

MODELO DE CARCINOGENESE GÁSTRICA UTILIZANDO PILOROPLASTIA DE FINNEY: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

Gastric carcinogenesis model using Finney pyloroplasty: experimental study in rats

Eliane de Marco Ferreira **KAMINSKI**, Cleber Dario Pinto **KRUEL**

Trabalho realizado no Programa de Pós-Graduação em Medicina: Gastroenterologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMO – Racional - O refluxo duodenogástrico 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. **Objetivos** - Desenvolver um modelo experimental de carcinogênese gástrica através de piloro-plastia à Finney, avaliar a influência da ingestão de nitrito de sódio nesse modelo, analisar as concentrações de ácidos biliares e o valor do pH gástrico. **Métodos** - Foram operados 110 ratos Wistar divididos em quatro grupos: Grupo I (15 ratos) submetidos à laparotomia (grupo Sham); Grupo II (15 ratos) submetidos à laparotomia (Sham) e à ingestão de nitrito de sódio na água de beber; Grupo III (40 ratos) submetidos à piloro-plastia à Finney; Grupo IV (40 ratos) submetidos à piloro-plastia à Finney e à ingestão de nitrito de sódio na água de beber. Após 50 semanas da operação, os ratos foram sacrificados, coletadas amostras de suco gástrico para análise do pH, dosagem dos ácidos biliares, e realizada análise histológica. **Resultados** - A mortalidade pós-operatória imediata foi de 9% e, ao longo do experimento, 10 ratos morreram. O grupo controle (I) não apresentou lesões gástricas; o grupo controle com nitrito de sódio (II) desenvolveu papilomas no pré-estômago em 16,6%; os grupos operados com piloro-plastia apresentaram adenomas em 10,3% no Grupo III e 14,2% no Grupo IV, e adenocarcinoma em 55,1% no grupo III e 14,2% 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. **Conclusão** - 1) A piloro-plastia à Finney é modelo experimental adequado de carcinogênese gástrica; 2) ela induziu refluxo duodenogástrico; 3) o refluxo duodenogástrico atuou como carcinógeno para o estômago; 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.

DESCRITORES - Carcinogênese. Ratos. Modelo experimental. Piloro-plastia.

Correspondência:

Cleber Dario Pinto KrueL,
e-mail: cdkrueL@yahoo.com.br

Fonte de financiamento: não há
Conflito de interesses: não há

Recebido para publicação: 29/03/2011
Aceito para publicação: 07/06/2011

ABSTRACT – Background: The duodenogastric reflux has been implicated as a potential carcinogen for the stomach and esophagus and is one of the factors that may explain the development of gastric stump cancer. Experimental models of carcinogenesis in the stomach stump or in the duodenogastric anastomosis are well defined. **Aim** - To develop an experimental model of gastric carcinogenesis through the Finney pyloroplasty, evaluate the influence of ingestion of sodium nitrite in this model, analyze the concentrations of bile acids and the pH of the stomach. **Methods** - A hundred and ten Wistar rats were operated and divided into four groups: Group I (15 rats) underwent laparotomy (Sham group); Group II (15 rats) underwent laparotomy (Sham) and ingestion of sodium nitrite in drinking water; Group III (40 rats) submitted to the Finney pyloroplasty and Group IV (40 rats) submitted to the Finney pyloroplasty and ingestion of sodium nitrite in drinking water. After 50 weeks of surgery, the rats were sacrificed and samples collected for analysis of gastric pH, dosing of bile acids and histological analysis. **Results** - The immediate postoperative mortality was 9%, and during the experiment, 10 rats died. The control group (I) did not show gastric lesions; the control group with sodium nitrite (II) developed papillomas in the pre-stomach in 16.6%; the operated groups with pyloroplasty had adenomas in 10.3% in Group III and 14.2% in Group IV, and adenocarcinoma in 55.1% in group III and 14.2% in Group IV. The implementation of glands into the submucosa and muscle in the area of anastomosis (mucosa deployment) was not sufficient criterion for deciding on the malignancy of the lesions, requiring the simultaneous presence of atypical cells. The concentration of bile acids in gastric juice was higher in Groups III and IV. The measurement of gastric pH was not different in both groups. **Conclusion** - 1) The Finney pyloroplasty is suitable experimental model of gastric carcinogenesis; 2) it induced duodenogastric reflux; 3) the duodenogastric reflux served as a carcinogen for the stomach; 4) there was no relationship between pH and the development of gastric carcinoma; 5) sodium nitrite did not act as a carcinogen for the stomach of rats.

HEADINGS - Carcinogenesis. Rats. Experimental model. Pyloroplasty.

INTRODUÇÃO

O câncer gástrico é um dos problemas mais importantes de saúde em todo mundo. É doença com alta taxa de mortalidade com sobrevida em cinco anos, menor que 20%.

Uma hipótese que tem recebido considerável atenção é a de que compostos N-nitrosos estejam envolvidos na carcinogênese gástrica^{8,23}. 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 salgados¹⁹ e associações negativas com dietas ricas em frutas e vegetais frescos que são ricos em carotenóides e antioxidantes como vitamina C¹³. Em estudo experimental já foi demonstrado que o ascorbato inibe a formação de compostos nitrosos, diminuindo a indução de tumores²², e em estudo epidemiológico, que a dieta rica em ascorbato reduz o risco de câncer gástrico²⁰.

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 antioxidantes⁴.

Estudos clínicos em pacientes com risco elevado de câncer gástrico têm encontrado dados que sustentam a hipótese da nitrosação endógena. Caygill et al.⁷ 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.

Em 1922, Balfour³ descreveu, pela primeira vez, um adenocarcinoma de coto gástrico, após operação por doença péptica. Outros autores têm descrito este câncer^{15,16}, que é definido como o carcinoma que ocorre no estômago remanescente, após a ressecção gástrica ter sido realizada por doença benigna. Latência mínima de cinco anos, após a operação, é exigida para evitar erro de diagnóstico. Usando essa definição, a prevalência do carcinoma de coto gástrico, segundo a literatura, varia entre 0.8% a 8.9% dos pacientes submetidos à ressecções gástricas³⁰. Duas metanálises mostram risco significativo de câncer gástrico, após gastrectomia com reconstrução a Billroth I ou Billroth II que, se torna aparente 15 anos após a operação.

O refluxo duodenogástrico tem sido descrito como causa da síndrome clínica chamada gastrite de refluxo ou gastrite alcalina²⁸. A maior causa dele é operação 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^{5,14}. O refluxo duodenogástrico 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.

Estudos experimentais em ratos mostram que o refluxo duodenogástrico produz adenocarcinoma no estômago glandular, carcinoma epidermóide no pré-estômago, e promove o aparecimento de esôfago de Barrett, adenocarcinoma de esôfago e carcinoma epidermóide de esôfago^{10,12,18,25,34,35,37}.

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 descritos⁶. O primeiro modelo que desenvolveu adenocarcinoma gástrico em ratos usava o carcinógeno N,N'-2,7-fluorenylenebisacetamida(2,7-FAA)²⁶. Sugimura e Fujimura³³ relataram, em 1967, que o N-Methyl-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.

Os objetivos deste trabalho foram: 1) desenvolver modelo experimental de carcinogênese gástrica em ratos operados com piloroplastia à Finney; 2) avaliar a influência da ingestão de nitrito de sódio na água de beber; 3) analisar as concentrações de ácidos biliares e valor do pH gástrico em ratos com piloroplastia à Finney ou laparotomia e submetidos ou não à ingestão de nitrito de sódio.

MÉTODOS

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 seis semanas de vida os animais foram transferidos para o Biotério da Divisão de Produção e Experimentação Animal da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde 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. Eles 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 e os pesquisadores procuraram tratar os animais 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.

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 "ad libitum". A ração era trocada duas vezes por semana. A água de beber provinha da rede de abastecimento de Porto Alegre e era trocada a cada dois dias. O nitrato de sódio era diluído na água de beber na dose de 3 g/l e oferecido como única opção de ingestão hídrica aos animais dos Grupos II e IV, a partir da 1ª. semana de vida até o final do experimento. A solução de nitrato de sódio era conservada em refrigerador entre 8° e 11° e trocada duas vezes por semana.

Delineamento experimental

O experimento consistiu na realização de operação (laparotomia ou piloro-plastia) em associação, ou não, com o uso de nitrato de sódio na água de beber. Os 110 ratos foram distribuídos em grupos assim constituídos: Grupo I - submetido à laparotomia com manipulação de alças (grupo Sham), recebia somente água durante todo o experimento; Grupo II - submetido à laparotomia com manipulação de alças (Sham) recebia nitrato de sódio diluído na água de beber a partir de três semanas após a operação e durante todo o experimento; Grupo III - submetido à piloro-plastia tipo Finney, recebia somente água durante todo o experimento; Grupo IV - submetido à piloro-plastia tipo Finney, recebia nitrato de sódio diluído na água de beber durante todo o experimento.

Procedimento cirúrgico e manuseio das amostras

As operações foram realizadas em todos os grupos, quando os ratos atingiam oito semanas de vida, com peso médio entre 250 g e 350 g. Após jejum de 12 horas para ração e água, eles eram anestesiados, através de injeção intramuscular de cloridrato de zolazepam e cloridrato de tiletamina 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.

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

Nos grupos de piloro-plastia, após a abertura da cavidade procedia-se à tração leve do estômago no sentido caudal, proporcionando perfeita identificação do esfôgado terminal, pré-estômago, estômago

glandular e todo o duodeno. Realizava-se uma sutura contínua serosa 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 piloro, de modo que a incisão ficava parecendo um "U" invertido. A sutura total, unindo estômago e duodeno, iniciava na extremidade superior da sutura serosa, 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 - operação chamada piloro-plastia de Finney (Figura 1). Todas as suturas no estômago e duodeno foram realizadas com fio de prolene nº 7-0 cardiovascular.

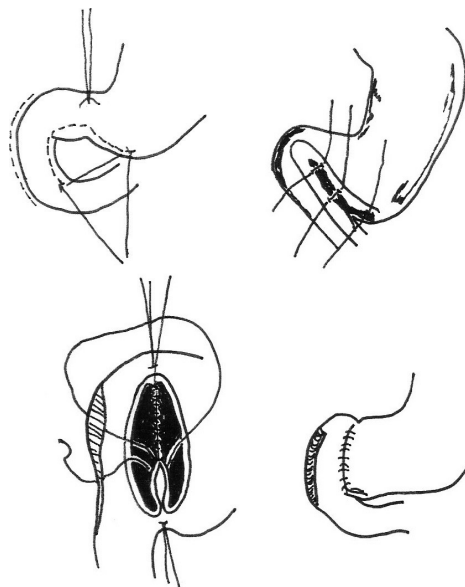


FIGURA 1 – Modelo de piloro-plastia realizada nos Grupos III e IV

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

Quando completaram 50 semanas de pós-operatório eles eram sacrificados, através de inalação de éter etílico em campânula fechada, de forma indolor. O tempo decorrido entre a morte do animal e a necropsia 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 esfôgado torácico até a região cervical com ressecção, em bloco, do esfôgado, 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.

Após a ligadura do duodeno, para que não houvesse refluxo devido à manipulação, realizava-se entubação oroesofagogástrica com sonda de nelaton nº 12 e instilação de 5 ml de solução salina no estômago. O conteúdo gástrico era aspirado e colocado em dois frascos identificados e armazenados em freezer a -70°C para posterior análise do pH e concentração de ácidos biliares.

A análise do pH era realizada no Laboratório de Fisiologia Digestiva do Instituto de Biociências da UFRGS, através de um pHmetro B374 marca micronal.

A dosagem dos ácidos biliares era realizada no Laboratório de Pesquisa do HCPA, através do kit Bele Acids fornecido pelo laboratório Sigma que usa método colorimétrico e enzimático pela enzima 3-alfa-Hydroxysteroid dehydrogenase conforme técnica descrita por Fausa e Skalhogg⁹.

O exame macroscópico foi realizado com o auxílio de uma lupa. O número, tamanho, posição e características de cada lesão foram anotados. Para descrição utilizou-se a terminologia anatômica proposta por Robert²⁹.

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 quatro micrômetros de espessura, cortados em micrótomo Aotec, com navalhas descartáveis, foram corados por hematoxilina-eosina.

Os cortes histológicos foram todos examinados em microscópio óptico comum, por um mesmo patologista que desconhecia o tipo de tratamento realizado no espécime em estudo. As alterações histopatológicas foram classificadas como: 1) 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, fúndicas ou cárdicas, dependendo da zona estudada; 2) 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; 3) 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; 4) hiperplasia epitelial escamosa: espessamento do epitélio às custas do aumento do número de células; 5) hiperplasia glandular: proliferação da mucosa glandular sem atipia ou destruição da arquitetura tecidual; 6) 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; 7) granuloma de corpo estranho: agregado de macrófagos ao redor de partícula estranha (fio cirúrgico) formando granuloma; 8) papiloma escamoso: neoplasia benigna do epitélio escamoso, geralmente de padrão exofítico, com hiperplasia epitelial e queratinização; 9) 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; 10) displasia: leve (baixo grau) - alteração das camadas celulares basais, atingindo até um terço da espessura do epitélio, com núcleos pleomórficos ocorrendo 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 com polaridade nuclear perdida; 11) 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: 1) estágio 1: esôfago e estômago normais, gastrite leve e moderada; 2) estágio 2: hiperplasia epitelial, hiperplasia glandular, gastrite acentuada e úlcera; 3) estágio 3: granuloma de corpo estranho e implantação mucosa; 4) estágio 4: papiloma e adenoma; 5) estágio 5: displasia; 6) estágio 6: adenocarcinoma.

Análise estatística

Foram utilizados os seguintes testes: Qui-quadrado para comparar proporções entre mais do que dois grupos, com correção de Yates para comparações entre os grupos 2 a 2; teste de Kruskal-Wallis para comparar dados contínuos e variáveis ordinais entre mais do que dois grupos; teste de Mann-Whitney para comparar dados contínuos e variáveis ordinais entre grupos individuais. O nível de significância utilizado foi de 5%. 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 vs percentil 25 e percentil 75) O banco de dados foi convertido para análise no pacote estatístico SPSS versão 8.0 para Windows.

RESULTADOS

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 causa definida em três ratos, perfuração do pré-estômago em dois

e indeterminada em cinco. Dez animais 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 identificou-se 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 e são o objeto deste estudo.

As variações do peso no decorrer do experimento não apresentaram diferença entre os grupos.

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. Nesse caso havia obstrução total do trânsito devido a tumor gástrico e refluxo de conteúdo para o esôfago com dilatação dele. 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.

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

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 I) e 16,6% desenvolveram papilomas no pré-estômago (estágio 4). Não houve diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos. Pôde-se notar que houve desenvolvimento de adenocarcinoma (estágio 6) no estômago dos ratos submetidos à piloro-plastia (Grupos III e IV).

No grupo submetido à piloro-plastia isolada (Grupo III), em 10 ratos (34,4%) o achado histológico foi considerado normal (estágio 1); três ratos (10,3%) desenvolveram adenomas (estágio 4) e 16 (55,1%) adenocarcinoma. Comparando-se o Grupo III com os Grupos I e II, encontrou-se diferença significativa ($p=0.0001$).

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

Gr n°	Experimento	n	Estágio					
			1	2	3	4	5	6
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	Piloro-plastia	29	10 (34,4%)	0	0	3 (10,3%)	0	16 (55,1%) ^{ab}
IV	Piloro-plastia + Nitrito de sódio	35	12 (34,2%)	2 (5,7%)	10 (28,5%)	5 (14,2%)	1 (2,8%)	5 (14,2%) ^c

No grupo submetido à piloro-plastia e que recebeu NaNO₂ na água de beber (Grupo IV), em 12 ratos (34,2%) o achado histológico foi considerado normal; em dois (5,7%) foram encontradas alterações inflamatórias reacionais como úlcera, gastrite acentuada, hiperplasia glandular e epitelial (estágio 2); 10 (28,5%) apresentaram implantação mucosa e granuloma, de corpo estranho, na zona de anastomose (estágio 3); cinco (14,2%) desenvolveram adenomas (estágio 4); em um rato (2,8%) foi encontrada displasia de alto grau (estágio 5); cinco (14,2%) desenvolveram adenocarcinoma gástrico (estágio 6). A diferença foi significativa entre o Grupo IV e o Grupo I, $p=0.0001$, e o Grupo III, $p=0.01$. Comparando o grupo III e o grupo IV, a diferença também foi significativa, $p=0.03$. Não foi encontrada metaplasia intestinal. Todos os adenocarcinomas eram do tipo intestinal, bem ou moderadamente diferenciados.

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

Concentração de ácidos biliares e pH

O valor do pH e a concentração de ácidos biliares no suco gástrico estão demonstrados nas Figuras 2 e 3, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa no valor do pH entre os grupos; a mediana

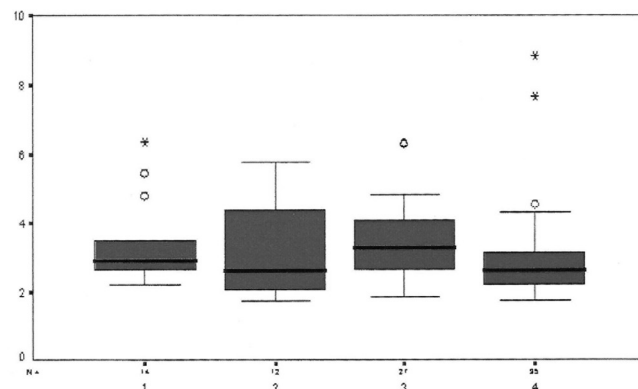


FIGURA 2 – Gráfico de box-plot, comparando o valor do pH nos diferentes grupos. A mediana é representada pela linha horizontal central do box (em negrito) e os quartis inferiores (P25) e superior (P75) pelas linhas inferiores e superiores que delimitam o box. Os valores mínimos e máximos são representados pelas linhas verticais que saem do box (whiskers) e os valores discrepantes estão assinalados por *.

DISCUSSÃO

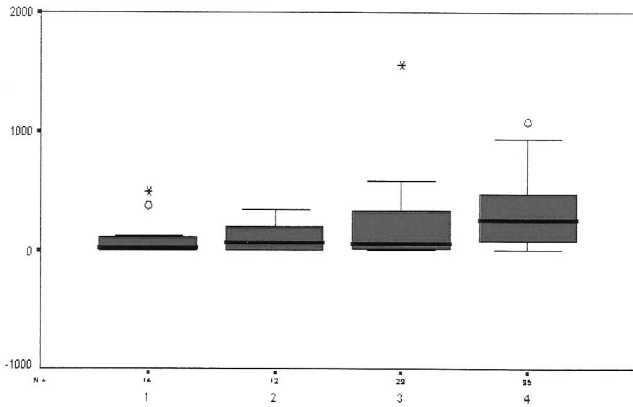


FIGURA 3 – Gráfico de box-plot, comparando concentração de ácido biliares diferentes grupos. A mediana é representada pela linha horizontal central do box (em negrito) e os quartis inferiores (P25) e superior (P57) pelas linhas inferiores e superiores que delimitam o box. Os valores mínimos e máximos são representados pelas linhas verticais que saem do box (whiskers) e os valores discrepantes estão assinalados por ° e *. Grupo IV > I e II, p=0,01

foi 2.9 (Grupo I), 2.6 (Grupo H), 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 mol/l) em relação aos Grupos I (22 mol/l) (p=0.002) e II (76.5 mol/l) (p=0.01). A Figura 4 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 mol/l no geral. Analisando-se somente os casos com tumores, parcial ou totalmente obstrutivos, verifica-se que a mediana caiu para 25 mol/l e nos casos sem obstrução ela foi de 114 mol/l.

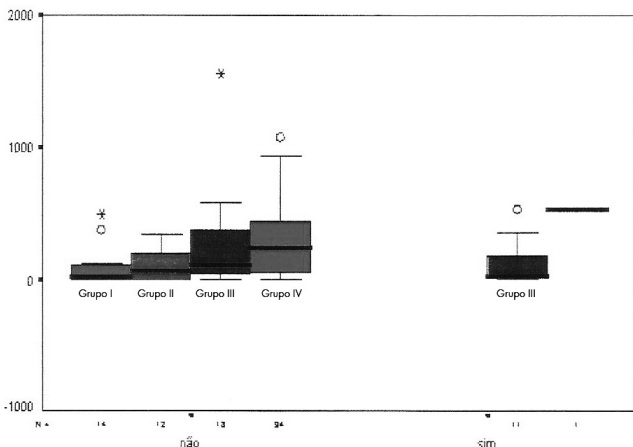


FIGURA 4 – Gráfico de box-plot, comparando concentração de ácido biliares nos ratos com ou sem tumores obstrutivos, nos diferentes grupos. A mediana é representada pela linha horizontal central do box (em negrito) e os quartis inferiores (P25) e superior (P57) pelas linhas inferiores e superiores que 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 ° e *. Grupo IV > I e II, p=0,01

Existem evidências de que o carcinoma no estômago operado e o câncer no estômago virgem de operação possuem processo carcinogênico semelhante, baseadas em aspectos clínicos, achados histopatológicos e alterações do gene p53 comuns a ambos³⁰. Estudos que avaliaram aspectos genéticos, biologia molecular e infecções em carcinomas de estômagos operados ou não, encontraram diferença com relação à infecção por *H. pylori* e vírus Epstein-Barr, sugerindo que possam existir alguns fatores etiológicos diferentes^{2,36}. 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 duodenogástrico de várias intensidades e técnicas onde não é ressecado o estômago, mas existe refluxo de conteúdo duodenal, tem incidências de adenocarcinoma variando em até 71%. 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 ampla comunicação e, teoricamente, grau de refluxo aumentado. Não encontrou-se na literatura nenhuma referência que houvesse utilizado esta técnica cirúrgica na indução de tumores gástricos. Em gastroenteroanastomose o suco duodenal passa necessariamente pela zona de anastomose para seguir o trânsito e na piloroplastia não existe esta obrigatoriedade. Portanto, poder-se-ia 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 vísceras²⁵ e laparotomia com gastrotomia²¹. Em ambos os casos não se têm encontrado alterações significativas na mucosa gástrica. Nishidoi, Koga e Kaibara²⁷ 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.³⁵ 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 duodenogástrico 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 relação com a operação. No entanto, 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 operação 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. Alguns autores têm considerado somente os critérios de invasão de submucosa ou muscular para definir como adenocarcinoma a proliferação glandular excessiva²⁷. Outros, consideram absolutamente necessários padrões rígidos, baseados em critérios citológicos, para diferenciar as distopias intramucosas causadas pelo traumatismo cirúrgico dos carcinomas genuínos¹⁸. 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.¹⁷ definem a invaginação de mucosa glandular para dentro da submucosa, subserosa ou muscular na zona de anastomose como "mucosa implantada". Nos casos em que ocorreu essa invaginação de glândulas para baixo da muscular, havia 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 e Nomura³¹ 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 cinco ratos foi encontrado adenocarcinoma mas, considerando-se as vias de desenvolvimento de câncer no estômago operado de ratos, os cinco 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 duodenogástrico esperado. A concentração total de ácidos biliares no conteúdo gástrico dos ratos do Grupo IV foi significativamente maior do que nos Grupos I e II ($p=0.002$; $p=0.01$) confirmando a ocorrência de refluxo duodenogástrico. 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. 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. 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. Embora a proliferação de bactérias redutoras de nitritos possa ser quantificada, não foi objetivo deste estudo avaliá-la 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 é de 180 mg/kg/peso e a metahemoglobinemia é usada como índice de toxicidade. Utilizou-se a concentração máxima de NaNO_2 tolerada pelo rato, 3 g/l e não observou-se metahemoglobinemia.

Os trabalhos que estudaram a carcinogênese experimental dos nitritos apresentam resultados controversos. 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.¹ encontraram carcinoma em 5,6% dos ratos operados com gastrojejunostomia ou gastrectomia com ressecção a BII associadas à vagotomia troncular, acompanhados por oito meses, e que receberam nitrito de potássio na água de beber. Em extensa revisão sobre nitritos, nitratos e compostos nitrosos, Gangolli et al.¹¹ concluíram que não existem evidências nos estudos experimentais de que o nitrito seja carcinógeno para animais.

Ao comparar-se o Grupo III e o Grupo IV, que só diferem no desenho experimental devido à ingestão

de nitrito de sódio na água de beber, observou-se que houve diferença significativa nos achados histológicos. O grupo que recebeu nitrito de sódio (IV) teve 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 duodenogástrico 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. Por outro lado, sabe-se que para o nitrito ser um agente nitrosante, ele precisa ser acidificado para formar HNO₂²⁴. Além disto, o rato é capaz de sintetizar o ácido L-ascórbico, o qual é efetivo em bloquear a nitrosação intragástrica. 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 duodenogástrico 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 ácido³².

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.

CONCLUSÕES

A piloroplastia à Finney, sem necessidade de carcinógeno externo, é um modelo experimental adequado de carcinogênese gástrica em ratos e ela causou refluxo duodenogástrico; este refluxo atuou como carcinógeno para o estômago. Não houve relação entre o pH gástrico e o desenvolvimento de adenocarcinoma. O nitrito de sódio não atuou como carcinógeno para o estômago.

1. Andreollo NA, Brandalise NA, Lopes LR, Leonardi LS, Alcantara F. Are the nitrites and nitrates responsible for the carcinoma in the operated stomach? *Acta cir. bras*;10(3):103-6, jul.-set. 1995.
2. Baas IO, van Rees BP, Musler A, Craanen ME, Tytgat GN, van den Berg FM, Offerhaus GJ. *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*. 1998 Sep;51(9):662-6.
3. Balfour DC. Factors influencing the life expectancy of patients operated on for gastric ulcer. *Ann Surg*. 1922 Sep;76(3):405-8.
4. Bartsch H, Ohshima H, Pignatelli B, Calmels S. Human exposure to endogenous N-nitroso compounds: quantitative estimates in subjects at high risk for cancer of the oral cavity, oesophagus, stomach and urinary bladder. *Cancer Surv*. 1989;8(2):335-62.
5. Berger Z, Gil LC, Latorre R, Madrid AM, Maiza E, Oksenberg D, Pimentel C, Brahm J. Duodenogastric reflux. *Rev Med Chil*. 1999 Feb;127(2):243-5.
6. Bralow SP. Experimental gastric carcinogenesis. *Digestion*. 1972;5(5):290-310.
7. Caygill CP, Leach SA, Kirkham JS, Northfield TC, Hall CN, Hill MJ. Gastric hypoacidity as a risk factor for gastric and other cancers. *IARC Sci Publ*. 1987;(84):524-6.
8. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet*. 1975 Jul 12;2(7924):58-60.
9. Fausa O, Skälhegg BA. Quantitative determination of bile acids and their conjugates using thin-layer chromatography and a purified 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Scand J Gastroenterol*. 1974;9(3):249-54.
10. Fein M, Peters JH, Chandrasoma P, Ireland AP, Oberg S, Ritter MP, Bremner CG, Hagen JA, DeMeester TR. Duodeno-esophageal reflux induces esophageal adenocarcinoma without exogenous carcinogen. *J Gastrointest Surg*. 1998 May-Jun;2(3):260-8.
11. Gangolli SD, van den Brandt PA, Feron VJ, Janzowsky C, Koeman JH, Speijers GJ, Spiegelhalter B, Walker R, Wisnok JS. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *Eur J Pharmacol*. 1994 Nov 1;292(1):1-38.
12. Hasegawa H. Duodenogastric reflux and gastric carcinogenesis in rats. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*. 1991 Aug;88(8):1517-24.
13. Kaaks R, Tuyns AJ, Haelterman M, Riboli E. Nutrient intake patterns and gastric cancer risk: a case-control study in Belgium. *Int J Cancer*. 1998 Nov 9;78(4):415-20.
14. Klingler PJ, Perdakis G, Wilson P, Hinder RA. Indications, technical modalities and results of the duodenal switch operation for pathologic duodenogastric reflux. *Hepatogastroenterology*. 1999 Jan-Feb;46(25):97-102.
15. Kobayashi S, Prolla JC, Kirsner JB. Late gastric carcinoma developing after surgery for benign conditions. Endoscopic and histologic studies of the anastomosis and diagnostic problems. *Am J Dig Dis*. 1970 Oct;15(10):905-12.
16. Kobayasi S, Naresse LE, Leite C, Saad LHC, Tanaka CM, Rodrigues MAM. Alterações benignas do coto gástrico após gastrectomia parcial por doença benigna. *Ged Gastroenterol Endosc Dig*. 1995;14(2):65-8.
17. Kobayasi S, Tatematsu M, Ogawa K, de Camargo JL, Rodrigues MA, Ito N. Reversibility of adenomatous hyperplasia in the gastric stump after diversion of bile reflux in rats. *Carcinogenesis*. 1991 Aug;12(8):1437-43.
18. Kondo K, Kojima H, Akiyama S, Ito K, Takagi H. Pathogenesis of adenocarcinoma induced by gastrojejunostomy in Wistar rats: role of duodenogastric reflux. *Carcinogenesis*. 1995 Aug;16(8):1747-51.
19. Kono S, Hirohata T. Nutrition and stomach cancer. *Cancer Causes Control*. 1996 Jan;7(1):41-55.
20. 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*. 1994 Jul-Aug;3(5):393-8.
21. Matsumoto H. Mutagenicity of gastric and duodenal juice on gastric carcinogenesis in rats with duodenal reflux. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 1994 Jun;95(6):368-75.

22. Mirvish SS, Wallcave L, Eagen M, Shubik P. Ascorbate-nitrite reaction: possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. *Science*. 1972 Jul 7;177(43):65-8.
23. Mirvish SS. *J Natl Cancer Inst*. 1983 Sep;71(3):629-47.
24. Mirvish SS. Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett*. 1995 Jun 29;93(1):17-48.
25. 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. *Br J Cancer*. 1994 Aug;70(2):185-9.
26. 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-fluorenylacetylamide. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1961 Jun;5:1-53.
27. 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 Natl Cancer Inst*. 1984 Jun;72(6):1431-5.
28. Ritchie WP Jr. Alkaline reflux gastritis. An objective assessment of its diagnosis and treatment. *Ann Surg*. 1980 Sep;192(3):288-98.
29. Robert A. Proposed terminology for the anatomy of the rat stomach. *Gastroenterology*. 1971 Feb;60(2):344-5.
30. Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro Júnior U, Reynolds JC, Gama-Rodrigues JJ, Iriya K, Kim R, Bakker A, Swalsky PA, Pinotti HW, Finkelstein SD. Morphologic, histologic, and molecular similarities between adenocarcinomas arising in the gastric stump and the intact stomach. *Cancer*. 1996 Dec 1;78(11):2288-99.
31. Schlake W, Nomura K. Histogenesis of carcinoma in the glandular stomach of the rat after B I resection. *Curr Top Pathol*. 1979;67:1-67.
32. Stein HJ, Kauer WK, Feussner H, Siewert JR. Bile acids as components of the duodenogastric refluxate: detection, relationship to bilirubin, mechanism of injury, and clinical relevance. *Hepatogastroenterology*. 1999 Jan-Feb;46(25):66-73.
33. Sugimura T, Fujimura S. Tumour production in glandular stomach of rat by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Nature*. 1967 Dec 2;216(5118):943-4.
34. Tarso L, Meyer FS, Cioato MG, Meurer L, Schirmer CC. O modelo experimental de carcinogênese gástrica induzido por n-methyl-n-nitrosourea em ratos F344 e camundongos C3H é válido para os ratos Wistar? *ABCD Arq Bras Cir Dig*. 2011;24(1): 55-58.
35. Taylor PR, Mason RC, Filipe MI, Vaja S, Hanley DC, Murphy GM, Dowling RH, McColl I. Gastric carcinogenesis in the rat induced by duodenogastric reflux without carcinogens: morphology, mucin histochemistry, polyamine metabolism, and labelling index. *Gut*. 1991 Dec;32(12):1447-54.
36. van Rees BP, Musler A, Caspers E, Drillenburger P, Craanen ME, Polkowski W, Chibowski D, Offerhaus GJ. K-ras mutations in gastric stump carcinomas and in carcinomas from the non-operated stomach. *Hepatogastroenterology*. 1999 May-Jun;46(27):2063-8.
37. Wetscher GJ, Hinder RA, Smyrk T, Perdakis G, Adrian TE, Profanter C. Gastric acid blockade with omeprazole promotes gastric carcinogenesis induced by duodenogastric reflux. *Dig Dis Sci*. 1999 Jun;44(6):1132-5.