylori* (mediana=58,5; gastrectomia=16,5; controle=14,5). Houve correlação positiva entre quantidade de *H. pylori* e ocorrência de gastrite crônica presente nos fragmentos do antro. Ocorreu 40% de neoplasia no grupo submetido à piloroplastia. A marcação de PCNA e TGF-beta confirmou as alterações histopatológicas visibilizadas à microscopia óptica. **Conclusões:** a região do antro foi a que apresentou a maior concentração de *H. pylori*, independente do grupo. Houve correlação positiva entre e o aparecimento de alterações benignas (gastrite crônica, metaplasia, displasia), e de neoplasia nos ratos infectados com *H. pylori* submetidos à piloroplastia.

Descritores: Neoplasias Gástricas. *Helicobacter pylori*. Refluxo Duodenogástrico. Ratos Wistar.

INTRODUÇÃO

O câncer gástrico, um problema de saúde pública mundial, continua ser a neoplasia maligna mais frequente do aparelho digestivo em humanos especialmente entre idosos¹⁻². No Brasil representa a segunda neoplasia mais prevalente no sexo masculino e a quinta no sexo feminino. Sua incidência diminuiu, porém seu prognóstico pouco se modificou nos últimos anos, em função de seu diagnóstico ser feito na fase avançada de progressão da doença³⁻⁵.

Vários fatores estão envolvidos na gênese do câncer gástrico como fatores ambientais e alimentares, com ênfase para alimentos ricos em nitritos e nitratos, infecção por *H. pylori* (bactéria Gram-negativa espiralada que está frequentemente associada a gastrite crônica, metaplasia intestinal e displasia) e refluxo duodenogástrico⁶⁻⁸.

Apesar do *H. pylori* ser considerado o principal fator de risco para o câncer gástrico e estar presente em mais de 50% da população mundial, estima-se que apenas 3% desenvolvem neoplasia gástrica, levando a crer

que nenhum fator etiológico atua isoladamente na carcinogênese gástrica⁷⁻⁹.

O refluxo duodenogástrico é um evento fisiológico, comum no período pós-prandial ou de jejum prolongado. Pode, porém, dependendo do ritmo, volume e duração da exposição da mucosa gástrica, ser altamente patogênico, por alterar as características fisicoquímicas das camadas protetoras de muco, elevar o pH gástrico e, com isto favorecer a proliferação bacteriana e de n-compostos¹⁰⁻¹².

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do refluxo duodenogástrico na mucosa gástrica de ratos infectados por *H. pylori* e, submetidos à gastrectomia parcial ou à piloroplastia.

MÉTODOS

Animais e Protocolo Experimental

Foram utilizados 30 ratos machos albinos da raça Wistar, com idade de 24 semanas e peso médio de 250g, Eles se mantiveram sob condições normais de pressão, tem-

1 - Departamento de Medicina II da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luiz, MA, Brasil. 2 - Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

peratura e luminosidade e tiveram livre acesso à água e alimento. Após duas semanas de aclimação, foram infectados com o microorganismo patogênico *H. pylori*.

Antes de receberem a carga de bactéria, foram mantidos em jejum por 24 horas. Após este período, receberam primeiramente 1ml de NaHCO₃ por gavagem com sonda metálica orogástrica, de acordo com o método descrito por Konturek¹³. Logo em seguida, foi inoculado ainda por gavagem orogástrica 1ml de *H. pylori* ATCC 43504 (9x10⁸) em suspensão de *Mueller-Hinton*. Cada animal recebeu três doses iguais, com um intervalo de dois dias entre cada aplicação. Os roedores tiveram livre acesso à água e alimento logo após a primeira aplicação.

Após 15 dias da última inoculação os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=10): Grupo I, Infecção (controle); Grupo G, Gastrectomia (submetidos à gastrectomia parcial) e Grupo P, Píloroplastia (submetidos à píloroplastia). Todos os animais sobreviveram e a eutanásia foi realizada ao cabo de 24 semanas.

Micro-organismo

O estoque de *H. pylori* foi mantido em cultura de caldo *Hinton-Muller* (Himedia, Bombaim, Índia) a uma temperatura de -20°C, em glicerol a 20%. A bactéria inoculada foi preparada em placas (90x15mm) de Agar (Becton, Dickinson and Company), suplementados com sangue de carneiro a 5% ou em BHI e mantidos em jarra com "sache" gerador de microaerofilia e gás O₂ e CO₂ (Probac do Brasil) por três a cinco dias a 37°C. A identificação morfológica e atividade das bactérias foram baseadas na exigência de microaerofilia para crescimento da bactéria e pela coloração de Gram.

Cirurgia

Nas 24 horas que antecederam o procedimento cirúrgico os animais dos grupos G e P tiveram acesso somente à água. A técnica anestésica utilizada foi a inalação de éter sulfúrico em cuba fechada para sedação inicial e ketamina intramuscular na face posterior da coxa, na dose de 50mg/Kg. Todos os animais foram operados em condições assépticas.

Todos os 20 animais foram submetidos à laparotomia mediana a partir do apêndice xifóide até o terço médio abdominal. Duas pinças tipo *Halsted* foram colocadas, uma de cada lado da parede de modo a atuarem,

pelo próprio peso, como afastadores. O fígado foi rebatido e o estômago foi exteriorizado através da incisão por tração de ponto, o que permitiu o desenvolvimento da técnica extracavitária. A parede abdominal foi fechada com fio prolene 3-0 em chuleio contínuo alcançando todos os planos. No pós-operatório foi oferecido alimentação *ad libitum*.

Gastrectomia Parcial

Foi realizada a ressecção de 2/3 do antro e metade do corpo gástrico com preservação do piloro e dos nervos vagos. A reconstituição gástrica foi realizada por chuleio simples com fio sertix de prolene 5-0 de agulha cilíndrica de 1,5cm. Todos os animais do grupo G foram operados no mesmo dia.

Píloroplastia

Foi realizada incisão longitudinal de 2cm (1cm no estômago e 1cm no duodeno), interessando todos os planos. O fechamento foi realizado no sentido transversal com chuleio simples com fio sertix de prolene 5-0 de agulha cilíndrica de 1,5cm à *Heinecke-Mikulicz*.

A parede abdominal foi fechada com fio de prolene 3-0 em chuleio contínuo alcançando todos os planos. Todos os animais do grupo P foram operados no mesmo dia.

Eutanásia e Preparação Técnica do Material

Vinte e quatro horas antes da eutanásia, os animais foram privados de alimentos, e, em seguida, anestesiados profundamente (pentobarbital sódico intraperitoneal, 150mg/Kg). O estômago foi retirado inteiro e seccionado longitudinalmente em duas metades (anterior e posterior), que foram rapidamente colocadas numa solução de 1,27mol/l de formaldeído (0,1M de tampão fosfato, pH 7,2) por 48 horas. O material foi incluído com a face de corte para baixo (ambas as metades, cada uma contendo antro, corpo e fundo gástrico).

Os fragmentos foram tratados em aparelho Histotécnico (processador de tecidos) de marca Micom GMBH, emblocados em parafina por meio de aparelho autoinclusor da marca Microm AP280, cortados em cinco micrômetros de espessura em micrótomo ZEISS-HYRAX-MIS. Foram realizados dois cortes histológicos das partes que foram coradas com hematoxilina-eosina e de Giem-

Tabela 1. Quantidade de *H. pylori* nos diferentes segmentos gástricos de acordo com os grupos.

Localização	Mediana da quantidade <i>H. pylori</i>			Teste de <i>Kruskal-Wallis</i> (p valor)
	Piloroplastia	Gastrectomia	Infecção	
Antro	58,5	16,5	14,5	0,310
Corpo	4,0	1,5	1,5	0,560
Fundo	4,0	7,0	2,0	0,161

sa modificada. As lâminas histológicas foram observadas ao microscópio óptico da marca NIKON ECLAPSE 200.

Os cortes foram analisados por imuno-histoquímica com marcação para TGF- β e PCNA. A recuperação antigênica foi realizada utilizando tampão citrato, pH 6,0 a 60°C e em seguida bloqueado com cloreto de amônio, glicina, 2% e tampão fosfato, pH 7,4 (PBS). Os cortes foram incubados com um anticorpo primário específico em ratos, ambos na concentração de 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) durante toda a noite a 4°C. Em seguida, as amostras foram incubadas por uma hora em temperatura ambiente com um anticorpo secundário biotinilado (K0679, Universal DakoCytomation LSAB + Kit Peroxidase; DakoCytomation Glostrup, Denmark), foi usado um anticorpo secundário de cavalo antirrato detectável por reação do complexo strept-avidina-biotina-enzima. A imunomarcação positiva foi identificada após a incubação com 3,3'-tetracloreto de diaminobenzidina (K3466, DAB; DakoCytomation) e contrastado com Hematoxilina de Mayer.

Na análise histopatológica, foram estudadas 100 glândulas de cada seguimento gástrico (antro, corpo e fundo), para pesquisa de *H. pylori* e inflamação, metaplasia, displasia e neoplasia, em microscopia óptica nos aumentos de 40x, 100x e 400x. Os resultados foram classificados como: normal, gastrite, metaplasia, displasia e neoplasia.

O estudo da mucosa gástrica foi considerado: (a) normal- quando no epitélio observou-se na lâmina própria, a ausência de neutrófilos e a presença de até dez linfócitos e plasmócitos por campo microscópico de 400X. (b) gastrite crônica- caracterizada pela presença de células predominantemente mononucleares (linfócitos e plasmócitos), a atividade de cronicidade foi mensurado mediante a presença de densidade do infiltrado de linfócitos, células plasmáticas ou polimorfonucleares na lâmina própria. A gastrite e sua atividade obedeceram à classificação de Sydney modificada¹⁴. (c) metaplasia- através da

presença de células intestinais na mucosa do estômago. (d) displasia- mediante a distorção da citoarquitetura intraepitelial (aumento da população celular, perda de polaridade, diminuição de muco, proliferação de células e glândulas, alteração da forma das glândulas). (e) neoplasia- mesmas características da displasia além de invasão extraepitelial.

Quanto às camadas gástricas, considerou-se o acometimento restrito a mucosa do antro, corpo e fundo gástrico.

Análise Estatística

Utilizou-se o teste de *Shapiro-Wilk* para testar a normalidade das variáveis quantitativas. As diferenças entre as medianas das variáveis quantitativas que não apresentaram distribuição normal foram calculadas por meio do teste de *Kruskal-Wallis*. Para avaliar as diferenças entre as proporções das variáveis categóricas foi usado o teste exato de *Fisher*. Em todas as análises foi considerado como nível de significância $p \leq 0,05$.

Comitê de Ética

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (CEA/001/2010).

RESULTADOS

A mediana da quantidade de *H. pylori* encontrada nas 100 glândulas de cada segmento gástrico, quando comparada de acordo com os grupos foi maior no antro dos animais submetidos à piloroplastia (mediana=58,5), muito embora essa diferença com relação aos demais (gastrectomia=16,5 e controle=14,5), não tenha sido significativa (teste de *Kruskal-Wallis* $p > 0,05$) conforme mostra a tabela 1.

Tabela 2. Quantidade de *H. pylori* de acordo com a localização no estômago.

Localização	n	Mediana	Diferença interquartil
Antro	30	21	66
Corpo	30	2	5
Fundo	30	3,5	8

Quando comparamos a população de *H. pylori* de acordo com o segmento gástrico estudado, independente do grupo, o antro também foi o local em que se encontrou a maior quantidade da bactéria (Tabela 2).

Houve correlação positiva entre quantidade de *H. pylori* presente nos fragmentos do antro e a ocorrência de gastrite crônica, de metaplasia, de displasia e de neoplasia, especialmente nos animais submetidos à piloroplastia. Não foram verificadas correlações entre essas as variáveis estudadas nos fragmentos do corpo e do fundo (Tabelas 3 e 4).

A tabela 5 mostra que houve diferenças significativas quando comparadas as proporções das alterações histológicas da mucosa do antro nos grupos estudados, observadas pela microscopia óptica. Ocorreu 40% de neoplasia no grupo submetido à piloroplastia, não havendo ocorrência dessa alteração nos grupos G e I (teste exato de Fisher, $p=0,023$). A displasia foi observada em 50% dos ratos submetidos à piloroplastia e 10% no grupo dos gastrectomizados. O grupo dos infectados não apresentou essa alteração (teste exato de Fisher, $p=0,027$).

A confirmação das alterações histológicas da mucosa gástrica foi analisada por imuno-histoquímica com marcação para TGF- β e PCNA conforme mostra as figuras 1e 2.

DISCUSSÃO

O carcinoma gástrico é um dos cânceres espontâneos mais raros em animais. O primeiro modelo que

desenvolveu adenocarcinoma gástrico em ratos usava o carcinógeno N, N-2,7-fluorenylenebisacetamida (2,7-FAA)¹⁵. A infecção por *H. pylori* induz inflamação crônica na mucosa gástrica que leva à destruição da barreira protetora que reveste a mucosa do estômago, permitindo que o ácido gástrico agrida a própria mucosa, induzindo o desenvolvimento de diversos tipos de neoplasias, sem, entretanto, conhecermos os mecanismos do seu desenvolvimento¹⁶.

Neste estudo, obteve-se predomínio de lesões proliferativas benignas, diagnosticando-se quatro neoplasias malignas, localizadas na região do antro gástrico, na linha de sutura da piloroplastia. Essa localização é a mais comum nos trabalhos experimentais que executam gastrectomias parciais com reconstrução a Billroth II ou gastroenteroanastomose sem ressecção gástrica¹⁷⁻¹⁹.

O somatório de fatores como o processo infeccioso, inflamação e piloroplastia, poderia constituir um estímulo à proliferação celular. Sabe-se que o aumento da taxa de proliferação celular é um dos pré-requisitos para a carcinogênese. No presente estudo os cortes tratados com a técnica de imunoperoxidase para evidenciação de PCNA, identificador da proliferação celular, demonstraram que a maior imunomarcação se obteve na região da linha de sutura da piloroplastia no antro gástrico. Corroboram com tais afirmativas os trabalhos de Rodrigues *et al.*²⁰ e Taylor *et al.*²¹.

Tabela 3. Correlação entre a quantidade de *H. pylori* e as alterações da mucosa gástrica considerando todos os grupos.

Variável	Localização					
	Antro		Corpo		Fundo	
	r	p	r	p	r	p
Gastrite crônica	0,5741	0,0009	0,1689	0,372	0,4065	0,258
Metaplasia	0,6886	<0,0001	-	-	-0,0653	0,7316
Displasia	0,6344	0,0002	-	-	-	-
Neoplasia	0,5283	0,0027	-	-	-	-

Teste: Correlação de Spearman

Tabela 4. Correlação entre a quantidade de *H. pylori* e as alterações da mucosa gástrica do grupo dos ratos submetidos à piloroplastia.

Variável	Localização					
	Antro		Corpo		Fundo	
	r	p	r	P	r	p
Gastrite crônica	0,5660	0,0881	0,3858	0,2709	0,6986	0,0246
Metaplasia	0,8730	0,0010	-	-	-	-
Displasia	0,8032	0,0051	-	-	-	-
Neoplasia	0,8554	0,0016	-	-	-	-

Acredita-se que a região da anastomose possa ter características que facilitam o desenvolvimento de neoplasias, tais como processo inflamatório crônico, pela presença de corpo estranho (fio de sutura) e o contato contínuo com os conteúdos duodenogástrico. Os cortes imunomarcados com anticorpo anti-TGF- β evidenciaram maior positividade na região do antro onde se encontra a linha de sutura. Whal et al.²² mostraram que o TGF- β é um potente quimiotático para leucócitos, incluindo neutrófilos, monócitos e mastócitos e está envolvido na formação do infiltrado inflamatório, especialmente na lesão inflamatória crônica. Nossos achados relativos à maior imunomarcagem com o TGF- β na região do antro evidenciam a presença do infiltrado inflamatório que facilita o desenvolvimento de neoplasias.

Até o momento nenhum fator, isolado, pode ser implicado na carcinogênese gástrica. A associação de fatores, por outro lado, já se mostrou significativa no desenvolvimento desses tumores, como refluxo duodenogástrico e infecção por *H. pylori*, ambos reconhecidamente fatores etiológicos da gastrite crônica, capaz de levar à sequência de eventos que se inicia com gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e neoplasia. O estado proliferativo exacerbado nas suturas, como demonstrado em nosso trabalho, ou em lesões sem cirurgia, tornam-se alvos fáceis para a ação de carcinógenos formados en-

dogenamente, como os compostos n-nitrosos que, em estômagos hipoclorídricos, colonizados por bactérias reductoras, transformam nitrato em nitrito²³.

Evidências recentes demonstram que cepas do *H. pylori* apresentam diversidade genotípica, cujos produtos acionam o processo inflamatório por meio de citocinas, que podem levar a diferentes graus de resposta inflamatória do hospedeiro, resultando em diferentes alterações patológicas sem, no entanto, determinar como a bactéria contribui para esse processo²⁴.

Nosso estudo mostrou uma maior concentração de *H. pylori* na região antropilórica, principal local de desenvolvimento do câncer gástrico tipo intestinal. Houve correlação positiva entre quantidade de *H. pylori* e a ocorrência de metaplasia ($r=0,6886$; $p=0,0001$), de displasia ($r=0,6344$; $p=0,0002$) e de neoplasia ($r=0,5283$; $p=0,0027$) presentes nos fragmentos do antro. Não foram verificadas correlações entre essas as variáveis estudadas nos fragmentos do corpo e do fundo.

O refluxo alcalino, promovido pela piloroplastia, eleva o pH do estômago e favorece a proliferação bacteriana, que contribui para a atrofia da mucosa gástrica e, principalmente, por meio do contato com os sais biliares e suas propriedades detergentes, facilitariam a penetração de carcinógenos através da barreira mucosa

Tabela 5. Alterações da mucosa do antro de acordo com os grupos estudados.

Presença no antro	Grupo						Teste exato de Fisher p valor
	Piloroplastia (P)		Gastrectomia (G)		Infectados (I)		
	n	%	n	%	N	%	
Gastrite crônica	10	100	10	100	10	100	-
Metaplasia	5	50	3	30	0	0	0,53
Displasia	5	50	1	10	0	0	0,027
Neoplasia	4	40	0	0	0	0	0,023

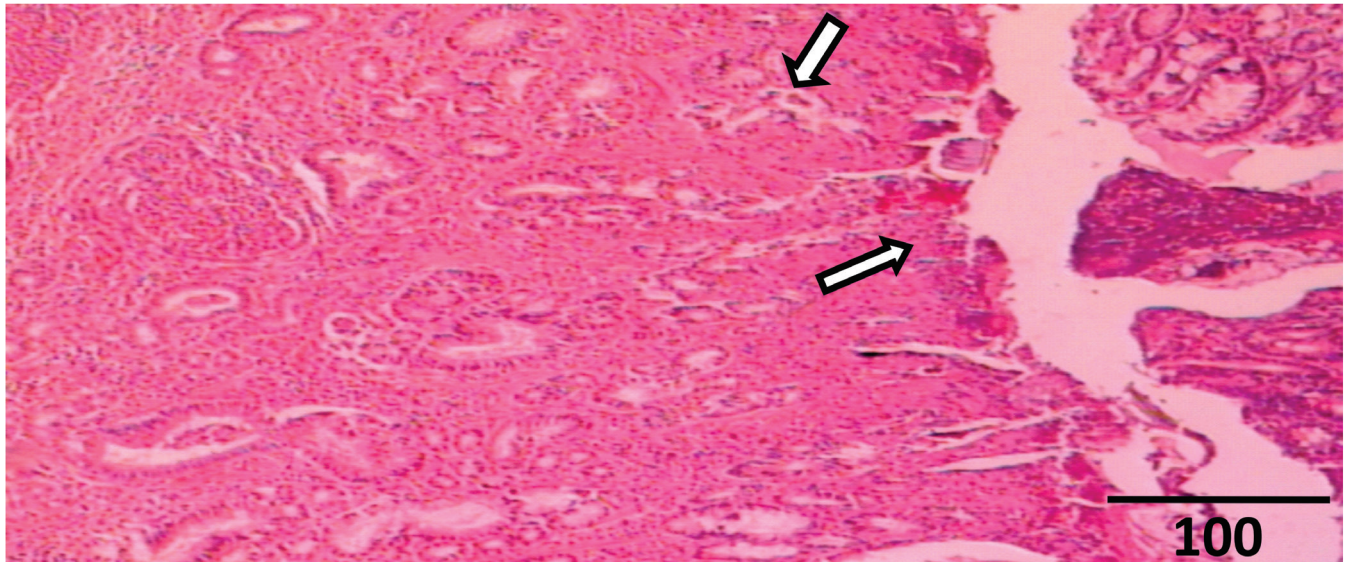


Figura 1. Presença de neoplasia, com irregularidade das glândulas gástricas que não estão paralelas, diferenças no tamanho, e apresentação bifurcada.

facilitando suas atuações junto ao compartimento proliferativo da mucosa²⁵.

No nosso estudo mostrou uma maior quantidade de *H. pylori* no antro dos animais submetidos à piloroplastia, muito embora essa diferença com relação aos demais grupos não tenha sido significativa. Quando comparamos a população de *H. pylori* de acordo com o segmento gástrico estudado, independente do grupo, o antro também foi o local em que se encontrou a maior quantidade da bactéria.

Esta relação sugere que pode haver certa relação entre o refluxo duodeno-gástrico e a malignização do epitélio do terço distal do estômago, onde o contato do material refluído com a mucosa é mais intenso e justificariam a elevada frequência de adenocarcinomas nessa região em ratos infectados com *H. pylori*²⁰.

Kamata²⁶ relatou 20,8% de adenocarcinoma gástrico em um grupo de ratos submetidos à gastrectomia com reconstituição a Billroth II. Não encontrou casos

de carcinomas em ratos submetidos à gastrectomia com reconstrução a Billroth I, mesmo com a retirada do piloro (cirurgia indutora de refluxo), mostrando que a importância está na maior quantidade de conteúdo refluído. Neste estudo encontrou-se 40% de adenocarcinoma em ratos submetidos à piloroplastia em infecção de 24 semanas.

Kobori *et al.*²⁷ estudando as relações do refluxo através do piloro, em ratos e o desenvolvimento de lesões malignas, pós segmento de 50 semanas, obtiveram incidência de adenocarcinoma de 41% na mucosa do antro. Kaminishi *et al.*²⁸ em estudo semelhante, realizando cirurgia de indução do refluxo duodeno gástrico através do piloro, com tempo de observação de 30 semanas não encontrou lesões malignas. Contudo, essas conclusões estão sujeitas a críticas, pois a maioria dos métodos de detecção do refluxo duodenogástrico resulta de medidas imprecisas devido ao caráter intermitente do refluxo ou por falhas intrínsecas a metodologia empregada²⁹.

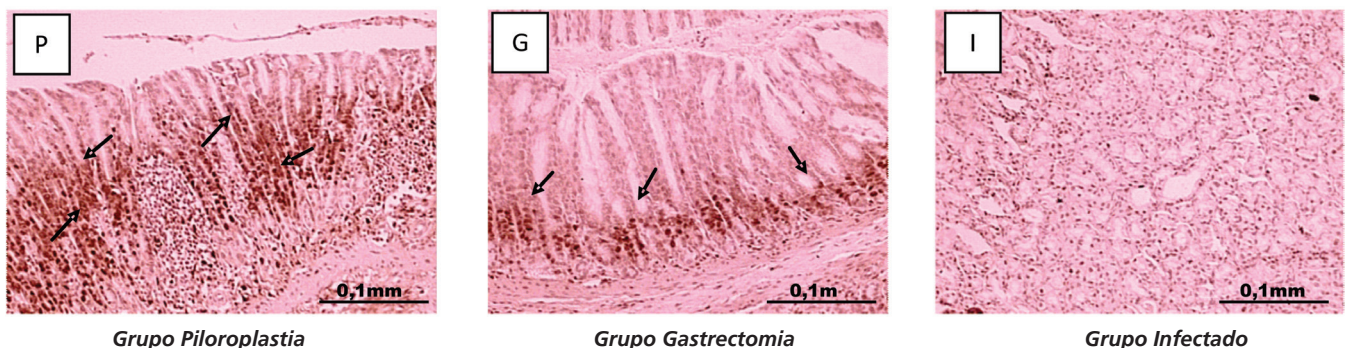


Figura 2. Corte histológico da expressão do PCNA do antro nos grupos estudados Piloroplastia, Gastrectomia e Controle (infectado).

Em conclusão, a região do antro foi a que apresentou a maior concentração de *H. pylori*, independente do grupo. Houve correlação positiva entre e o apareci-

mento de alterações benignas (gastrite crônica, metaplasia, displasia), e de neoplasia nos ratos infectados com *H. pylori* submetidos à piloroplastia.

ABSTRACT

Objective: to evaluate the influence of Duodenal reflux in histological changes of the gastric mucosa of rats infected with *Helicobacter pylori* submitted to pyloroplasty. **Methods:** after two weeks of acclimation, we infected 30 male Wistar rats with *Helicobacter pylori*. We randomly divided them into three groups: one submitted to pyloroplasty, another to partial gastrectomy and the third, only infected, was not operated. After six months of surgery, euthanasia was carried out. Gastric fragments were studied by light microscopy to count the number of *H. pylori*, and to observe the histological changes (gastritis, metaplasia, dysplasia and neoplasia). We confirmed these changes by immunohistochemistry using the molecular markers PCNA and TGF-beta. **Results:** the animals submitted to pyloroplasty had higher percentage of colonization by *H. pylori* (median=58.5; gastrectomy=16.5; control=14.5). There was a positive correlation between the amount of *H. pylori* and the occurrence of chronic gastritis present in the antral fragments. Neoplasia occurred in 40% of rats from the group submitted to pyloroplasty. The staining with PCNA and TGF-B confirmed the histopathological changes visualized by optical microscopy. **Conclusions:** the antral region was the one with the highest concentration of *H. pylori*, regardless of the group. There was a positive correlation between the appearance of benign disorders (chronic gastritis, metaplasia, dysplasia) and cancer in mice infected with *H. pylori* submitted to pyloroplasty.

Keywords: Stomach Neoplasms. *Helicobacter pylori*. Duodenogastric Reflux. Rats, Wistar.

REFERÊNCIAS

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(2):74-108.
- Hu B, El Hajj N, Sittler S, Lammert N, Barnes R, Meloni-Ehrig A. Gastric cancer: classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol.* 2012;3(3):251-61.
- Liu X, Cai H, Wang Y. Prognostic significance of tumour markers in Chinese patients with gastric cancer. *ANZ J Surg.* 2012;84(6):448-53.
- Katsube T, Murayama M, Isohata N, Asaka S, Yamaguchi K, Kuhara K, et al. The efficacy of endoscopic submucosal dissection compared with modified endoscopic aspiration mucosectomy by assessing the short-term therapeutic results for differentiated mucosal gastric cancer. *Anticancer Res.* 2009;29(10):4271-4.
- Naka T, Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Ojima T, Iida T, et al. The evaluation of surgical treatment for gastric cancer patients with noncurative resection. *Langenbecks Arch Surg.* 2012;397(6):959-66.
- Kono S, Hirohata T. Nutrition and stomach cancer. *Cancer Causes Control.* 1996;7(1):41-55.
- Peek RM Jr, Moss SF, Tham KT, Pérez-Pérez GI, Wang S, Miller GG, et al. *Helicobacter pylori* cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(12):863-8.
- Araújo MG, Hilário F, Nogueira LG, Vilegas W, Santos LC, Bauab TM. Chemical constituents of the methanolic extract of leaves of *Leiothrix spiralis* Ruhland and their antimicrobial activity. *Molecules.* 2011;16(12):10479-90.
- Epplein M, Zheng W, Xiang YB, Peek RM Jr, Li H, Correa P, et al. Prospective study of *Helicobacter pylori* biomarkers for gastric cancer risk among Chinese men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012;21(12):2185-92.
- Ritchie WP Jr. Alkaline reflux gastritis. An objective assessment of its diagnosis and the treatment. *Ann Surg.* 1980;192(3):288-98.
- Langhans P, Heger RA, Hohenstein J, Schlake W, Bunte H. Operation-sequel carcinoma of the stomach. Experimental studies of surgical techniques with or without resection. *World J Surg.* 1981;5(4):595-605.
- Kawiorski W, Herman RM, Legutko J. [Current diagnosis of gastroduodenal reflux and biliary gastritis]. *Przegl Lek.* 2001;58(2):90-4. Polish.
- Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Stachura J, Karczewska E, Pajdo R, et al. Mouse model of *Helicobacter pylori* infection: studies of gastric function and ulcer healing. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999;13(3):333-46.
- Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney

- System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol*. 1996;20(10):1161-81.
15. Morris HP, Wagner BP, Ray FE, Snell KC, Stewart HL. Comparative study of cancer and other lesions of rats fed N.N'-2,7-fluorenylene-bisacetamide or N-2-fluorenylacacetamide. *Nat Cancer Inst Monogr*. 1961;5:1-53.
 16. Nema H, Kato M. Comparative study of therapeutic effects of PPI and H2RA on ulcers during continuous aspirin therapy. *World J Gastroenterol*. 2010;16(42):5342-6.
 17. Mason RC. Duodenogastric reflux in rat gastric carcinoma. *Br J Surg* 1986;73(10):801-3.
 18. Chan DC, Fan YM, Lin CK, Chen CJ, Chen CY, Chao YC. Roux-en-Y reconstruction after distal gastrectomy to reduce enterogastric reflux and *Helicobacter pylori* infection. *J Gastrointest Surg*. 2007;11(12): 1732-40.
 19. Kaminski EMF, Kruel CDP. Modelo de carcinogênese gástrica utilizando piloroplastia de Finney: estudo experimental em ratos. *ABCD, arq bras cir dig*. 2011;24(4):296-304.
 20. Rodrigues PA, Naresse LE, Leite CVS, Rodrigues MAM, Kobayashi. O refluxo duodeno-gástrico (RDG), através do piloro, induz lesões proliferativas gástricas em ratos? *Acta Cir Bras*. 2002;17(3):160-7.
 21. Taylor PR, Mason RC, Filipe MI, Vaja S, Hanley DC, Murphy GM, et al. Gastric carcinogenesis in the rat induced by duodenogastric reflux without carcinogens: morphology, mucin histochemistry, polyamine metabolism, and labelling index. *Gut*. 1991;32(12):1447-54.
 22. Wahl SM, Costa GL, Mizel DE, Allen JB, Skaleric U, Mangan DF. Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation. *J Periodontol*. 1993;64(5 Suppl):450-5.
 23. Thomazini CM, Pinheiro NA, Pardini MI, Naresse LE, Rodrigues MAM. Infecção por *Helicobacter pylori* e câncer gástrico: frequência de cepas patogênicas *cagA* e *vacA* em pacientes com câncer gástrico. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;42(1):25-30.
 24. Ladeira MSP, Salvadori DMF, Rodrigues MAM. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. *J Bras Patol Med Lab*. 2003;39(4):335-42.
 25. Miwa K, Hasegawa H, Fujimura T, Matsumoto H, Miyata R, Kosaka T, et al. Duodenal reflux through the pylorus induces gastric adenocarcinoma in the rat. *Carcinogenesis*. 1992;13(12):2313-6.
 26. Kamata T. [Experimental studies on the development of residual stomach cancer--comparison of Billroth I and Billroth II]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 1993;94(2):104-13. Japanese.
 27. Kobori O, Shimizu T, Maeda M, Atomi Y, Watanabe J, Shoji M, et al. Enhancing effect of bile and bile acid on stomach tumorigenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *J Natl Cancer Inst*. 1984;73(4):853-61.
 28. Kaminishi M, Shimizu N, Shiomoyama S, Yamaguchi H, Ogawa T, Sakai S, et al. Etiology of gastric remnant cancer with special reference to the effects of denervation of the gastric mucosa. *Cancer*. 1995;75(6 Suppl):1490-6.
 29. Girelli CM, Cuvello P, Limido E, Rocca F. Duodenogastric reflux: an update. *Am J Gastroenterol*. 1996;91(4) 648-53.
- Recebido em: 24/02/2016
Aceito para publicação em: 06/06/2016
Conflito de interesse: nenhum.
Fonte de financiamento: nenhuma.
- Endereço para correspondência:**
Humberto de Oliveira Serra
E-mail: hoserra@terra.com.br