

Efeito do celecoxibe nas alterações microscópicas da mucosa esofágica de ratos causadas por esofagojejunostomia

Effect of the celecoxib in microscopic changes of the esophageal mucosal of rats induced by esofagojejunostomy

AUSTRY FERREIRA DE LIMA, ACBC-AL¹; LAERCIO GOMES LOURENÇO, TCBC-SP²; DÉLCIO MATOS²; CÉLIO FERNANDO DE SOUSA RODRIGUES³

R E S U M O

Objetivo: avaliar o efeito do celecoxibe como função protetora na mucosa esofágica, em ratos machos Wistar, submetidos à esofagojejunostomia. **Métodos:** sessenta animais oriundos do biotério da Universidade de Ciências da Saúde de Alagoas foram utilizados para o experimento. Os animais foram distribuídos em quatro grupos: Grupo I, 15 ratos que foram submetidos à esofagojejunostomia e que utilizaram o celecoxibe no pós-operatório, Grupo II, 15 ratos submetidos à esofagojejunostomia sem uso de celecoxibe, Grupo III, 15 ratos submetidos à celiotomia com manipulação de alças, e Grupo IV, 15 ratos sem cirurgia e que utilizaram celecoxibe. O período de observação foi de 90 dias. Após a morte dos animais, o seguimento distal do esôfago foi ressecado e enviado para análise macro e microscópicas. **Resultados:** a esofagojejunostomia causou esofagite macro e microscópica. A esofagite foi igual tanto no grupo I quanto no II. Nos animais dos grupos III e IV não foram desenvolvidas lesões esofagianas. **Conclusões:** o celecoxibe não teve efeito protetor nem indutor nas esofagites, mas obteve efeito protetor nas displasias dos animais do grupo I.

Descritores: Esofagite de refluxo. Epitélio/histologia. Inflamação. Cirurgia. Ratos Wistar.

INTRODUÇÃO

A doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) tem grande relevância médico social pela elevada e crescente incidência e por determinar sintomas de intensidade variável, que se manifestam por tempo prolongado, podendo prejudicar a qualidade de vida do doente¹. É uma condição comum que afeta em torno de 20 a 50% dos adultos nos países ocidentais².

A pirose isolada foi observada em 17,8% dos adultos acometidos por esta doença. No ocidente, a incidência de DRGE é estimada entre 10 e 20 % em adultos³.

A DRGE foi definida como uma condição que se desenvolve quando o refluxo do conteúdo do estômago para o esôfago causa sintomas e/ou complicações^{4,5}. Foi avaliada a prevalência dos sintomas do DRGE e observou-se a ocorrência semanal de sensação de queimação retroesternal e regurgitação ácida. Estes sintomas estariam presentes em aproximadamente 2% de crianças entre três e nove anos de idade, em 5% a 8% em crianças entre dez e 17 anos.

Nos EUA, mais de 50% dos adultos relatam pirose pelo menos uma vez por semana e um quarto usam medicações antissecretoras pelo menos três vezes por semana.

No Brasil, em estudo populacional com abrangência nacional, a pirose (uma vez por semana), estava presente em 4,6% da amostra. Quando a ocorrência de pirose era de uma ou duas vezes por semana a prevalência foi 7,3%. Estima-se que aproximadamente 12% da população brasileira tenha a DRGE, sem que tal análise tenha incluído aqueles com manifestações atípicas, os quais certamente devem aumentar este número⁶.

Em 1893, o químico alemão Félix Hoffman descobriu o agente anti-inflamatório ácido acetilsalicílico largamente prescrito e usado em todo o mundo. O seu mecanismo de ação somente foi esclarecido em 1971, quando John Vane propôs que os anti-inflamatórios, semelhantes à aspirina, suprimissem o processo inflamatório pela inibição da enzima ciclooxigenase (COX), impedindo assim a síntese das prostaglandinas⁷. A COX catalisa as prostaglandinas, também conhecida como Prostaglandina Sintetase ou Prostaglandina Endoperóxido Sintetase. Essas prostaglandinas foram isoladas em 1976 e clonadas em 1988. Em 1991 foi identificado um gene que codifica uma segunda isoforma da enzima, então denominada de ciclooxigenase-2 (COX2). Sabe-se, atualmente, que dois genes expressam duas isoformas distintas bastante similares da enzima: a ciclooxigenase-1 (COX1) e a ciclooxigenase-2 (COX2). As duas isoformas têm estrutu-

1. Programa de Pós Graduação em Gastroenterologia Cirúrgica - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP); 2. Disciplina de Gastroenterologia Cirúrgica Escola Paulista de Medicina (UNIFESP); 3. Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

ras proteicas similares e catalisam essencialmente a mesma reação⁸⁻¹³.

O conjunto desses agentes originou uma nova geração de anti-inflamatórios (inibidores seletivos da COX2), denominados de coxibes^{14,15}.

Mais recentemente, novas motivações para o uso clínico e para pesquisa foram encontradas com a descrição de uma terceira variante da ciclooxigenase denominada de COX3¹⁶. Estudos demonstraram que tanto na esofagite quanto no esôfago de Barret e no adenocarcinoma, a concentração de COX2 está elevada¹⁷⁻¹⁹.

Embora substâncias como a COX2 e outras tenham importantes papéis conhecidos em vários eventos anti-inflamatórios, a patogênese na doença do refluxo gastroesofágico ainda é desconhecida. Em modelo de esofagite de refluxo induzida, em ratos, observou-se um significativo aumento na expressão de COX2, evidenciando o seu importante papel na patogênese da esofagite²⁰.

O celecoxibe é uma droga com ação anti-inflamatória e analgésica. A despeito do seu efeito, há ainda carência de estudos principalmente farmacológicos, que investiguem suas reais ações moleculares e celulares, assim como sua interferência no metabolismo celular, no estresse oxidativo e na expressão de proteínas encadeadas no desenvolvimento de determinadas enfermidades. Esta pesquisa tem por objetivo avaliar se o celecoxibe exerce alguma função protetora sobre a mucosa esofágica de ratos submetidos à esofagojejunostomia.

MÉTODOS

No período de janeiro de 2009 a dezembro de 2010 foram utilizados nesta pesquisa, 60 animais, com idade entre três e quatro meses, peso médio de 350g e aclimatados às condições do Biotério da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas – UNCISAL. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/EPM com o número 1872/0.

Os animais foram engaiolados, no máximo três animais em cada gaiola, e ficaram em jejum por 12 horas antes da operação. O período de observação para os quatro grupos foi 90 dias. O celecoxibe foi ministrado por via oral na dosagem de 10mg/kg/dia, de acordo com outros estudos²¹⁻²³.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos: Grupo I, 15 ratos que foram submetidos à esofagojejunostomia e que receberam o celecoxibe no pós-operatório; Grupo II, 15 ratos submetidos à esofagojejunostomia sem uso de celecoxibe; Grupo III, 15 ratos submetidos à celiotomia com manipulação de alças; Grupo IV, 15 ratos sem esofagojejunostomia e que receberam celecoxibe (Tabela 1).

A técnica anestésica utilizada foi por injeção intraperitoneal de solução de cloridrato de cetamina (80 a 100mg/Kg), associada a 10mg/kg de xilazina para relaxa-

Tabela 1 – Distribuição dos ratos conforme procedimento e uso da droga.

Grupo	Total	Operação	Droga
I	15	100%	100%
II	15	100%	0%
III	15	100%	0%
IV	15	0%	100%

mento²⁴. Todos os animais foram operados em condições assépticas, aclimatados e receberam alimentação *ad libitum* a partir do terceiro dia de pós-operatório.

Os animais foram submetidos à antisepsia da parede abdominal com iodo polivinil polirridona e assepsia. A celiotomia foi mediana a partir do apêndice xifoide até o terço médio abdominal, incluindo a pele, tecido celular subcutâneo, plano músculo aponeurótico e peritônio parietal. Nos grupos I e II procedemos à visualização, reparo e abertura de 0,5cm do jejuno, distando 10cm da junção duodenojejunal. A dissecação do esôfago distal foi feita pela liberação dos ligamentos hepáticos. Com auxílio de lupa com amplitude de 10x, realizou-se a abertura de 1,0cm do esôfago no sentido longitudinal sendo feita a anastomose esôfago jejunal látero-lateral (Figura 1) com fio de prolene 7-0 com agulha atraumática em sutura contínua nos grupos I e II; em seguida, procedeu-se imediatamente ao fechamento do plano músculo aponeurótico com fio de *catgut* cromado 5-0 e da pele com nylon 5-0, ambos com sutura contínua.

Nos grupos I e IV foram oferecidos 10mg/Kg/dia de Celecoxibe via oral, sob gavagem, utilizando-se uma seringa de 1ml, a partir do terceiro dia de pós-operatório, até o dia em que foram sacrificados.

Todos os animais foram mantidos no pós-operatório sob as mesmas condições ambientais. A analgesia



Figura 1 - Anastomose Esôfago jejunal látero-lateral.

pós-operatória foi feita com dipirona 20mg, através de gavagem por três dias. Nas primeiras 24 horas os animais recebiam apenas água *ad libitum* na forma de solução de glicose a 5%. A Labina extrusada, dieta apropriada para esse tipo de animal, foi iniciada a partir do terceiro dia. Os animais eram pesados quinzenalmente.

Ao final de 90 dias os animais foram mortos com injeção intraperitoneal de tionembutal na dosagem de 50mg/kg e injeção de cloreto de potássio intracardíaca logo em seguida. As peças foram retiradas (Figura 2) e encaminhadas ao serviço de Anatomia Patológica da Santa Casa de Misericórdia de Maceió para a realização do exame histopatológico.

A macroscopia foi realizada medindo as peças, seguida de cortes longitudinais em toda a sua extensão, desidratação, parafinização, cortes histológicos, coloração pela técnica da hematoxilina e eosina, seguida por análise com microscópio óptico, com objetivas de 10x e 40x, feita por dois patologistas diferentes, sem que houvesse conhecimento do material entre os eles.

Diante dos achados de nossa amostra, duas avaliações estatísticas foram utilizadas: o teste exato de Fisher nos Grupos I e II, para avaliar uso ou não da droga, e o risco relativo foi aplicado também nos Grupos I e II, para avaliar as displasias de alto e baixo grau.

RESULTADOS

A esofagite com displasia foi encontrada em 28 animais, sendo que 13 apresentavam displasia de alto grau e 15, displasia baixo grau. As seguintes alterações microscópicas estavam presentes nos animais do grupo I: esofagite crônica com displasia de alto grau em três animais (Figura 3), esofagite crônica com displasia de baixo grau em dez animais e adenocarcinoma em dois ratos. Nos animais do grupo II foram encontradas: esofagite crônica com displasia de alto grau em dez animais esofagite crônica com displasia de baixo grau em cinco animais. Os ratos do grupo I quando comparados aos do grupo II com o desfecho displasia de alto grau obtiveram risco relativo de 0,29 (71% de efeito protetor) calculado pela razão das incidências. Não foram encontradas alterações microscópicas da mucosa esofágica nos ratos dos grupos III e IV.

DISCUSSÃO

A pesquisa cirúrgica em animais utilizados em laboratório tem se expandido nas últimas décadas, em decorrência do melhor suporte anestésico, da sofisticação da infraestrutura de material para monitorização contínua per-operatória e de uma busca incessante por modelos que reproduzam condições mórbidas da espécie humana. Os focos principais destas pesquisas têm sido aprimorar o conhecimento acerca dos mecanismos fisiopatológicos de



Figura 2 - Peça para exame histológico: esôfago dilatado, alças aferente e eferente, estômago, baço e anastomose esofagojejunal.

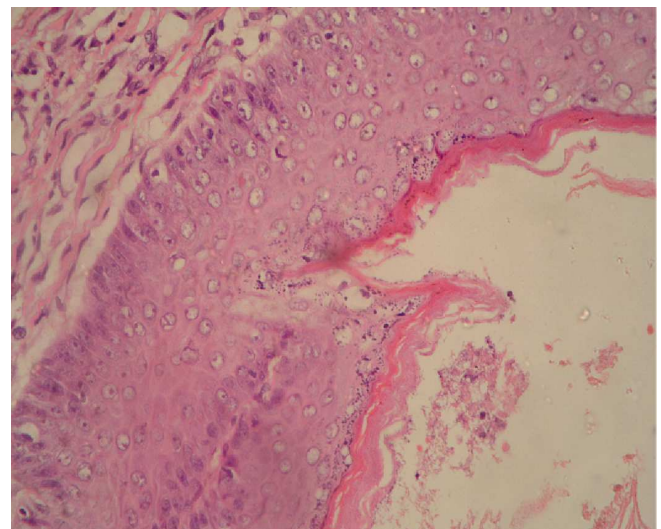


Figura 3 - Esofagite com displasia de alto grau.

doenças, incrementar ensaios terapêuticos com novos fármacos, estudar marcadores biológicos, com perspectivas de aplicabilidade na espécie humana.

Dos 86 animais estudados, 26 (30,2%) morreram antes do tempo estipulado para pesquisa, o que consideramos como mortes precoces, e tendo como causas: três abscessos intracavitários, oito casos de broncoaspiração, três casos de estenose na anastomose e em 12 casos não encontramos a causa.

Todos foram necropsiados logo após o óbito. Nos casos em que a causa morte não foi encontrada, a hipótese de que o anestésico, o relaxante muscular ou mesmo a dipirona usada, tenha sido a causa, não foi descartada,

uma vez que a xilazina, apesar de induzir a uma rápida e eficaz sedação e analgesia, pode apresentar efeitos nocivos como hipotensão e bradicardia.

Os laudos histopatológicos confirmaram a presença de esofagite com graus diferentes de displasia em 28 animais, sendo 13 com displasia de alto grau e 15 com baixo grau além de dois casos de adenocarcinoma invasor. No tocante à displasia, o seu diagnóstico foi baseado em alterações citológicas e estruturais do algoritmo proposto por Montgomery, em 2002, que permite distinguir alterações epiteliais para displasias de baixo ou alto grau. O algoritmo baseia-se nas principais características histológicas encontradas no esôfago de Barrett²⁵. O aglomerado de glândulas de tamanhos e formas variadas com ramificações ou arranjos cribiformes constitui alteração arquitetural importante. A maturação epitelial é atributo chave para o diagnóstico de displasia^{25,26}. A displasia deve ser analisada comparando-se as células de porções profundas da mucosa com as superficiais. As características citológicas, pertencentes ao algoritmo de Montgomery devem ser analisadas nos aumentos maiores ao microscópio. Essas células devem apresentar atipias discretas por aumento de volume de seus núcleos. A polaridade

das células também faz parte do algoritmo de Montgomery e deve ser estudada. A polaridade é normal quando os núcleos se dispõem em paralelo, com o maior eixo perpendicular à membrana basal, sendo a perda da polaridade dos núcleos atributo morfológico característico da displasia de alto grau.

Um estudo, com ratos submetidos à esofagojejunostomia, usando um inibidor da COX2, o rofecoxibe, não evidenciou proteção da mucosa do esôfago. Os autores alegaram que nas lesões graves a proteção não existe, e sugeriram a realização de estudos com modelos de esofagite menos grave²⁷. Ainda, segundo estes autores²⁷, nem a vitamina C nem o rofecoxibe tiveram efeito protetor contra a esofagite causada nesse modelo de refluxo. Essa parece ser a resposta mais plausível para o resultado da nossa pesquisa, levando em consideração também, que Murphy *et al.*²⁷ expôs a mucosa esofágica de seus animais por apenas seis semanas, enquanto que na nossa, a exposição foi de 12 semanas.

Em conclusão, a nossa pesquisa comprovou que o celecoxibe não teve efeito protetor nem indutor nas esofagites, mas exerceu efeito protetor nas displasias dos animais do grupo I.

A B S T R A C T

Objective: To evaluate the protective effect of celecoxib in the esophageal mucosa in rats undergoing esofagojejunostomy.

Methods: Sixty male Wistar rats from the vivarium of the University of Health Sciences of Alagoas were used for the experiment. The animals were divided into four groups: Group I, 15 rats undergoing esofagojejunostomy with the use of celecoxib postoperatively; Group II, 15 rats undergoing esofagojejunostomy without the use of celecoxib; Group III, 15 rats undergoing celiotomy with bowel manipulation; and Group IV, 15 rats without surgery and using celecoxib. The observation period was 90 days. After the death of the animals, the distal segment of the esophagus was resected and sent for microscopic analysis. **Results:** esofagojejunostomy caused macroscopic and microscopic esophagitis. Esophagitis was equal in both groups I and II. In groups III and IV esophageal lesions were not developed. **Conclusion:** celecoxib had neither protective nor inducing effect on esophagitis, but had a protective effect on dysplasia of the animals of group I.

Key words: Esophagitis, peptic. Epithelium/histology. Inflammation. General surgery. Rats, Wistar.

REFERÊNCIA

1. Nasi A, Moraes-Filho JPP, Zilberstein B, Ceconello I, Gama-Rodrigues J. Doença do refluxo gastroesofágico: comparação entre as formas com e sem esofagite, em relação aos dados demográficos e as manifestações sintomáticas. *Arq Gastroenterol.* 2001;38(2):109-15.
2. Labenz J, Jaspersen D, Kulig M, Leodolter A, Lind T, Meyer-Sabellek W, et al. Risk factors for erosive esophagitis: a multivariate analysis based on the ProGERD study initiative. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(9):1652-6.
3. Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Johansson S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut.* 2005;54(5):710-7.
4. Nelson SP, Chen EH, Syniar GM, Christoffel KK. Prevalence of symptoms of gastroesophageal reflux during childhood: a pediatric practice-based survey. Pediatric Practice Research Group. *Arch Pediatric Adolesc Med.* 2000;154(2):150-4.
5. Vakil N, van Zanten SV, Kahrillias P, Dent J, Jones R; Global Consensus Group. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(8):1900-20.
6. Moraes-Filho J, Ceconello I, Gama-Rodrigues J, Castro L, Henry MA, Meneghelli UG, et al. Brazilian consensus on gastroesophageal reflux disease: proposals for assessment, classification and management. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(2):241-8.
7. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.* 1971;231(25):232-5.
8. DeWitt DL, Smith WL. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(5):1412-6. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(14):5056.
9. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthetase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem.* 1991;266(20):12866-72.
10. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(7):2692-6.

11. Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl.* 1997;49:15-9.
12. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:97-120.
13. Kulkarni SK, Jain NK, Singh A. Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2000;22(5):291-8.
14. FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med.* 2001;345(6):433-42.
15. Carvalho WA, LEMONICA L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. In: Braz JRC, Castiglia YMM, organizadores. *Temas de anesthesiologia. Curso de Graduação em Medicina.* 2ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 2000. p. 265-80.
16. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/ antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(21):13926-31.
17. Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schrör K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res.* 1999;59(1):198-204.
18. Zhang F, Altorki NK, Wu YC, Soslow RA, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Duodenal reflux induces cyclooxygenase-2 in the esophageal mucosa of rats: evidence for involvement of bile acids. *Gastroenterology.* 2001;121(6):1391-9.
19. Kaur BS, Khamnehi N, Iravani M, Namburu SS, Lin O, Tradafilopoulos G. Rofecoxib inhibits cyclooxygenase 2 expression and activity and reduce cell proliferation in Barrett's esophagus. *Gastroenterology.* 2002;123(1):60-7.
20. Hayakawa T, Fujywaru Y, Hamaguchi M, Sugawa T, Okuyama M, Sasaki E, et al. Roles of cyclooxygenase 2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 in rat acid reflux oesophagitis. *Gut.* 2006;55(4):450-6.
21. Hu PJ, Yu J, Zeng ZR, Leung WK, Lin HL, Tang BD, et al. Chemoprevention of gastric cancer by celecoxib in rats. *Gut.* 2004;53(2):195-200.
22. Yu J, Tang BD, Leung WK, To KF, Bai AH, Zeng ZR, et al. Different cell kinetic changes in rat stomach cancer after treatment with celecoxib or indomethacin: implications on chemoprevention. *World J Gastroenterol.* 2005;11(1):41-5.
23. Wu YL, Fu SL, Zhang YP, Qiao MM, Chen Y. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress angiogenesis and growth of gastric cancer xenografts. *Biomed Pharmacother.* 2005;59 Suppl 2:S289-92.
24. Flecknell PA. *Laboratory animal anaesthesia: a practical introduction for research workers and technicians.* 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1996.
25. Montgomery E. Update on grading dysplasia in Barrett's esophagus. *Pathol Case Reviews.* 2002;7(1):35-42.
26. Haggitt RC. Barrett's esophagus, dysplasia and adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 1994;25(10):982-93.
27. Murphy JO, Ravi N, Byrne PJ, McDonald GS, Reynolds JV. Neither antioxidants nor COX-2 inhibition protect against esophageal inflammation in an experimental model of severe reflux. *J Surg Res.* 2007;142(1):20-7.

Recebido em 02/01/2013

Aceito para publicação em 15/03/2013

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: nenhuma.

Endereço para correspondência:

Austry Ferreira de Lima

E-mail: austrylima@uol.com.br