

ROBERTO ARENHART PESSINI

**MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOGENESE
ESOFÁGICA EM FRANGOS**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Medicina: Cirurgia da Faculdade
de Medicina da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre**

**Orientador: Prof. Dr. CLEBER DARIO PINTO KRUEL
Co-orientadora: Profa. Dra. MARIA ISABEL ALBANO EDELWEISS**

**Porto Alegre
1997**

ROBERTO ARENHART PESSINI

MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOGENESE
ESOFAGICA EM FRANGOS

Dissertação apresentada ao Conselho de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre em Medicina. Orientador: Cleber Dario Pinto Kruel.

P475m Pessini, Roberto Arenhart.

Modelo experimental de carcinogênese esofágica em frangos / Roberto Arenhart Pessini; orient. Cleber Dario Pinto Kruel. - Porto Alegre : UFRGS, 1997.
98 f. : il. color.

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

1. Carcinogênese esofágica : Modelo experimental. 2. Carcinogênese esofágica : frangos. I. Kruel, Cleber Dario Pinto. II. Título.

C.D.D.: 616.32

C.D.U.: 616.329-006

À minha família, pelo apoio e estímulo em todos os momentos da minha vida, e em especial, ao meu pai, que tenho certeza estará presente entre nós para sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação e, em especial:

Ao Prof. Dr. **Cleber Dario Pinto Krue**, pela orientação, colaboração, coleguismo e, principalmente, pela sua amizade.

À Profa. Dra. **Maria Isabel Edelweiss**, co-orientadora, exemplo de dedicação científica. Sua participação e amizade foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Loreno Brentano**, pelo apoio e incentivo à realização desta dissertação.

Ao Prof. Dr. **Luiz Rohde**, pela compreensão, exemplo de profissionalismo e de dedicação à Universidade.

Ao Dr. **Carlos Cauduro Schirmer**, pela sua colaboração nas fases preliminares do mestrado. A ele minha grande amizade.

Ao Prof. Dr. **Antonio Carlos Pütten**, por ter proporcionado a realização da avaliação histológica na Unidade de Patologia do Hospital de Clínicas.

À Dra. **Angela Hunsche**, pelo seu apoio, colaboração e paciência em todas as fases deste trabalho, todo o meu amor e carinho.

À acadêmica **Márcia Edelweiss**, cuja colaboração foi fundamental para a realização deste trabalho.

À acadêmica **Andrea Centeno**, pelo sua colaboração na fase de coleta de dados.

À Bióloga **Helena Daudt**, pela sua colaboração na fase de coleta de dados.

Ao acadêmico **Marcelo dos Santos**, pela sua colaboração na fase de coleta de dados.

À Sra. **Mônica Borges**, pelo seu auxílio na estruturação desta dissertação.

À Profa. **Clarice Bohn Knies**, pela cuidadosa e minuciosa revisão ortográfica.

À Sra. **Eliane Gomes Gomes**, pelo seu auxílio na preparação do material para análise histológica.

Ao Sr. **Jorge Alberto Lopes**, pelo seu auxílio na preparação do material para análise histológica.

À família do Sr. **Ciro Vedana**, pela sua colaboração nos cuidados dos animais em cativeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
LISTA DE SÍMBOLOS	
RESUMO	
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
3 OBJETIVOS	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Animais	35
4.2 Condições de acondicionamento dos animais	37
4.3 Droga carcinógena e dose	37
4.4 Alimentação	37

4.5 Cronograma de sacrifícios	38
4.6 Métodos de estudo	39
4.7 Colheita do material e processamento	44
4.8 Análise histológica	44
4.9 Análise estatística	46
5 RESULTADOS	47
5.1 Observações gerais	47
5.2 Sexo	50
5.3 Alterações macroscópicas	51
5.4 Alterações microscópicas	53
6 DISCUSSÃO	60
6.1 Modelos experimentais	60
6.2 Droga carcinógena e método de administração	61
6.3 Tempo do experimento, método de sacrifício e número de animais	62
6.4 Análise histológica e classificação das lesões	64
6.5 Resultados	65
7 CONCLUSÕES	68
8 PERSPECTIVAS	69
9 ANEXOS	

ANEXO A - Ração Supra Frango Inicial A. P.....	70
ANEXO B - Lesões microscópicas no grupo solução e controle em relação ao tempo	72
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
11 ABSTRACT	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nitrosaminas encontradas em alimentos	14
Tabela 2 - Principais fontes de nitrosaminas	17
Tabela 3 - Nitrosaminas em estabelecimentos industriais	19
Tabela 4 - Distribuição de animais quanto ao sexo em relação ao tempo	50
Tabela 5 - Distribuição de animais quanto ao sexo em relação ao grupo	50
Tabela 6 - Presença de hiperemia em relação ao tempo no grupo controle	51
Tabela 7 - Presença de hiperemia em relação ao tempo no grupo solução	52
Tabela 8 - Alterações microscópicas no grupo controle	53

Tabela 9 - Alterações microscópicas no grupo solução56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Frango com 10 dias de vida	36
Figura 2 - Delineamento do trabalho	39
Figura 3 - Frango preparado para a necrópsia	40
Figura 4 - Incisão cirúrgica no animal com individualização da peça ..	41
Figura 5 - Peça cirúrgica removida	42
Figura 6 - Peça cirúrgica preparada para a macroscopia com a região dos cortes histológicos	43
Figura 7 - Visualização do canibalismo entre os animais	48
Figura 8 - Animal com perda de penas na região caudal	49
Figura 9 - Microfotografia do esôfago normal de animal do grupo controle. Nota-se as estruturas esofágicas preservadas. (Hematoxilina-Eosina, aumento de 100x)	59

- Figura 10** - Microfotografia do esôfago de animal do grupo solução, mostrando hiperplasia da camada basilar. Abaixo do epitélio pode ser visto infiltrado inflamatório mononuclear. Tempo de experimento: 90 dias. (Hematoxilina-Eosina, aumento de 200x)55
- Figura 11** - Microfotografia do esôfago de animal do grupo solução, mostrando células disceratóticas em lesão intra-epitelial de baixo grau. Tempo de exposição: T4. (Hematoxilina-Eosina, aumento de 250x).57
- Figura 12** - Microfotografia do esôfago de animal do grupo solução, mostrando lesão intra-epitelial de alto grau. Observa-se àrea de ulceração revelando atipias em toda espessura do epitélio.(Hematoxilina-Eosina, aumento de 32x) 58
- Figura 13** - Microfotografia do esôfago de animal do grupo solução, mostrando lesão neoplásica microinvasora. (Hematoxilina-Eosina, aumento de 250x).....59
- Figura 14** - Distribuição do número de animais com hiperemia esofágica em relação ao tempo67

LISTA DE ABREVIATURAS

GEPECE: grupo de estudo e pesquisa em câncer de esôfago

DEN: diethilnitrosamina

NDMA: nitrosodimethylamina

NPYRR: nitrosopyrrolidina

NPIP: nitrosopiperidina

NDELA: nitrosodiethanolamina

NNK: 4-(methylnitrosamina)-1-(3 pyridyl)-butanona

NNN: nitrosornicotina

NMOR: nitrosomorpholina

NBHPA: nitrosobis-(2-hydroxypropyl) amina

NNA1: 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol

NDBA: nitrosodi-n-butylamina

NPhA: nitrosodiphenylamina

NAB: nitrosoanabarina

NMPhA: nitrosomethylphenylamina

NO: óxido de nitrogênio

NO₂: dióxido de nitrogênio

DNA: ácido desoxirribonucleico

RNA: ácido ribonucleico

EGF: fator de crescimento tumoral

EGFR: receptor do fator de crescimento tumoral

DHPN: di (2-hydroxypropil)-nitrosamina

Grupo C: grupo controle

Grupo S: grupo solução

T0: tempo zero

T1: tempo 30 dias

T2: tempo 60 dias

T3: tempo 90 dias

T4: tempo 120 dias

T5: tempo 200 dias

P1: histologia normal

P2: hiperplasia e esofagite

P3: lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau

P4: lesão escamosa intra-epitelial de alto grau

P5: carcinoma epidermóide invasor

LISTA DE SÍMBOLOS

‰: porcento

ug: micrograma

Kg: quilograma

ml: mililitro

l: litro

UI: Unidades Internacionais

mg: miligramas

RESUMO

Foi realizado um estudo experimental em frangos (*Gallus domesticus*) com a finalidade de induzir carcinoma esofágico por diethilnitrosamina na concentração de 0,04 ml/l na água de beber. Utilizaram-se 183 animais divididos em dois grupos: um grupo controle com 54 animais e o grupo contendo a solução, com 129 animais. O experimento se desenrolou por um período de 200 dias, com sacrifícios seriados em 0, 30, 60, 90, 120 e 200 dias. Foi realizada avaliação histológica do esôfago nas várias etapas do experimento. Identificou-se o desenvolvimento de lesões escamosas intra-epiteliais de alto grau e carcinoma invasor nos animais submetidos a ingesta de diethilnitrosamina. Estes achados demonstram que frangos podem ser usados como modelos experimentais de carcinogênese esofágica induzida por diethilnitrosamina

1 INTRODUÇÃO

O câncer de esôfago tem-se mostrado um grande desafio para a medicina atual, pois grande parte dos pacientes são diagnosticados em fase avançada e têm, assim, um mau prognóstico. Somente o diagnóstico precoce representaria uma melhora na expectativa e qualidade de vida dos pacientes com esta patologia.

Vários tipos de nitrosaminas já foram identificadas, sendo que a diethilnitrosamina (DEN), um importante carcinógeno, já foi encontrada em diversos tipos de alimentos, drogas e estabelecimentos industriais.

O uso de animais em experimentos para a melhor compreensão de patologias que acometem humanos, bem como o estudo de compostos químicos e seus efeitos já estão bem estabelecidos. As nitrosaminas já foram usadas em diversas espécies animais nestes estudos, como em macacos, cães, gatos, coelhos, ratos, camundongos e galinhas.

O uso da diethilnitrosamina via oral em galinhas, com a finalidade de induzir carcinoma esofágico, ainda não foi descrito na literatura.

Yang, em estudo realizado na China em 1980, demonstrou um paralelismo na prevalência do câncer de esôfago em humanos e galinhas.

Esta patologia tem sido objeto de vários estudos no Rio Grande do Sul em virtude de serem aí encontradas áreas com incidência mais elevada da doença, em comparação ao resto do país. Em Porto Alegre, especificamente no Hospital de Clínicas, criou-se uma equipe multidisciplinar para o seu estudo (GEPECE), com atuação não só em Porto Alegre como também em municípios vizinhos.

O Curso de Pós-Graduação em Medicina, Cirurgia, na área de concentração do Esôfago, Estômago e Intestino Delgado apresenta uma linha de pesquisa com ênfase no estudo do carcinoma de esôfago.

Devido a esse conjunto de fatores e devido ao fato de que o uso de animais de experimentação contribuem para o melhor entendimento e tratamento de patologias que acometem os humanos, optou-se pela realização deste estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Uma característica do carcinoma de esôfago é o fato de apresentar uma grande variação geográfica em sua incidência (GHARIDIAN et al., 1992). É comumente visto em áreas próximas ao Mar Cáspio, Kasaquistão e Irã, na Bretanha (França), na China, na África do Sul, região de Transkey, no vale do Kashmir na Índia (JASKIEWICZ et al., 1987; OETTLÉ et al., 1986; DHAR et al., 1993; DOWLATSHAHI et al., 1978; GHARIDIAN et al., 1992).

Na China, as zonas de alta incidência se localizam principalmente nas províncias de Shanxi, Henan e Hebei. A população dessas áreas é de cerca de 50 milhões de pessoas, e o índice de mortalidade por câncer de esôfago é de 53.96/100.000 hab./ano. Em

Linxian (Henan), este índice atinge 131.79/100.000 hab./ano (WU et al., 1982; YANG, 1980).

Na porção setentrional da América do Sul, encontram-se zonas de alta e média incidência, sendo o Rio Grande do Sul considerado uma zona de média incidência, com 17 casos/100.000 hab./ano em várias microrregiões (PROLLA, 1992).

Os homens são afetados mais freqüentemente que as mulheres, exceto em algumas poucas áreas do norte do Irã. Geralmente os índices relativos masculino para feminino situam-se em torno de 2:0 e 5:0 (GHARIDIAN et al., 1992).

A maioria dos pacientes com câncer esofágico, no momento do diagnóstico, estão em estágio avançado e a terapia curativa não é mais possível. Naqueles em que a doença é detectada precocemente, particularmente se não há disseminação linfática, a cura é possível (BECKER, 1994).

A taxa de sobrevida em 5 anos esperada para pacientes submetidos a ressecção curativa de câncer de esôfago varia de acordo com a camada afetada: é de 100% quando há envolvimento da mucosa de 37% a 64,3% quando há envolvimento de submucosa e de aproximadamente 33% quando ocorre envolvimento da muscular própria

(KITAMURA et al., 1993; NISHIMAKI et al., 1993; SUGIMACHI et al., 1993).

Tumores esofágicos restritos à mucosa costumam apresentar comportamento biológico diferente dos tumores submucosos, pois metástases para linfonodos e invasão vascular raramente se desenvolvem nos primeiros, mas freqüentemente ocorrem nos últimos, do que resulta uma significativa diferença de expectativa de vida (5 anos) entre eles: 100% para aqueles com câncer restrito à mucosa e em torno de 60% para aqueles com envolvimento submucoso. Pode-se concluir, então, que os tumores restritos à mucosa podem ser ditos precoces, enquanto os que já invadiram a submucosa podem ser considerados avançados (KITAMURA et al., 1993; NISHIMAKI et al., 1993; SUGIMACHI et al., 1993).

Assim, somente o diagnóstico precoce do carcinoma de esôfago pode representar um avanço significativo no aumento de sobrevida, semelhante ao que já ocorreu em relação ao câncer do colo uterino pela utilização da citologia esfoliativa (SUGIMACHI et al., 1993). O uso desse procedimento como rastreamento, tem sido apregoado em zonas de alto risco para o diagnóstico de displasias e do câncer precoce do esôfago, tendo apresentado ótimos resultados (DOWLATSHAHI et al., 1978; GREENEBAUM et al., 1984; JASKIEWIKZ et al., 1987; SHEN et

al., 1993; WU et al., 1982). O balão esofágico para realização da citologia é geralmente seguro, bem tolerado e barato, e não necessita de pessoal especializado (GREENEBAUM et al., 1984; JASKIEWICZ et al., 1987).

A utilização de solução de Lugol no exame endoscópico tem-se mostrado bastante efetiva na demonstração de lesões suspeitas, quando a margem de uma lesão não é clara ou quando há a suspeita de que uma lesão mucosa não tenha sido adequadamente vista. A adequada visualização de uma lesão permite o direcionamento da biópsia, auxiliando, assim, no diagnóstico precoce do carcinoma (ADACHI et al., 1993; SUGIMACHI et al., 1992).

As alterações que podem ser detectadas no tecido epitelial antes de se mostrar um câncer invasivo podem ser divididas em duas categorias:

- 1) lesões menos avançadas, que compartilham características morfológicas com outros processos benignos e não envolvem a proliferação de clones celulares com fenótipos neoplásicos, como nos casos de lesões inflamatórias, atróficas, hiperplásicas e metaplásicas, todas compostas de células maduras;

2) lesões mais avançadas, constituídas de clones de células com fenótipos anormais, a maioria expressa como irregularidades nucleares e perda de polaridade. Elas são consideradas perigosas se não tratadas e são geralmente chamadas de displásicas (CORREA, 1982).

Várias lesões são consideradas precursoras das mais freqüentes formas de câncer esofágico:

1) esofagite - A inflamação crônica é a lesão mais freqüente nas populações de alto risco para o câncer esofágico, sendo muito comum nos grupos de alto risco da África do Sul, Irã e China (CORREA, 1982; CRESPI et al., 1979; CRESPI et al., 1984; CHANG-CLOUDE et al., 1990; OETTLÉ et al., 1986). A esofagite severa e moderada pode criar um ambiente favorável ao desenvolvimento do carcinoma (QIU; YANG, 1988);

2) acantose glicogênica e leucoplasia - O termo acantose glicogênica tem sido aplicado a áreas focais de acúmulo excessivo de glicogênio na superfície das células escamosas da mucosa esofágica e tem sido encontrado em áreas de grande risco em outras populações. Sua importância como precursor não é estabelecida (CORREA, 1982);

3) atrofia - Ela é predominantemente suprapapilar e vem ocasionalmente acompanhada por queratinização anormal e hiperplasia

das células basais, sugerindo um prejuízo à maturação celular (CRESPI et al., 1979; CRESPI et al., 1984);

4) papilomas - São excrescências exofíticas do epitélio esofágico e são ocasionalmente vistos em populações de alto risco e em animais experimentais (ADAMSON et al., 1977; CLAPP; CRAIG, 1967; LEVISON et al., 1979; REUBER, 1975; RUBIO, 1983);

5) displasias - Caracterizam-se pela perda da arquitetura normal do epitélio esofágico, com proliferação de células atípicas e perda parcial da polaridade, e constituem os mais avançados estágios do estado precursor. Vários graus de displasia são encontrados acompanhando o carcinoma invasor e modelos experimentais de primatas (CORREA, 1982). A frequência das lesões displásicas se correlaciona claramente com níveis regionais de câncer (QIU; YANG, 1988). As lesões são geralmente multifocais e localizam-se no terço médio e inferior do esôfago. Em animais experimentais, a origem multicêntrica do câncer esofágico é bem evidente;

6) carcinoma *in situ* é a forma mais avançada da displasia (CORREA, 1982).

Um modelo proposto para descrever a história natural do carcinoma de esôfago envolve a progressão de esofagite crônica para

atrofia, displasia e, finalmente, câncer (CRESPI et al., 1984). Recentemente, Dawsey demonstrou que displasia moderada e severa e carcinoma *in situ* são as únicas lesões associadas a um aumento significativo do risco de desenvolvimento do câncer. Um grau mais elevado de displasia está relacionado com maior risco para câncer, mas displasia severa e carcinoma *in situ* apresentam grau semelhante de risco (DAWSEY et al., 1994).

Várias condições são predisponentes do câncer de esôfago, entre elas o Barret, a Síndrome de Plummer Vinson, a tilose plantar e palmar, as lesões cáusticas, o escleroderma e a acalasia (CRESPI et al., 1979; OETTLÉ et al., 1986).

O carcinoma esofágico mostrou possuir uma associação mais consistente com fatores genéticos que ambientais no que concerne a questão da agregação familiar (HU et al., 1992).

Dentre os vários fatores associados ao câncer esofágico estão a má nutrição, deficiências de molibdênio, manganês, zinco, magnésio e níquel. Também foi evidenciado que deficiências de vitamina A e E e riboflavina aumentam a carcinogênese, enquanto que a vitamina C parece ter uma atividade anticarcinogênica (NAIR et al., 1991; REED et al.,

1991; YANG, 1980; YANG et al., 1984a; CHANG-CLAUDE et al., 1990).

Também há associação entre câncer esofágico e consumo de alimentos fermentados, água quente, álcool, fumo e infecções virais (BURCH, 1984; CHANG et al., 1992; CHANG-CLAUDE et al., 1990; DE STEFANI et al., 1990; IARC, 1993; JOZALA et al., 1983; YANG 1980; YU et al., 1988).

Compostos nitrosos em suas várias formas são conhecidos há longo tempo. Foram relatados pela primeira vez por Guither em 1863, quando a química orgânica era uma ciência nova (LIJINSKY, 1992; FORMAN; SHUKER, 1989).

As nitrosaminas formam um grande grupo de carcinógenos que ocorrem no meio ambiente ou podem ser formados endogenamente pela nitrosação de aminas secundárias e terciárias (MAGEE, 1989).

Após a descoberta da carcinogenicidade da dimethilnitrosamina logo se tornou evidente que sua carcinogenicidade estava associada com a presença do grupo N-nitroso combinado com um grande número de grupos alquil ou outros (MAGEE; BARNES, 1956).

Mais de 300 compostos nitrosos foram relatados como carcinógenos em um ou mais animais, incluindo macacos. Quase todos os

órgãos em uma ou outra espécie de roedores revelaram-se sensíveis a um ou mais compostos (PREUSSMANN; STEWART, 1984b apud MAGEE, 1989).

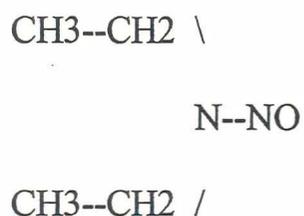
Algumas nitrosaminas podem mostrar marcado organotropismo ou especificidade dependente da estrutura química (DUCKREY et al., 1967 apud MAGEE, 1989). Os órgãos afetados podem variar de espécie para espécie, mas uma importante conclusão é que provavelmente qualquer tumor pode ser causado por nitrosaminas em espécies suscetíveis. Além disso, a incidência total de tumores induzidos quimicamente é diretamente proporcional à dose total, e o período latente antes do aparecimento dos tumores é inversamente proporcional à dose (DRUCKREY; KÜPFMÜLLER, 1948 apud MAGEE, 1989).

A exposição humana aos compostos nitrosos envolve componentes exógenos e endógenos. A exposição exógena é influenciada por fatores relacionados ao estilo de vida e tipo de ocupação. Já a exposição endógena envolve a formação *in vivo* de compostos nitrosos a partir de aminas precursoras e agentes nitrosantes, como o nitrito e óxidos de nitrogênio (PREUSSMANN, 1984a; TRICKER et al., 1989).

Os fatores relacionados ao estilo de vida correspondem, por exemplo, ao consumo de tabaco e de certos alimentos, ao uso de produtos

cosméticos, utensílios domésticos, drogas e ao próprio ar ambiente (PREUSSMANN, 1984a).

A DEN, que pode ser encontrada em diversos tipos de alimentos, indústrias de borracha e químicas (TRICKER et al., 1989), é uma substância química de peso molecular 102,1, constituída de um radical nitroso ligado a quatro átomos de carbono e dez de hidrogênio $C_4H_{10}N_2O$ (IARC, 1978).



A ocorrência de nitrosaminas tóxicas nos alimentos foi inicialmente demonstrada pela observação de que ovelhas alimentadas com carne de peixe tratada com nitrito de sódio para preservá-la continham altas doses de nitrosodimethylamina (NDMA), causando a morte ou doença em várias delas, principalmente por lesão hepática (ENDER et al., 1964, apud LIJINSKY, 1992; KOPPANG, 1964, apud LIJINSKY, 1992; SAKSHAUG et al., 1965).

A sua presença em alimentos deriva da reação de aminas secundárias e terciárias com agentes nitrosantes, como o nitrito, o agente

mais estudado (LIJINSKY, 1992), que é adicionado aos alimentos como corante, condimento ou preservante. O uso de nitratos para preservar carne e peixe é uma prática antiga que remonta aos romanos e deveu-se à observação de que a carne assim tratada não deteriorava. A cor rosada da carne é obtida graças à nitrosomioglobina formada a partir do nitrito produzido pela redução bacteriana do nitrato (LIJINSKY, 1992).

O nitrito também inibe a formação da toxina formada pelo *Clostridium botulinum*. Além disso, quando armazenadas por semanas ou meses, as carnes podem desenvolver gostos desagradáveis devido à reação entre oxigênio e ácidos graxos insaturados: os nitritos estabilizam o gosto, prevenindo a formação dos indesejados produtos da oxidação (LIJINSKY, 1992).

É improvável que todos os produtos formados nos alimentos pela reação do nitrito com aminas sejam carcinogênicos, mas certamente alguns deles são e outros podem ser facilmente convertidos em carcinogênicos. Por exemplo, a nitrosoprolina pode ser termicamente decarboxilada para formar nitrosopyrrolodina, um poderoso carcinogênico. Esta é uma das fontes de nitrosopyrrolodina no bacon frito e em outros produtos cozidos que contêm nitrito (JANZOWSKI et al., 1978, apud LIJINSKY, 1992; SEN et al., 1973).

Na Tabela 1 apresentam-se alguns tipos de alimentos em que podem ser encontradas nitrosaminas, com a indicação dos países em que foram constatadas.

Tabela 1 - Nitrosaminas encontradas em alimentos

Tipo de alimento	Nitrosamina identificada	Concentração ug/kg
Bacon frito (Canadá)	NDMA	17
	NO-PYRR	22
	DEN	6
Carne e salsicha (Alemanha)	NDMA	22
	NO-PYRR	45
Carne defumada (Canadá)	NDMA	2
	NO-PYRR	10
	NO-PIP	59
Carne salgada (Rússia)	NDMA	54
	NO-PYRR	12
	NO-PIP	7
Peixe seco (Groenlândia)	NDMA	38
Peixe salgado (Japão)	NDMA	26
Peixe salgado seco (China)	NDMA	133
Café instantâneo (Canadá)	NDMA	0,4
	NO-PYRR	1,7
Cerveja (Canadá) (U.S.A.) (Alemanha)	NDMA	3
	NDMA	14
	NDMA	68
Whisky	NDMA	1

A nitrosodimethylamina (NDMA), presente em cervejas e whisky, é formada pela interação de amins terciárias com óxidos de nitrogênio presentes nos gases usados para aquecer o malte durante o seu processamento (SPIEGELHALDER et al., 1979, apud LJINSKY, 1992).

Quanto aos produtos cosméticos, sua contaminação pode resultar de sua formulação com nitrosaminas ou da nitrosação de amins contidas na formulação, devido ao contato com agentes nitrosantes. O largo uso de dietanolamina, de trietanolamina e seus sais, de dietanolamidas e de ácidos graxos como emulsificadores e detergentes tem resultado na contaminação de nitrosodiethanolamina (NDELA) em uma variedade de produtos (TRICKER et al., 1989). A NDELA é facilmente absorvida pela pele humana e pode ser fonte de nitrosamina como potencial carcinógeno, embora a exposição humana a este meio seja difícil de quantificar (PREUSSMANN, 1984a).

Já a contaminação de nitrosaminas em herbicidas pode ocorrer por várias maneiras: pelo uso de químicos contaminados durante a síntese, por reações colaterais, pelo uso de nitrito como conservante e inibidor da corrosão de constituintes metálicos ou pela reação com agentes nitrosantes do meio ambiente. Aparentemente, somente

trabalhadores empregados na manufatura destes produtos químicos e agricultores usando produtos contaminados teriam um risco aumentado à exposição de nitrosaminas (TRICKER et al., 1989).

Produtos farmacêuticos proporcionam uma fonte potencialmente grande de compostos sujeitos à nitrosação, em que a formação de nitrosaminas pode ocorrer durante a síntese e armazenagem, ou *in vivo*. Podem-se citar como exemplos a aminofenazona, o disulfiram, o metapirileno e a piperazina, o clordiazepóxido, a lucantona e a oxitetraciclina (TRICKER et al., 1989).

O fato de o tabagismo ser um dos hábitos humanos mais comuns, com importantes efeitos adversos, a identificação de seus compostos tóxicos e carcinogênicos se tornou uma questão importante (LIJINSKY, 1992). Suspeita-se que aminas presentes no tabaco e na fumaça podem ser ingeridas e convertidas em aminas carcinogênicas pelo nitrito no estômago. Várias nitrosaminas foram identificadas na fumaça do tabaco, incluindo a nitrosonornicotina e a 4-(metilnitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanona (NNK), que é o mais potente carcinógeno entre as nitrosaminas. Foi demonstrado que NNK foi formada pela dealquilação da nicotina, que é o principal alcalóide do tabaco, e de uma amina terciária. Outro produto da dealquilação da nicotina é a

nitrosornicotina. O nitrato usado no tabaco é uma fonte de agentes nitrosantes. A redução bacteriana do nitrato durante o processamento do tabaco, provavelmente complementada por óxidos de nitrogênio presentes nos gases usados para secar a folha, ocasiona a formação de NNK e nitrosornicotina. Isto tem claras implicações para os usuários de rapé e para os mascadores de tabaco (LIJINSKY, 1992; PREUSSMANN, 1984a).

Na Tabela 2, listam-se diversos exemplos de nitrosaminas.

Tabela 2 - Principais fontes de nitrosaminas

Compostos	Principais Fontes
NDELA	cosméticos, ocupacional, tabaco
NDMA	alimentos, ocupacional, tabaco, ambiental
NNN	tabaco
NNK	tabaco
NMOR	ocupacional, tabaco
NO-PYRR	alimentos, tabaco
NO-PIP	alimentos, tabaco
DEN	ocupacional, alimentos
NBPHA	ocupacional
NNAI	tabaco
NDBA	ocupacional
NDP _h A	ocupacional
NAB	tabaco

A exposição ocupacional a nitrosaminas também é de grande importância, visto que altas concentrações de compostos N-nitrosos são encontrados em certos estabelecimentos industriais (PREUSSMANN, 1984a; TRICKER et al., 1989). Alguns processos favorecem a formação destes compostos. Na indústria da borracha, por exemplo, muitas aminas são usadas como aceleradores da vulcanização. Dentre elas incluem-se derivados de morfolina, 2,6dimetilmorfolina, dimetilamina, dietilamina, di-n-butilamina, metilfenilamina, pirrolidina e piperidina, todas aminas que podem reagir com agentes nitrosantes para formar nitrosaminas. O agente nitrosante é, às vezes, um nitrito inorgânico, mas muitas vezes pode ser uma nitrosamina como a nitrosodifenilamina, usada como um lentificador da vulcanização, que, através da transnitrosação, interage com uma amina secundária ou terciária formando uma nitrosamina alifática (LIJINSKY, 1992). Várias nitrosaminas voláteis foram detectadas em amostras de ar de indústrias de borracha: a NDMA e a nitrosomorpholina (NMOR) estavam presentes em indústrias de pneus, enquanto que a DEN, NDMA e NPIP foram encontradas em indústrias que produzem outros tipos de borrachas. O nível de exposição numa indústria depende do setor em que o indivíduo atua e dos produtos que se usam no local (TRICKER et al., 1989).

Em indústrias metalúrgicas em que os trabalhadores manuseiam produtos contaminados com NDELA, a exposição pode ocorrer por contato direto ou por inalação (TRICKER et al., 1989).

A Tabela 3 apresenta diversos tipos de nitrosaminas encontradas em diferentes tipos de indústrias.

Tabela 3 - Nitrosaminas em estabelecimentos industriais

Indústria	Nitrosamina
Metalúrgica	NDELA
	NMOR
Tingidoras de couro	NDMA
Borrachas e pneus	NDMA
	DEN
	NDBA
	NMOR
	NMPPhA
Tintas	NDMA
	DEN
Detergentes e surfactantes	NDMA

A principal fonte de nitrosaminas do homem é de formação endógena. O principal agente nitrosante é o íon nitrito, geralmente derivado do nitrito de sódio ou potássio existentes nos alimentos, mas também presentes na saliva e outros fluidos (LIJINSKY, 1992). O nitrito

é um constituinte normal da saliva, onde sua concentração depende da ingestão de nitrato presente em alimentos e na água (SPIEGELHALDER et al., 1976, apud LIJINSKY, 1992). O nitrato da dieta, após a absorção no intestino, é rapidamente distribuído no corpo pelo sangue e reexcretado na cavidade oral pela glândula salivar. A microflora oral reduz o nitrato em nitrito. A fonte mais importante de nitrato na ingestão humana são os vegetais, seguidos pela água (PREUSSMANN, 1984a). A atividade bacteriana na bexiga infectada é responsável pela redução do nitrato da urina para nitrito e pode levar à formação de compostos nitrosos na urina, os quais são prontamente absorvidos pela parede da bexiga (PREUSSMANN, 1984a).

No estômago e na bexiga a interação de aminas secundárias e terciárias com nitrito leva à formação de compostos nitrosos, cujos efeitos variam de acordo com a estrutura química do composto e da quantidade que é produzida. Entre as aminas que contribuem para esta exposição, inclui-se uma grande variedade de drogas e medicamentos, aditivos alimentares e vários produtos químicos usados na agricultura, presentes nos alimentos (LIJINSKY, 1992).

Também a inalação de óxido de nitrogênio (NO e NO₂) presente no ar pode levar a importante exposição a agentes nitrosantes e

ser responsável pelo aumento de excreção de nitrato na urina, aumentando a nitrosação endógena (MIRVISH, 1982, apud PREUSSMANN, 1984; WITTER et al., 1979).

A formação de compostos nitrosos pela reação de agentes nitrosantes com uma amina secundária ocorre em pH ótimo de 3,4 numa solução aquosa (LIJINSKY, 1992). A reação de aminas terciárias com ácido nitroso é geralmente lenta, mesmo sob altas temperaturas, todavia, com pH de 3 a 4, a reação é favorecida, e o índice cai em pH mais alto. Em solução aquosa, a nitrosação de aminas terciárias é mais lenta do que a das aminas secundárias (JONES et al., 1974). A transnitrosação, outro mecanismo pelo qual compostos nitrosos podem ser formados, é a transferência de um grupo nitroso para uma amina (LIJINSKY, 1992).

A formação de compostos nitrosos no estômago pode ser inibida pelo ácido ascórbico, que realiza uma reação competitiva com o ácido nitroso (VON DAHN et al., 1960 apud LIJINSKY, 1992). Outras substâncias, porém menos efetivas foram descritas como inibidoras da formação de compostos nitrosos: entre elas, o tocoferol, os taninos e a glutadiona (LIJINSKY, 1992).

Não há dúvidas de que as nitrosaminas devem ser metabolizadas a fim de tornarem-se toxinas, mutagênicas ou carcinógenas

(ARCHER, 1989). Sem ativação, as nitrosaminas são simplesmente bons solventes, pois a maioria delas são líquidos à temperatura ambiente. Quando ativadas por enzimas, elas tornam-se reativas e interagem com DNA, induzindo mutações pela alquilação do DNA (LIJINSKY, 1992). Por diversas vezes já ficou evidenciado que a ativação metabólica das nitrosaminas mostrou ser resultante da hidroxilação do carbono de uma das cadeias alquílicas da nitrosamina, reação que é catalisada pelos citocromos P450. Citocromos P450 são uma superfamília de enzimas presentes no retículo endoplasmático, e uma menor parte delas envolvidas na biossíntese de compostos endógenos como esteróides, na mitocôndria. O fígado contém a maior parte destas enzimas. Embora outros tecidos tenham uma quantidade total de citocromos P450 menor do que ele, as enzimas podem apresentar diferenças qualitativas, além de expressar isoformas únicas de citocromo P450, o que pode ser muito importante em termos de toxicidade local (LIJINSKY, 1992; YANG, 1984b).

MURPHY e SPINA (1994) demonstraram a presença de enzimas microssomais de alta afinidade em esôfagos de ratos que alfa-hidroxilam o carcinógeno N-nitrosornicotina, enzimas estas distintas das do fígado. Alfa-oxidação parece ser a reação mais importante das nitrosaminas, sendo comuns a todas elas (LIJINSKY, 1992). A clivagem

espontânea do carbono-nitrogênio ligado na alfa-hidroxinitrosamina leva à formação de um aldeído e do alquildiazohidróxido. O diazohidróxido finalmente produz o potente íon eletrofílico alquil-diazônio, que pode reagir no sítio nucleofílico de uma molécula como o DNA (ARCHER, 1989; DUCKREY et al. 1967 apud, MAGEE, 1989; MAGEE; BARNES, 1967).

Estudos da alquilação do DNA e RNA em animais por compostos nitrosos iniciaram com MAGEE e FARBER (1962) (apud LIJINSKY 1992). Desde então, muitos estudos foram realizados sobre o mecanismo da alquilação do DNA. Nitrosaminas reagem principalmente na posição N7 da guanina, mas também podem reagir em outros locais, como na posição 6O de guanina ou em outra base, como O4 alquiltimina (ARCHER, 1989; SAFFHILL et al., 1985).

A carcinogênese resulta da ação de agentes químicos, físicos, biológicos e/ou alterações genéticas nas células. O processo de carcinogênese pode ser dividido em três estágios: iniciação, promoção e progressão. O primeiro estágio, a iniciação, implica uma alteração genética irreversível, geralmente constituída de uma ou mais mutações simples, transversões, transições e/ou deleções. O estágio de promoção é reversível e não envolve alterações na estrutura do DNA, mas alterações

na expressão do genoma mediadas por interações entre agentes químicos promotores e moléculas receptoras que interagem ou se ligam a regiões específicas do DNA, o que acarreta as alterações de expressão. O estágio final e irreversível de progressão é caracterizado por instabilidade cariotípica e expansão tumoral. Os alvos moleculares no processo de carcinogênese incluem proto-oncogenes, oncogenes celulares e alterações em ambos alelos dos genes supressores, estas últimas encontradas somente no estágio de progressão (PITOT, 1993).

Por muitos anos, farta discussão tem sido dirigida à importância dos fatores ambientais e genéticos na oncogênese. Tem-se tornado evidente que estes dois fatores atuam conjuntamente na maioria dos tumores. Ambos levam à expressão de genes anormais ou expressão inapropriada de genes normais. O denominador comum dos agentes ou mecanismos que têm sido relacionados ao desenvolvimento de neoplasias é a mutação genética (RUSTGI; PODOSKY, 1993).

O estudo da biologia molecular no câncer esofágico pode trazer grande desenvolvimento no entendimento da indução e progressão destes tumores (STEMMERMANN et al., 1994).

Muito tem sido estudado no sentido de classificar a natureza dos genes relacionados ao desenvolvimento tumoral. Estes genes podem

ser divididos em dois grupos distintos: oncogenes - espreça genes que atuam diretamente na promoção do crescimento tumoral - e genes supressores - que inibem a proliferação tumoral (RUSTGI; PODOSKY, 1993).

Genes supressores podem prevenir a aquisição de um fenótipo transformado *in vitro* e têm propriedades funcionais similares *in vivo*. O gene supressor p53 é localizado no braço curto do cromossomo 17. Sua inativação funcional por mutação ou deleção alélica é de grande importância no desenvolvimento de muitos tumores (BARTEK et al., 1979; BARTEK et al., 1991; IGGO et al., 1990; JANKOWSKI et al., 1992). Ele atua parando a replicação de DNA após ocorrer a lesão do genoma, tanto prolongando a fase G1 do ciclo celular, o que dá tempo à célula para reparar a lesão antes de entrar na fase S, quanto direcionando a célula à morte em resposta à lesão do DNA (KARP; BRODER, 1994; LANE, 1992; MONTESANO et al., 1996; STEMMERMANN et al., 1994). Quando ocorre a mutação ou deleção alélica, a célula perde a função designada pela proteína codificada no gene p53 original, estimulando, assim, crescimento celular anormal (VOGELSTEIN; KINZLER, 1992). Vários estudos têm demonstrado associação entre mutações de p53 e instabilidade no resto do genoma (VOGELSTEIN;

KINZLER, 1992; HARTWELL, 1992; LIVINGSTON et al., 1992; YIN et al., 1992). As mutações do p53 podem resultar de processos endógenos ou da ação de carcinógenos ambientais exógenos (GREENBLATT et al., 1994).

Enquanto células que perdem função supressora do p53 adquirem uma vantagem imediata, pois podem proliferar mesmo com DNA danificado, células com p53 original têm seu crescimento suprimido. Isto origina populações de células proliferativas ativadas, com alto risco de tornarem-se precursoras de lesões neoplásicas (MONTESANO et al., 1996).

O acúmulo da proteína p53 está relacionada com invasibilidade e capacidade de metastatizar, e constitui um fator prognóstico pior para pacientes com câncer de esôfago (WANG et al., 1994).

O p53 é anormal em 33% a 50% dos carcinomas epidermóides de esôfago (STEMMERMANN et al., 1994). A análise das mutações desse gene demonstrou que os tumores são distintos a nível molecular. Além disso, as mutações diferem em relação ao tipo, frequência, distribuição no gene e impacto na estrutura proteica de p53. Isto reflete não só o envolvimento de agentes causativos e mecanismos mutacionais distintos, mas também a existência de mecanismos celulares específicos

que direcionam a expressão de fenótipos malignos e a progressão tumoral (WANG et al., 1993; SASANO et al., 1992).

Os oncogenes, o outro grupo de genes responsáveis pelo desenvolvimento de tumores, podem ser classificados em proto-oncogenes e oncogenes celulares. Os proto-oncogenes são aqueles que adquirem o genoma de um vírus oncogênico, geralmente um retrovírus. Tais genes, ao invés de ficarem sob o controle das seqüências que normalmente regulam sua expressão, ficam sob controle da seqüência viral, resultando numa expressão alterada. Já os oncogenes celulares são definidos como genes capazes de induzir transformação neoplásica sem um componente viral. Por ocorrerem normalmente nas células, é claro que os proto-oncogenes e oncogenes celulares devem ser ativados durante o processo de carcinogênese. Na maioria das vezes, tal ativação envolve alguma forma de mutação, como uma transição, uma transversão ou uma pequena deleção; outras vezes, envolve uma deleção maior ou a formação de um novo gene como resultado de uma translocação cromossômica, mutagênese insercional ou transposição (PITOT, 1993).

Oncogenes são comuns no carcinoma epidermóide de esôfago e codificam fatores de crescimento, seus receptores ou outras partes do sistema de sinalização e transdução. A expressão exacerbada dos fatores

de crescimento, ou de seus receptores contribuem para o crescimento tumoral. A fosforilação da fosfolipase C, induzida pelos fatores de crescimento parece ser um ponto crítico que limita a atividade da proteína quinase dos receptores de crescimento e leva à ativação da rota de sinalização do fosfatidylinositol (CROSS; DEXTER, 1991). Estes genes incluem o fator de crescimento epidérmico (EGF), TGF alfa, gene receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), seu homólogo c-erB-2 (amplificação), int-2 e hist-1 (amplificação), c-myc (amplificação), MTS-1/p16 (deleções e mutações), ciclina D1 (amplificação e expressão exacerbada) (MONTESANO et al., 1996; STEMMERMANN et al., 1994).

Anormalidades no receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF) são mais comuns no carcinoma de esôfago do que em outros tipos de câncer (ULRICH et al., 1984; MUKAIDA et al., 1991).

A expressão exacerbada do EGFR se correlaciona com o grau de displasia e frequência de metástases nos linfonodos (YANO et al., 1991; OZAWA et al., 1987). TAHARA (1990) demonstrou uma boa correlação entre expressão de EGF, profundidade de invasão tumoral e prognóstico. A expressão do RNA mensageiro do EGF foi detectada em 29,6% dos carcinomas de esôfago, e o TGF-alfa e o EGFR estavam

expressos em 77,8% e 89,4% deles, respectivamente (YOSHIDA et al., 1993). Também foi demonstrado que níveis elevados de EGF e EGFR indicam pior prognóstico que aqueles com baixos níveis (MUKAIDA et al., 1991).

Um local no cromossoma 11 (11q13) contém uma série de genes: hst, int-2, bcl-1 e ciclina D. O mais importante deles, é a ciclina D1, envolvida na progressão de G1 para S do ciclo celular, é responsável pela produção de ciclina, que, ao ocorrer em demasia na hora errada, estimula divisão celular inapropriada (JIANG et al., 1992; MONTESANO et al., 1996; STEMMERMANN et al., 1994).

Em aproximadamente 50% dos carcinomas esofágicos primários e em 100% das metástases ocorre a amplificação no local do cromossoma 11q13, que contém os genes hst-1, int-2 e ciclina D (TSUDA et al., 1989; KITAGAWA et al., 1991).

Existe também uma correlação positiva entre coamplificação dos genes hst-1 e int-2 e estágio clínico das metástases, o que sugere que a amplificação do locus desses genes pode participar não só da carcinogenicidade mas também da progressão das metástases do carcinoma esofágico (JIANG et al., 1992; KITAGAWA et al., 1991).

Algumas das alterações acima identificadas parecem ter significado prognóstico, sendo, pois, úteis no estabelecimento da terapia; outras podem servir como marcadores biológicos para os indivíduos com risco elevado para câncer e, conseqüentemente, propiciar a desejada identificação dos pacientes que necessitam rastreamento para câncer (MONTESANO et al., 1996).

Nitrosaminas demonstraram ser carcinógenos eficazes em muitas espécies animais, especialmente entre os mamíferos, o que sugere que humanos também sejam suscetíveis a elas. Conseqüentemente, seu uso proporciona a oportunidade de se investigarem os mecanismos de sua carcinogenicidade (LIJINSKY, 1980). Para isso, tem-se definido substâncias que induzem experimentalmente a formação de tumores em animais. Assim, demonstrou-se que a DEN induz tumores em várias espécies, especialmente em seus sistemas respiratório e digestivo alto, fígado e rins (LIJINSKY, 1980). Administrada na água de beber, a concentração de 0,04ml/1000ml tornou-se a dose preconizada em vários modelos experimentais (KRUEL, 1992; RUBIO, 1983; RUBIO et al., 1987; RUBIO, 1988).

Sabe-se que o câncer de esôfago em animais domésticos e selvagens é raro (REFERENCES, 1974, apud KRUEL 1992). A indução

destes tumores em animais de laboratório consolidou-se quando se verificou que a administração oral de metilnitrosamina em ratos provoca o desenvolvimento, na maioria dos animais, do carcinoma de células escamosas cornificadas (DRUCKREY et al., 1961a, 1961b). A indução de tumores esofágicos em roedores foi feita por via oral, sendo o carcinógeno dissolvido na água de beber (REUBER, 1975, 1977; LIJINSKY et al., 1983). NAPALKOV e POZHARISSI (1969) usaram a via intragástrica, por intubação orogástrica, e constataram variada incidência em função das diferentes nitrosaminas, do tempo de administração e da dosagem usada.

BULAY e MIRVISH (1979) usaram em ratos a metil N-amilnitrosamina via intraperitoneal e obtiveram incidência de 40 a 66% em diferentes dosagens. O uso de DHPN intraperitoneal também produz carcinoma de esôfago (LEVISON et al., 1979). A administração de N-benzilnitrosamina via subcutânea determina câncer em 35% dos casos (STINSON et al., 1978; STINSON, 1979).

Como já se viu, a DEN, que foi usada em muitas espécies, demonstrou ser um importante carcinógeno. Além de ser encontrada em alimentos e drogas, ela é formada endogenamente no estômago (MAGEE et al., 1976, apud SCHMÄL et al., 1978; PREUSSMANN, 1975, apud

SCHMÄL et al., 1978). O seu uso intramuscular em galinhas ocasionou carcinoma hepatocelular e adenocarcinoma de rim; seu uso oral em gatos ocasionou hepatomas, carcinoma de esôfago e adenocarcinoma de rim (SCHMÄL et al., 1978). A ingestão de DEN por um período de 180 dias induziu carcinoma de células escamosas no esôfago de camundongos em 18% (CLAPP; CRAIG, 1967). Em uma cepa de ratos búfalo, sua administração durante 26 semanas provocou câncer em 50% dos casos (REUBER, 1975, 1977). Mais recentemente a DEN foi usada por RUBIO (1983, 1987) e KRUEL (1992). As nitrosaminas também já foram estudadas em primatas, coelhos e cães (ADAMSON et al., 1977; IIZUKA et al., 1977, apud KRUEL, 1992; SASAJIMA et al., 1977).

Em Linxian, China, observou-se carcinoma esofágico em galinhas, com incidência semelhante à registrada em humanos. Num estudo realizado em Zhongxiang, província de Hubei, a incidência do câncer esofágico registrada em duas comunidades de imigrantes de Henan que apresentavam altos índices de câncer esofágico, foi comparada com a existente em duas comunidades nativas de Hubei. Além disso, o estudo examinou 5484 galinhas da comunidade dos imigrantes e registrou doze casos de câncer faríngeo e faringo-esofágico; nenhum caso foi observado

entre 2.371 galinhas da comunidade de nativos. A incidência de câncer esofágico na comunidade de imigrantes era de 82.81/100.000 hab./ano, muito maior do que a existente na comunidade nativa (21.53/100.00 hab./ano). O autor acredita que tal resultado se deva aos hábitos de vida e alimentares que os imigrantes trouxeram e que as galinhas compartilhavam. Estes estudos mostram um paralelismo entre humanos e galinhas na prevalência e patologia do câncer esofágico e sugerem que o modelo experimental adotado possa ser útil para o estudo da carcinogênese do esôfago (YANG, 1980).

Os modelos experimentais oferecem a oportunidade para o estudo sistemático e compreensivo da morfogênese do tumor de esôfago, com o acompanhamento morfodinâmico do processo patológico, estágio por estágio (NAPALKOV; POZHARISSKI, 1969).

Em virtude dos achados citados por YANG (1980) sobre o paralelismo entre a prevalência e patologia do carcinoma de esôfago entre galinhas e humanos, propõe-se, neste trabalho, o uso de frangos como modelo de carcinogênese experimental. Nele também serão seguidos, com as adaptações necessárias, os princípios usados por KRUEL (1992) em camundongos, que induziu carcinoma esofágico usando DEN na água de beber por um período de 180 dias.

3 OBJETIVOS

1) Desenvolver um modelo de carcinogênese esofágica em frangos induzida por diethilnitrosamina por um período de 200 dias.

2) Classificar as lesões encontradas nas várias etapas do experimento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Realizou-se um estudo experimental em frangos, com a finalidade de estabelecer um modelo de carcinogênese esofágica induzida por DEN.

O experimento iniciou com 440 frangos de corte (*Gallus domesticus*), de ambos os sexos, com 10 dias de vida (Figura 1), divididos em dois grupos: um grupo controle com 70 animais e um grupo experimental com 370 animais.

No momento do sacrifício, o critério para inclusão no estudo era por escolha aleatória ou debilidade física entre os animais de cada grupo.

O critério de exclusão era a morte não programada, pois o experimento foi realizado na área rural do município de São Marcos (RS), onde não havia condições técnicas para o armazenamento dos animais que eventualmente morriam entre os intervalos programados para o sacrifício, nem para realizar a necrópsia destes animais fora dos períodos pré-estabelecidos.

No final, foram incluídos no experimento 183 frangos, de ambos os sexos: 54 animais no grupo controle (C) e 129 no grupo com a solução (S).



4.2 Condições de acondicionamento dos animais

Os animais foram confinados em um aviário industrial isolado para este fim em uma propriedade rural no município de São Marcos, Rio Grande do Sul, em condições semelhantes às de criações de frangos de corte.

O aviário foi dividido em dois setores, um contendo o grupo controle com 54 frangos e o outro contendo os 129 frangos que foram submetidos à ingestão da solução. Os dois grupos não tiveram contato físico entre si durante o experimento.

4.3 Droga carcinógena e dose

Foi utilizada diethilnitrosamine (DEN) SIGMA CHEMICALS N-0756.

A droga foi usada na concentração de 0,04ml/l e era diluída na unidade de bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

4.4 Alimentação

A comida e a água eram fornecidos aos grupos de maneira independente, sem que um grupo tivesse contato com o outro.

Todos os animais fizeram uso da alimentação e da água *ad libitum*. A ração era constituída pela ração Supra Frango Inicial (Anexo A), farelo de milho e farelo de osso.

A DEN era diluída na água de beber e colocada à disposição dos animais como única forma de ingesta hídrica durante três dias consecutivos por semana (terças, quartas e quintas). Nos dias restantes (sextas, sábados, domingos e segundas) os animais recebiam água sem DEN. Esta rotina foi mantida durante todo o experimento.

4.5 Cronograma de sacrifícios

Estabeleceu-se um cronograma de sacrificio a fim de analisar as alterações histológicas. O critério de escolha para o sacrificio era o aleatório e, nas fases finais, o de debilidade física.

Os tempos de sacrificios foram divididos em 6 etapas, com sacrificios no grupo controle (C) e no grupo de DEN (S):

T0: grupo inicial controle;

T1: tempo trinta dias;

T2: tempo sessenta dias;

T3: tempo noventa dias;

T4: tempo cento e vinte dias;

T5: tempo duzentos dias.

Na Figura 2, podem ser observados os períodos de sacrificio com o número de animais em cada grupo.

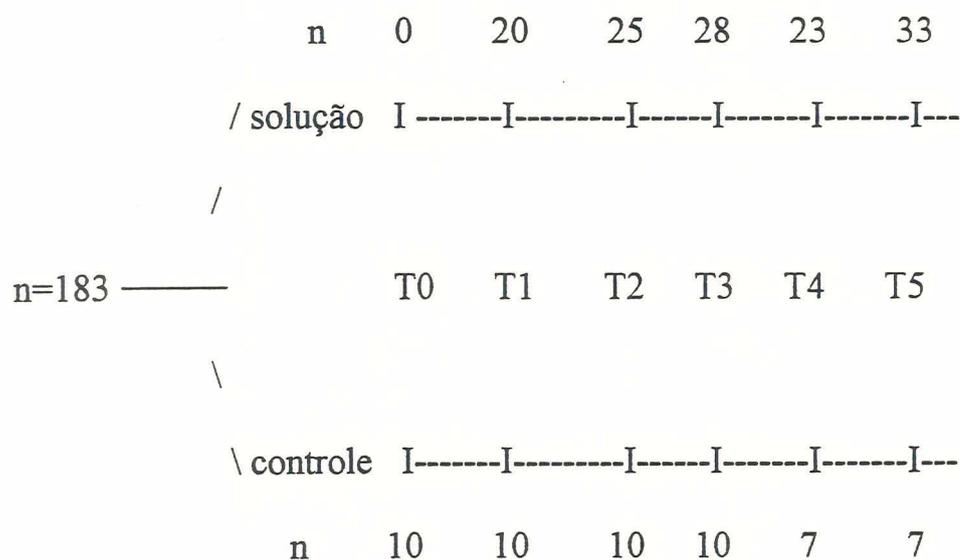


Figura 2 - Delineamento do experimento

4.6 Métodos de estudo

A morte do animal foi induzida pela inalação de éter etílico embebido em algodão, em recipiente plástico fechado.

Após o sacrifício, o animal era colocado em uma mesa cirúrgica de isopor ou cortiça e iniciava-se o procedimento de dissecação (Figura 3).

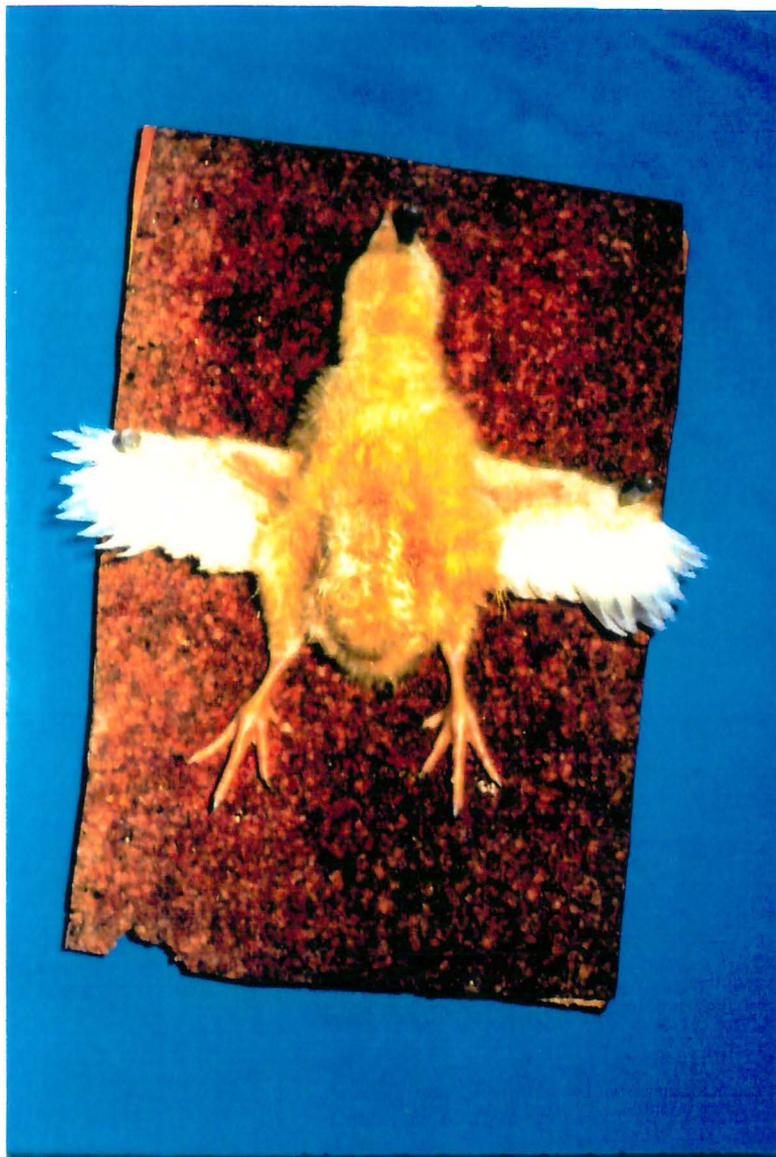


Figura 3- Frango preparado para a necrópsia.

A dissecação era iniciada com uma incisão longitudinal próxima à cloaca e se estendia em direção ao crânio através do peito e da região cervical (Figura 4).

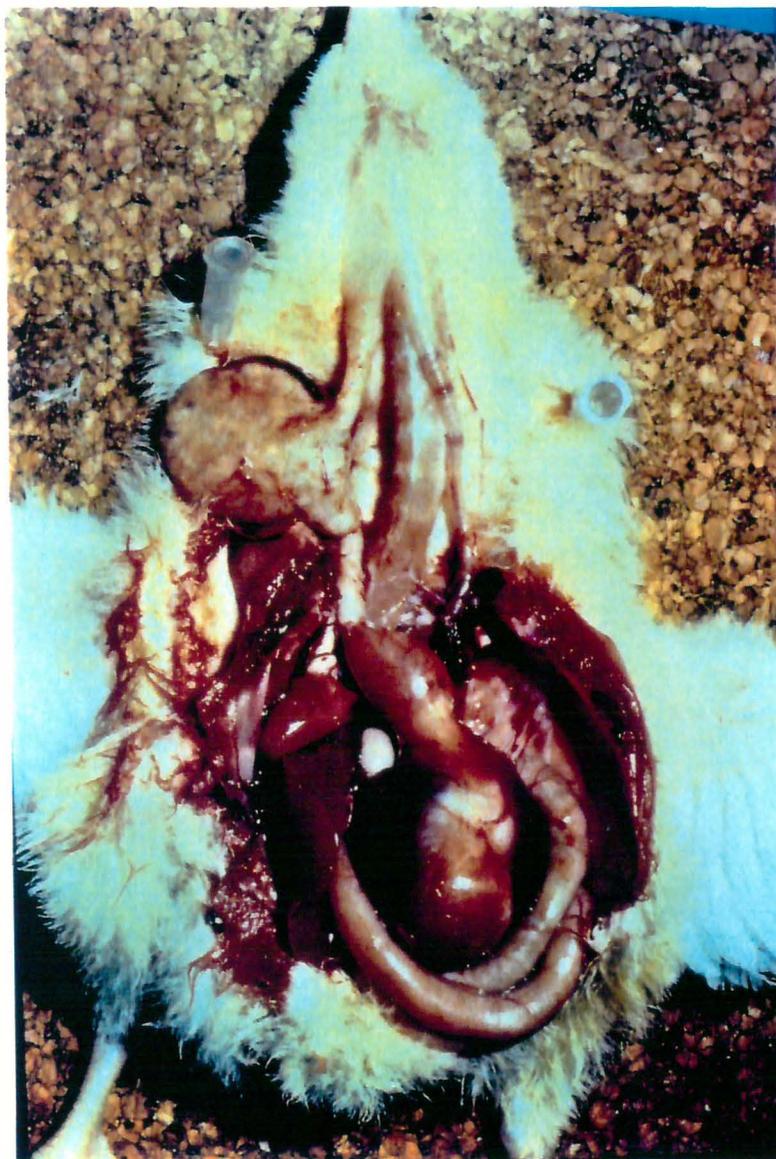


Figura 4- Incisão cirúrgica no animal com individualização da peça

Na inspeção da cavidade abdominal, o ventrículo (moela) era identificado e seccionado junto a sua união com o intestino. Após, eram liberados o pró-ventrículo e o esôfago até a sua união com a faringe, com o que se retirava o bloco (Figura 5). Após, a peça era seccionada em sua face anterior, longitudinalmente, desde o ventrículo até junto à faringe, e era lavada em água corrente para retirar os resíduos alimentares. O bloco era colocado em uma folha de isopor ou de cortiça para o exame macroscópico (Figura 6).



Figura 5 - Peça cirúrgica removida

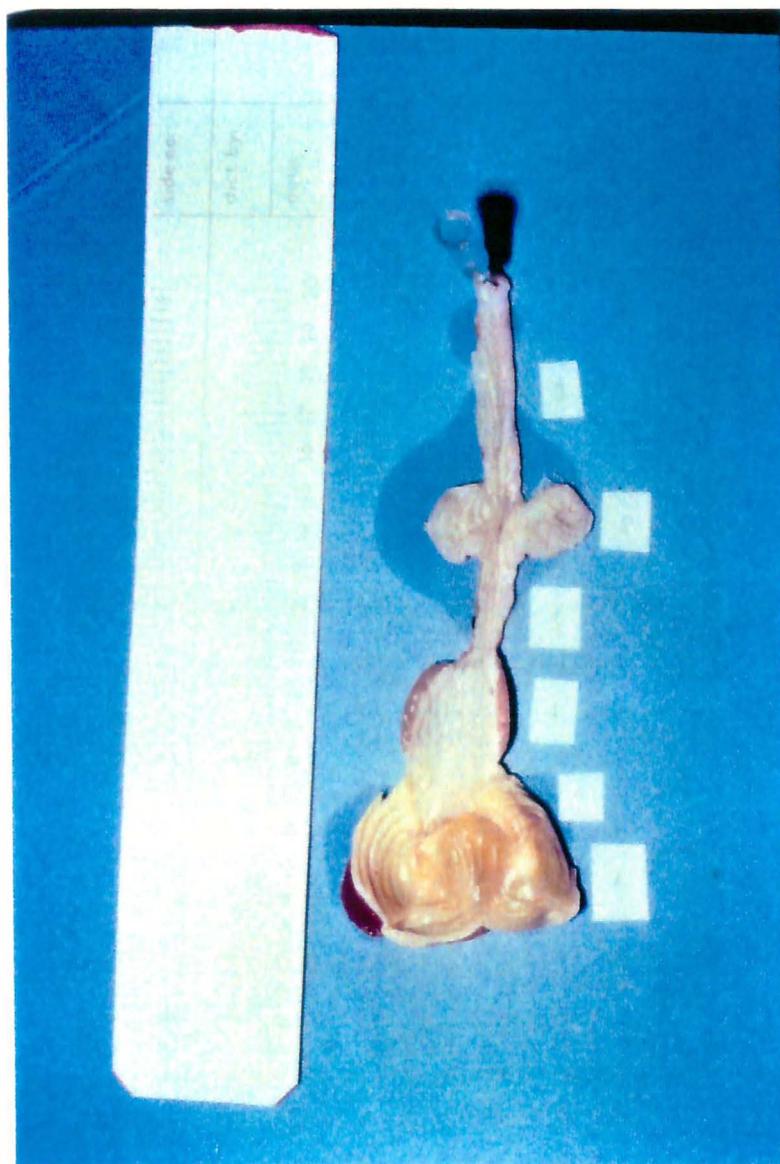


Figura 6 - Peça cirúrgica preparada para a macroscopia com a região dos cortes histológicos

4.7 Colheita do material e processamento

A peça foi fixada em formalina tamponada a 10% por imersão para posterior descrição macroscópica. A seguir, era feita a inclusão em parafina e o processamento para obtenção de cortes histológicos corados por hematoxilina - eosina.

Em todos os animais estudaram-se, no mínimo, seis cortes, que abrangiam, ao menos uma vez, a circunferência do órgão em cada nível. Como não se observaram alterações macroscópicas, os cortes foram feitos aleatoriamente nos vários segmentos do esôfago e estômago (Figura 6).

4.8 Análise histológica

Para a avaliação histológica, foram utilizados os critérios de KRUEL (1992), devidamente adaptados para esta pesquisa:

-Histologia normal (P1): Presença de várias camadas de células malphigianas localizadas entre a borda do epitélio e a submucosa,

com núcleos ovais ou arredondados. A mucosa apresenta um estrato córneo que ocupa a porção superficial da espessura epitelial.

-Hiperplasia e esofagite (P2): Epitélio mais espesso às custas de hiperplasia da camada basilar, hiperplasia papilar, hiperchromatose e infiltrado inflamatório composto por polimorfonucleares e linfócitos em intensidade variada.

-Lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau (P3): Displasia mínima, isto é, aumento das camadas celulares basais atingindo um terço do epitélio, com células mais volumosas e com cromatina mais densa.

-Lesão escamosa intra-epitelial de alto grau (P4): Presença das seguintes lesões: 1) displasia moderada - a proliferação do epitélio atinge quase dois terços de sua espessura, persiste o pleomorfismo celular; 2) displasia acentuada e carcinoma intra-epitelial *in situ*- as alterações displásicas atingem toda a espessura do epitélio, que é composto de células marcadamente anormais, mas ainda pode ser observada alguma maturação na superfície epitelial.

-Carcinoma epidermóide invasor (P5): Presença de células epiteliais malignas com ruptura evidente da membrana basal e presença de células neoplásicas na lâmina própria.

4.9 Análise estatística

Para a análise estatística, foram utilizados o teste exato de Fischer bi-caudado e o teste qui-quadrado de Pearson.

Estabeleceu-se um nível de significância de 5%, $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

O modelo de carcinogênese esofágica em frangos induzido por DEN foi executado em 183 animais. Os animais foram mantidos nas mesmas condições experimentais durante toda a pesquisa.

Nas várias etapas do protocolo, foram sacrificados animais do grupo controle e do grupo solução em proporções semelhantes.

5.1 Observações gerais

Durante a manutenção dos animais em cativeiro, observou-se, já no primeiro mês, uma alteração comportamental nos animais que receberam a solução. Este comportamento consistia em maior agressividade, que os levava, por vezes, a realizar práticas canibalísticas

(Figura 7). Este comportamento manteve-se durante todo o desenrolar da pesquisa.



Figura 7 - Visualização do canibalismo entre os animais

Quanto ao aspecto externo, observou-se nos animais do grupo solução, perda de penas na região caudal, o que ocorreu minimamente no grupo controle (Figura 8). Também se constatou que os animais do grupo solução estavam nitidamente emagrecidos em comparação aos do grupo controle.



Figura 8 - Animal com perda de penas na região caudal

5.2 Sexo

Houve uma proporção adequada entre machos e fêmeas nas várias etapas de sacrifício, não tendo havido diferença estatística significativa, $p > 0,05$, como pode ser visto na Tabela 4. Também não houve diferença estatística entre os grupos controle e solução na distribuição de sexo dos animais sacrificados (Tabela 5), $p > 0,05$.

Tabela 4 - Distribuição dos animais quanto ao sexo em relação ao tempo

(legendas no texto)

Sexo/Tempo	T0	T1	T2	T3	T4	T5	Total
Masc	4	18	25	23	19	26	115
Fem	6	12	10	15	11	14	68
Total	10	30	35	38	30	40	183

Tabela 5 - Distribuição dos animais quanto ao sexo em relação ao grupo

(legendas no texto)

Sexo/Grupo	Controle	Solução	Total
Masc	33	82	115
Fem	21	47	68
Total	54	129	183

5.3 Alterações macroscópicas

Após o sacrifício com éter, os animais eram colocados numa mesa com isopor e/ou cortiça e efetuava-se a necrópsia. A inspeção das vísceras não revelou, em nenhum dos animais sacrificados, lesão tumoral macroscopicamente visível, tanto no trato gastrointestinal como nos outros órgãos.

As alterações macroscópicas no grupo controle podem ser vistas na Tabela 6, e as do grupo solução, na Tabela 7.

Tabela 6 - Presença de hiperemia em relação ao tempo no grupo controle

(legendas no texto)

	T0	T1	T2	T3	T4	T5	Total
Sim	0	0	3	9	0	0	12
Não	10	10	7	1	7	7	42
Total	10	10	10	10	7	7	54

Tabela 7 - Presença de hiperemia em relação ao tempo no grupo solução

	T1	T2	T3	T4	T5	Total
Sim	6	14	22	11	22	75
Não	14	11	6	12	11	54
Total	20	25	28	23	33	129

Na análise macroscópica no momento da necrópsia, procurou-se verificar as alterações indicadas no protocolo. A presença de hiperemia, representada pela coloração avermelhada da mucosa, foi evidenciada apenas pela sua observação (sim ou não). Grau de hiperemia, difuso ou focal, não foi considerado.

No grupo controle, não se observaram alterações em T0 e T1. Nos tempos T2 e T3, foi constatada hiperemia em diversos graus no esôfago, desde áreas focais até extensas áreas de congestão vascular; em T3, observaram-se ainda animais com granulações esbranquiçadas fibrinóides. Essas granulações eram facilmente removíveis e, em sua porção basal, não apresentavam friabilidade ou ulcerações. No exame microscópico, observaram-se fungos na maioria destes casos. Em T4 e T5, não foram constatadas alterações.

No grupo solução, a presença de hiperemia foi notada já em T1, ampliou-se em T3 e persistiu em T4 e T5. Também foram observados

animais com granulações fibrinóides a partir de T2, mas principalmente em T3. Em T4 e T5, tais nodularidades inexistiram.

Fazendo-se uma análise global entre todos os animais, houve correlação estatística significativa entre desenvolvimento de hiperemia e as várias etapas de sacrifício, $p < 0,05$. Quando se compararam individualmente os períodos T1 e T5 do grupo controle, constatou-se que não houve diferença estatística em relação ao desenvolvimento de hiperemia; já no grupo solução, houve tal correlação.

Em todos os casos dos grupos solução e controle, a mucosa permaneceu bastante delgada e translúcida até o final do experimento.

5.4 Alterações microscópicas

As alterações microscópicas do grupo controle estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8 - Alterações microscópicas no grupo controle

(legendas no texto)

	P1	P2	P3	P4	P5	Total
T0	9	1	0	0	0	10
T1	8	2	0	0	0	10
T2	4	6	0	0	0	10
T3	2	8	0	0	0	10
T4	0	7	0	0	0	7
T5	3	4	0	0	0	7

No T0 do grupo controle, constituído de 10 animais com 10 dias de vida, observou-se, após análise histológica nos vários segmentos, nove animais com esôfago normal (Figura 9) e um único animal com esofagite (Figura 10). Em T1, dois dentre os dez animais apresentavam esofagite. Em T2, ocorreu predominância de casos de esofagite, com 6 casos. Em T3, dos dez animais, oito apresentavam esofagite; em T4, todos os sete animais apresentavam esofagite e, em T5, três eram normais e quatro tinham esofagite. Dessa forma, no grupo controle, ocorreram alterações microscópicas apenas do tipo inflamatório.



Figura 9 - Microfotografia do esôfago normal de animal do grupo

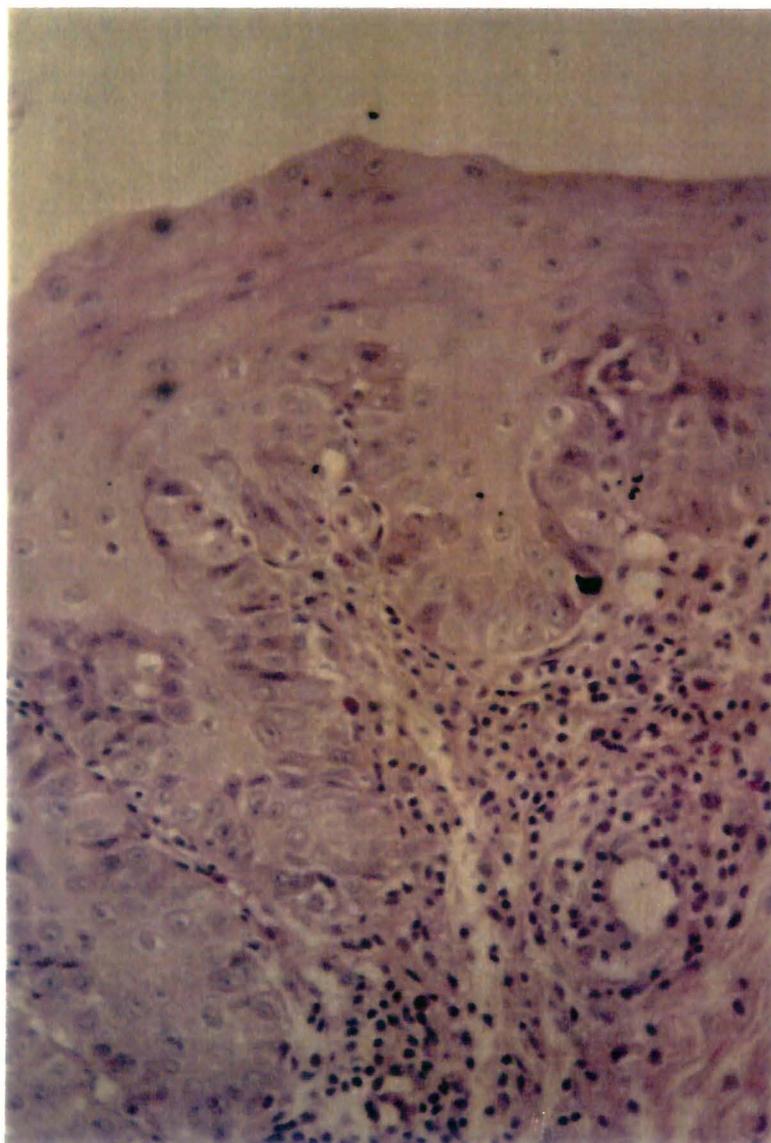


Figura 10 - Microfotografia do esôfago de animal do grupo solução, mostrando hiperplasia da camada basilar. Abaixo do epitélio pode ser visto infiltrado inflamatório mononuclear. Tempo de experimento: 90 dias. (Hematoxilina-Eosina, aumento de 200x).

As alterações microscópicas no grupo solução estão sumarizadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Alterações microscópicas no grupo solução

(legendas no texto)

	P1	P2	P3	P4	P5	Total
T1	14	6	0	0	0	20
T2	12	13	0	0	0	25
T3	7	18	3	0	0	28
T4	5	15	3	0	0	23
T5	2	21	2	6	2	33

Nesse grupo, as alterações microscópicas foram progressivamente ocorrendo no desenrolar do experimento, com predomínio dos achados inflamatórios. Nos períodos T3 e T4, puderam ser observadas alterações intra-epiteliais proliferativas mais restritas à camada inferior do epitélio esofágico, alterações que correspondem a displasia leve (Figura 11). Elas seguidamente estavam acompanhadas de esofagite, porém era assinalado o grau mais elevado de lesão. No período T5, as alterações intra-epiteliais observadas eram mais intensas,

ocupavam quase toda a espessura do epitélio (Figura 12) e, em dois casos, invadiam a submucosa (Figura 13).

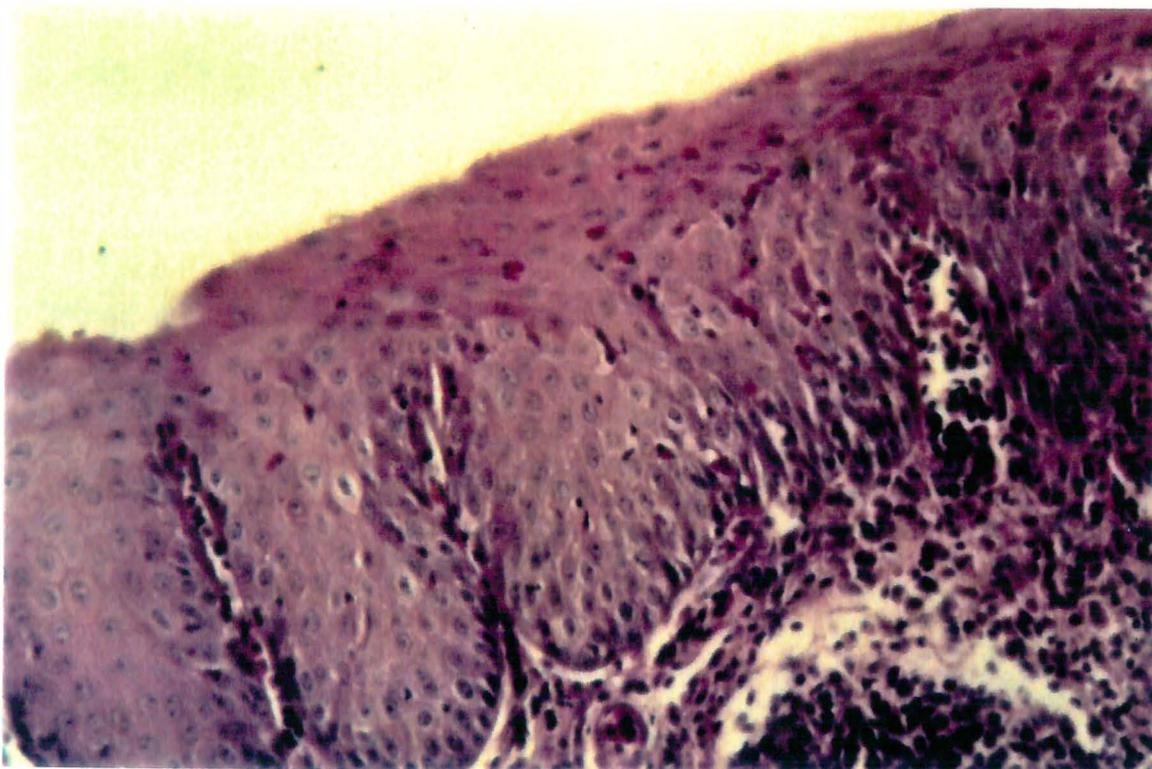


Figura 11 - Microfotografia do esôfago de animal do grupo solução, mostrando células diskeratóticas em lesão intra-epitelial de baixo grau. Tempo de exposição: T4. (Hematoxilina-Eosina, aumento de 250x).

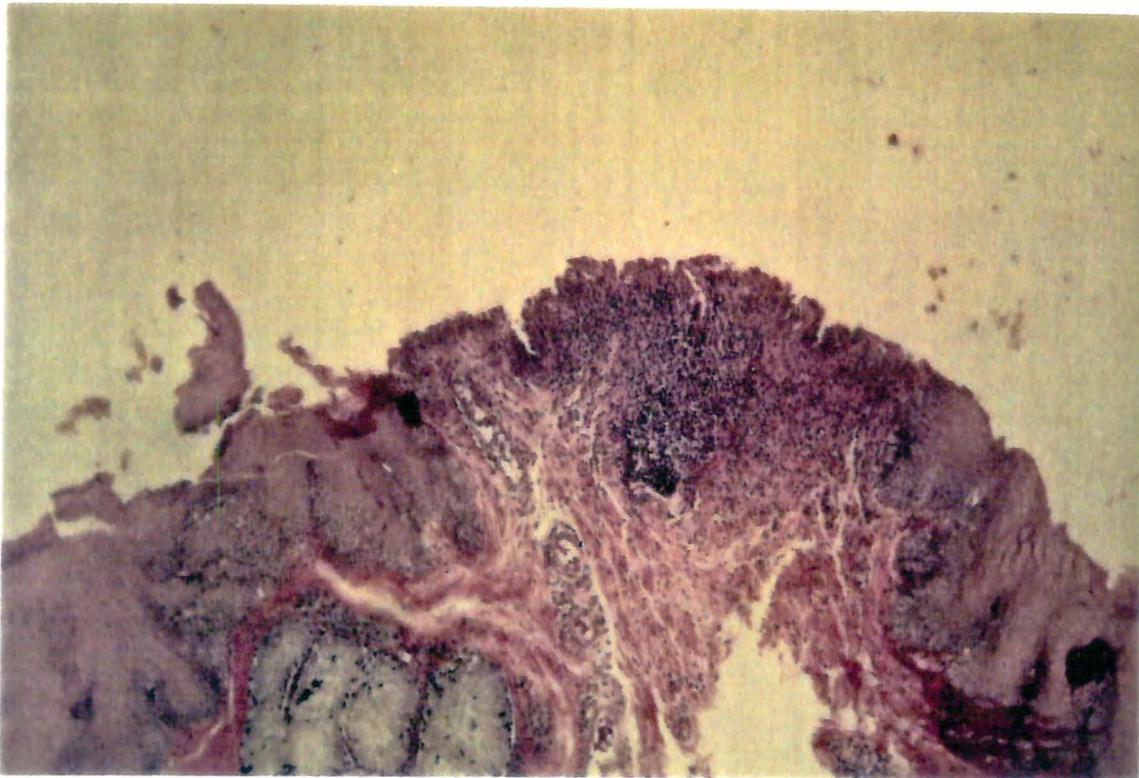


Figura 12 - Microfotografia do esôfago de animal do grupo solução, mostrando lesão intra-epitelial de alto grau. Observa-se área de ulceração revelando atipias em toda espessura do epitélio. (Hematoxilina-Eosina, aumento de 32x).

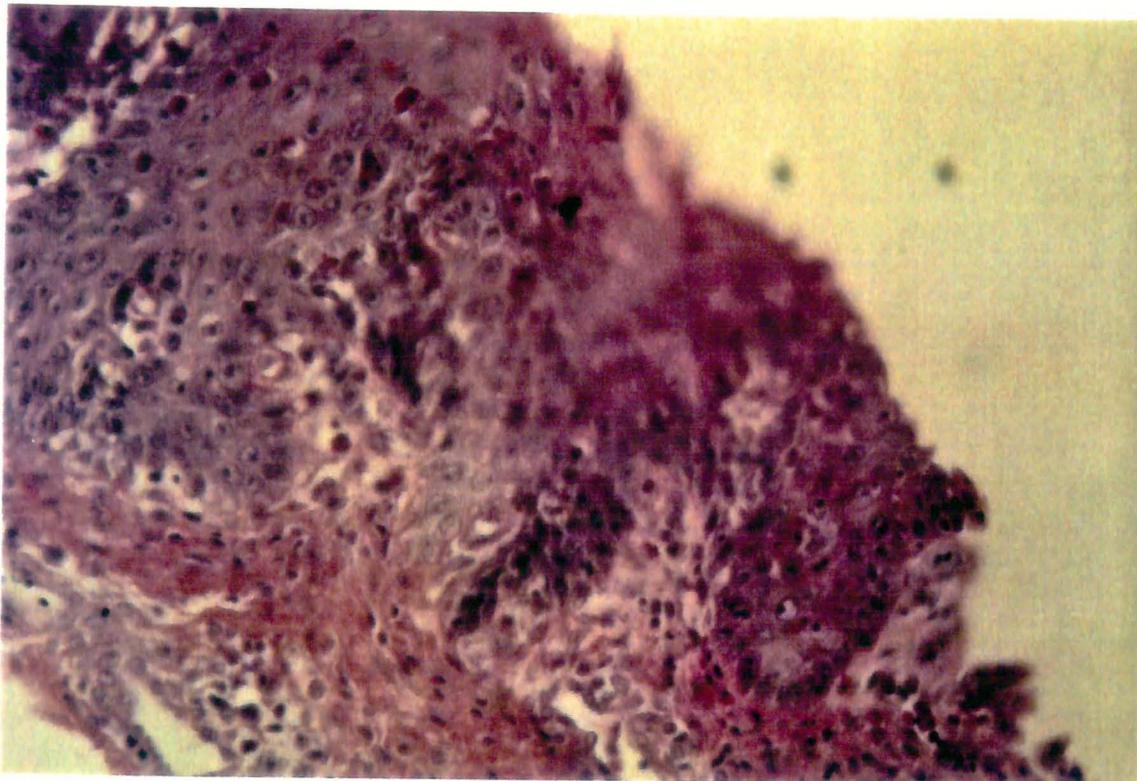


Figura 13 - Microfotografia do esôfago de animal do grupo solução, mostrando lesão neoplásica microinvasora. (Hematoxilina-Eosina, aumento de 250x).

Como se pode observar no Anexo B, houve uma tendência para o desenvolvimento de lesões de alto grau (P4) e câncer microinvasor (P5) no grupo solução, ao contrário do grupo controle, onde predominaram processos inflamatórios.

6 - DISCUSSÃO

6.1 Modelos Experimentais

Os modelos experimentais propiciam o estudo sistemático e compreensivo da morfogênese do tumor esofágico, isto é, o seguimento morfodinâmico do processo patológico, estágio por estágio (NAPALKOV; POZHARISSKI, 1969).

Vários animais já foram usados como modelos de carcinogênese esofágica, como ratos búfalo (REUBER, 1977), ratos albinos (NAPALKOV; POZHARISSKI, 1969), camundongos (RUBIO et al., 1987; KRUEL, 1992), com incidências variáveis de carcinoma esofágico, primatas (ADAMSON et al., 1977) e coelhos (IIZUKA et al., 1977, apud KRUEL, 1992). Galinhas foram usadas como modelo

experimental usando-se DEN intramuscular desenvolveram carcinoma hepatocelular e adenocarcinomas de rim (SCHMÄHL et al., 1978).

Foi observado um paralelismo na prevalência e incidência do carcinoma esofágico entre humanos e galinhas. A prevalência do carcinoma esofágico e faríngeo foi estudada em Zhongxiang, Hubei, China. Observaram-se, em 5.484 galinhas, originárias das comunidades imigrantes de Henan, 12 casos de carcinoma esofágico e faríngeo, enquanto que nenhum caso foi observado em 2.371 das originárias da comunidade nativa. É provável que esta incidência de câncer nas galinhas se deva ao fato de elas compartilharem os mesmos hábitos alimentares dos humanos. Nesta pesquisa obteve-se o desenvolvimento de lesões de alto grau e carcinoma microinvasor. A demonstração destas semelhanças do câncer esofágico entre galinhas e humanos sugere que esse possa ser um bom modelo animal para carcinogênese experimental (YANG, 1980).

6.2 Droga carcinógena e método de administração

Mais de 300 compostos nitrosos foram relatados como carcinógenos em uma ou mais espécies de animais (PREUSSMANN, 1984b). A DEN induz tumores em várias espécies animais, tendo

preferência para o sistema respiratório, digestivo alto e rins (LIJINSKY, 1980), o que demonstra ser ela um importante carcinógeno. Ela é encontrada em alimentos, drogas, ambientes industriais, além de ser formada endogenamente no estômago (MAGEE et al., 1976, apud SCHMÄL, 1978; PREUSSMANN, 1975, apud SCHMÄL, 1978). Administrada na água de beber na concentração de 0,04 ml/L, tornou-se a dose preconizada em vários modelos experimentais (KRUEL, 1992; RUBIO, 1983; RUBIO et al., 1987; RUBIO, 1988), por ser de fácil administração e exigir mínima manipulação dos animais, se comparada com os usos intra-peritoneal (LEVISON et al., 1979), subcutâneo (STINSON et al., 1978) ou intramuscular (SCHMÄHL et al., 1978).

Nessa pesquisa, a DEN induziu lesões no esôfago de frangos, de maneira semelhante à identificada em outros modelos.

6.3 Tempo do experimento, método de sacrifício e número de animais

Foi estabelecido um cronograma de sacrifício, de maneira que pudessem ser analisadas as alterações histológicas nos diversos períodos estabelecidos e haver a comparação destas alterações entre o grupo solução e o grupo controle. As etapas de sacrifício estabelecidas - T0

tempo inicial, T1 tempo 30 dias, T2 tempo 60 dias, T3 tempo 90 dias, T4 tempo 120 dias, T5 200 dias - demonstraram ser adequadas para o desenvolvimento de lesões escamosas intra-epiteliais de alto grau e de carcinoma invasor. Foram usados inicialmente 440 animais, 370 no grupo solução e 70 no grupo controle. Houve, entretanto, perdas acima do previsto, e os animais que morriam fora dos períodos pré-estabelecidos não puderam ser incluídos por impossibilidades técnicas, já que o experimento foi realizado em uma área rural do município de São Marcos, que não oferecia condições de armazenamento nem de necrópsia fora dos tempos pré-estabelecidos. No fim do estudo, o total de animais analisados foi de 183: 54 no grupo controle e 129 no grupo solução. O grupo controle apresentou uma perda de 22,8%; no grupo solução, a perda foi de 65,1%: 75,4% das perdas globais ocorreram entre 47- e 120- dia do experimento. Neste período, ocorreu presença de esofagite por fungos em considerável parcela das lâminas dos animais que foram analisados. Acredita-se que, se o experimento tivesse se prolongado por um período maior de tempo, o número de lesões intra-epiteliais de alto grau e de câncer invasivo teria sido mais expressivo, como demonstrou SCHMÄHL et al. (1978) que, tendo induzido tumores em galinhas pelo uso de DEN intramuscular, observou adenomas renais após 140 dias e tumores

hepáticos aos 575 dias. O método de sacrifício usado, anestesia com éter, foi adequado, visto que não acarretava sofrimento ao animal.

6.4 Análise histológica e classificação das lesões

Os cortes histológicos eram realizados nos 3 segmentos bem definidos do esôfago do frango, isto é, na primeira porção, no papo e no segmento distal. As lâminas eram codificadas de maneira que o patologista não soubesse a que grupo pertencia o animal.

A classificação adotada foi a utilizada por KRUEL (1992), modificada para frangos, e vem ao encontro do que afirma DAWSEY et al. (1994), para o qual displasias moderada e severa e carcinoma *in situ* são as únicas lesões associadas com uma aumento significativo para o desenvolvimento do câncer.

Estas classificações baseiam-se no sistema Bethesda para o colo uterino (THE 1988 BETHESDA SYSTEM, 1989) e vêm sendo cada vez mais utilizadas como elemento simplificador e unificador do diagnóstico de neoplasias. A abordagem com critérios idênticos para a linguagem científica presta-se para trabalhos multicêntricos.

6.5 Resultados

A ocorrência de uma maior agressividade, a perda de penas na região caudal e as práticas canibalísticas observadas no grupo solução decorrem, provavelmente, de alguma alteração molecular causada no organismo do animal pelo uso da nitrosamina. Embora em criações de frango possa ocorrer canibalismo, nos animais do grupo solução isto ocorreu de forma muito intensa, enquanto que no grupo controle ocorreu de forma mínima.

Houve uma distribuição eqüitativa de sexo entre o grupo controle e solução e nas várias fases de sacrifício, o que descarta erros de avaliação quanto ao fator sexo.

A presença de hiperemia foi mais intensa em T2 e T3 (Figura 14), principalmente no grupo controle, provavelmente por um processo infeccioso por fungos que estava presente nas lâminas examinadas, tanto que, em T4 e T5, não foi mais observada hiperemia no grupo controle. No grupo solução, a presença da hiperemia persistiu nas demais fases de sacrifício: houve correlação estatística para o desenvolvimento de

hiperemia neste grupo. Os variados graus de hiperemia podem ser explicados pelo processo infeccioso em T2 e T3 e, talvez, pela ação direta da nitrosamina sobre o epitélio esofágico, uma vez que, no grupo controle, não houve hiperemia macroscopicamente visível em T4 e T5. É sabido que as nitrosaminas precisam ser metabolizadas para tornarem-se carcinógenos (ARCHER, 1989). Esta ativação pode ocorrer em nível hepático (LIJINSKY, 1992; YANG et al., 1984b) ou, como demonstraram MURPHY e SPINA (1994) em ratos, no esôfago, pela presença de enzimas microsossomais de alta afinidade. O fato de haver uma toxicidade direta pode ser o fator indutor de uma resposta inflamatória mais persistente no grupo solução, bem como pode explicar as outras alterações microscópicas que ocorreram neste grupo. Em frangos, esta atividade local é desconhecida e, como este trabalho não investigou este fator, persiste a dúvida sobre esta ação direta.

No grupo controle, somente ocorreram alterações inflamatórias em nível microscópico. Já no grupo solução, ocorreram alterações intra-epiteliais, inicialmente de baixo grau em T3 e T4, e, posteriormente, de alto grau e carcinoma invasor em 2 casos em T5, havendo, então, uma tendência para o desenvolvimento de lesões precursoras e de carcinoma com o uso de diethilnitrosamina. Estes resultados confirmam os dados

observados por YANG (1980), em que não se observaram carcinomas em 2.371 galinhas de comunidades com baixa incidência de carcinoma esofágico, enquanto que foram observados 12 casos de carcinoma esofágico e faríngeo em 5.484 galinhas em comunidades com alta incidência de câncer de esôfago.

Os resultados obtidos nesta pesquisa confirmam a gênese do carcinoma epidermóide de esôfago em outros animais experimentais, pelo uso de DEN, e permitem que se equipare, por similaridade, o desenvolvimento do carcinoma epidermóide esofágico experimental com o de seres humanos, guardadas, evidentemente, as devidas proporções, o que contribui para um maior entendimento da patogênese deste carcinoma.

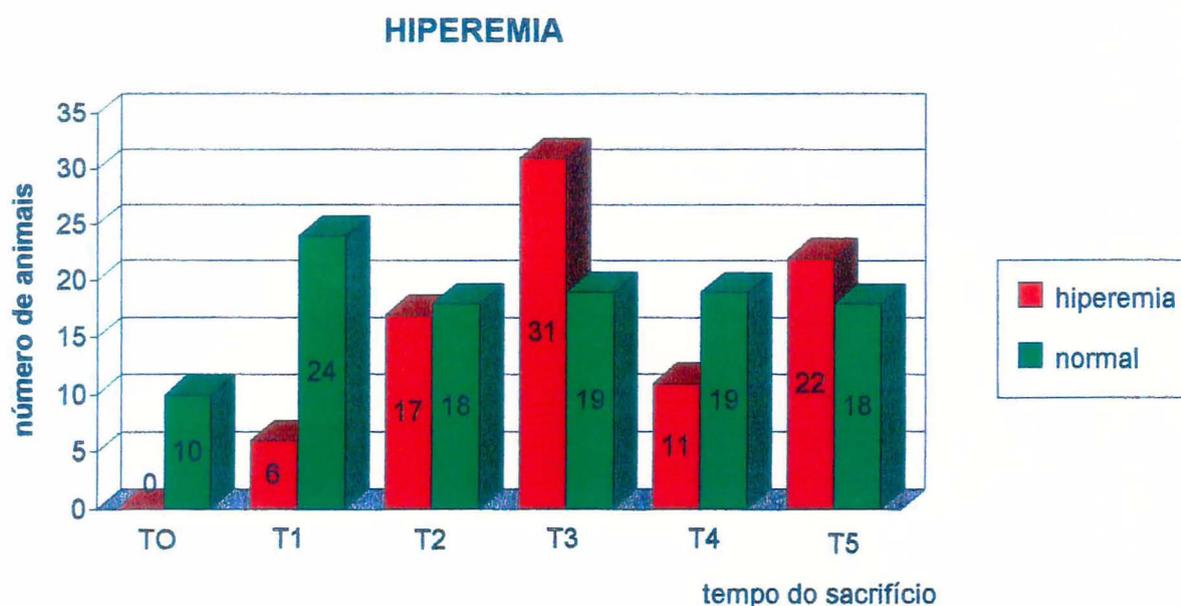


Figura 14. Distribuição de hiperemia e normalidade em animais em diferentes tempos de sacrifício.

7 CONCLUSÕES

Tendo em vista os objetivos propostos e os resultados obtidos, pode-se estabelecer as seguintes conclusões:

- 1) O modelo experimental testado é adequado ao estudo da carcinogênese esofágica induzida pela diethilnitrosamina em frangos.
- 2) Houve indução de lesões precursoras e câncer invasivo nos animais estudados.
- 3) As lesões foram do tipo intra-epitelial de alto grau e carcinoma microinvasor, e ocorreram em T5, isto é, no 200- dia do experimento.

8 PERSPECTIVAS

O uso de animais de experimentação para o estudo de patologias que comprometem humanos, com certeza contribui para o melhor entendimento da sua patogênese, permitindo não só compreender a forma como elas se desenvolvem mas também delinear o seu tratamento e cura.

Os avanços que vêm sendo obtidos nos estudos da biologia molecular também constituirão grande passo para o entendimento da fisiopatologia dos tumores, que com certeza tem sua aplicação em animais experimentais.

9 ANEXOS

ANEXO A

Ração Supra Frango Inicial A. P

Rótulo registrado no Ministério da Agricultura e Reforma Agrária sob número RS 4206 0121

COMPOSIÇÃO BÁSICA: milho, sorgo, farelo de arroz desengordurado, farelo de glúten de milho (60%), farelo de trigo, farinha de carne, farinha de sangue, farinha de peixe, farinha de ossos (16%), fosfato bicálcico, sal, pré-mix mineral e vitamínico.

EVENTUAIS SUBSTITUTIVOS: farelo de trigo e carbonato de cálcio.

NÍVEIS DE GARANTIA:	umidade (máxima)	13%
	prot. bruta (mínima)	21%
	extrato etéreo(mínima)	4%
	matéria fibrosa (máxima)	5%
	matéria mineral (máxima)	10%
	cálcio (máxima)	1,5%
	fósforo (mínima)	0,6%

ENRIQUECIMENTO POR KG DE RAÇÃO: Vitamina A (12.000 UI), Vitamina D3 (2.000 UI), Vitamina E (15 mg), Vitamina K (1,3 mg), Riboflavina (7 mg), Tiamina (2 mg), Pantotenato de Cálcio (14 mg), Vitamina B12 (20 mcg), Niacina (36 mg), Piridoxina (3 mg), Biotina (0,1 mg), Colina (350 mg), Ácido Fólico (0,55 mg), Antioxidante (125 mg), Antibiótico (10 mg), 3-Nitro (50 mg), Violeta de Genciana (10 mg), Coccidiostato (125 mg), Cobre (6 mg), Iodo (0,6 mg), Ferro (30 mg), Manganês (70 mg), Zinco (50 mg), Selênio (0,3 mg).

ANEXO B

Lesões Microscópicas no Grupo Solução e Controle em Relação ao
Tempo

Tempo	Grupo	P1	P2	P3	P4	P5	Total
T0	C	9	1	0	0	0	10
T1	C	8	2	0	0	0	10
	S	14	6	0	0	0	20
T2	C	4	6	0	0	0	10
	S	12	13	0	0	0	25
T3	C	2	8	0	0	0	10
	S	7	18	3	0	0	28
T4	C	0	7	0	0	0	7
	S	5	15	3	0	0	23
T5	C	3	4	0	0	0	7
	S	2	21	2	6	2	33

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, Y.; KITAMURA, K.; TSUTSUI, S.; IKEDA, Y.; MATSUDA, H.; SUGIMACHI. How to detect early carcinoma of the esophagus. **Hepato. Gastroenterol.**, 40:207-211, 1993.

ADAMSON, R.; KROLLOKOWSKI, F.; CORREA, P.; SIEBER, S.; DALGARD, D. Carcinogenicity of 1-methyl-1-nitrosurea in non human primates. **J. Natl. Cancer Inst.**, 59 (2):415-419, 1977.

ARCHER, M. C. Mechanisms of action of n-nitroso compounds. **Cancer Surveys**, 8:241-250, 1989.

BARTEK, J.; BARTAKOVA, J.; VOJTESEK, B. et al. Patterns of expression of the p53 tumour suppressor in human breast tissues and tumours in situ and in vitro. **Int. J. Cancer**, 46:839-844, 1979.

BARTEK, J.; BARTAKOVA, J.; VOJTESEK, B. et al. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. **Oncogene**, 6:1699-1703, 1991.

BECKER, H. D. Esophageal cancer, early disease: diagnosis and current treatment. **World J. Surg.**, 18:331-338, 1994.

BETHESDA SYSTEM FOR REPORTING CERVICAL/VAGINAL CYTOLOGIC DIAGNOSIS, 1988. **Acta Cytologic**, 33 (5):567-574, 1989.

BULAY, O.; MIRVISH, S. S. Carcinogenesis in rat esophagus by intraperitoneal injection of different doses of methyl-n-amyl nitrosamine. **Cancer Res.**, 39:3644-3646, 1979.

BURCH, P. R. J. Esophageal cancer in relation to cigarette and alcohol consumption. **J. Chron. Dis.**, 37:793-804, 1984.

CHANG-CLAUDE, J. C.; WAHRENDORF, J.; LIANG, Q. S.; REI, Y. G.; MUNOZ, N.; CRESPI, M.; RAEDSCH, R.; THURNHAM, D. I.; CORREA, P. An epidemiological study of precursor lesions of esophageal cancer among young persons in a high-risk population in Huixian, China. **Cancer Res.**, 50:2268-2274, 1990.

CHANG, F.; SYRJÄNEN, S.; WANG, L.; SYRJÄNEN, K. Infectious agents in the etiology of esophageal cancer. **Gastroenterology**, 103:1336-1348, 1992.

CLAPP, N. K.; CRAIG, A. W. Carcinogenic effects of diethylnitrosamine in RF mice. **J. Natl. Cancer Inst.**, 39:903-916, 1967.

CORREA, P. Precursors of gastric and esophageal cancer. **Cancer**, 50: 2554-2565, 1982.

CRESPI, M.; MUNOZ, N.; GRASSI, A.; ARAMESH, B.; AMIRI, G.;

MOJTABAI, A. Esophageal lesions in northern Iran: a premalignant condition? *Lancet*, 4: 217-220, 1979.

CRESPI, M.; MUNOZ, N.; GRASSI, A.; QIONG, S.; JING, W. K.;

JIEN, L. J. Precursor lesions of oesophageal cancer in a low-risk population in China: comparison with high-risk populations. *Int. J. Cancer*, 34:599-602, 1984.

CROSS, M.; DEXTER, T. M. Growth factors in development,

transformation and tumorigenesis. *Cell*, 64:271-280, 1991.

DAWSEY, S. M.; LEWIN, K. J.; PATH, F. R. C.; WANG, G.; LIU, F.;

NIEBERG, R. K.; YU, Y.; LI, J.; BLOT, W. J.; LI, B.; TAYLOR,

P. R. Squamous esophageal histology and subsequent risk of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer*, 74:1686-1692, 1994.

DE STEFANI, E.; MUNOZ, N.; ESTEVE, J.; VASALLO, A.;

VICTORIA, C. G.; TEUCHMANN, S. Mate drinking, alcohol,

- tobacco, diet and esophageal cancer in Uruguay. **Cancer Res.**, 50:426-431, 1990.
- DHAR, G. M.; SHAH, G. N.; NAHEED, B.; HAFIZA. Epidemiological trend in the distribution of cancer in Kashmir valley. **J. Epidemiol. Community Health**, 47:290-292, 1993.
- DOWLATSHAHI, K.; DANESHBOD, A.; MOBARHAN, S. Early detection of cancer of esophagus along Caspian litoral. **Lancet**, 1:125-126, 1978.
- DRUCKEY, H.; PREUSSMAN, R.; IVANKOVIC, S.; SCHMÄHL, D. Organotrope carcinogene wirkung bei 65 verschiedenen n-nitrosoverbindungen an bd-12 ratten. **Zeitschrift für Krebsforschung**, 69:103-201, 1967, apud MAGEE, P. N., 1989, p. 210.
- DRUCKREY, H.; KÜPFMÜLLER, K. Quantitative analyse der krebsentstehung. **Zeitschrift für Naturforschung**, 3b:254-266, 1948, apud MAGEE, P. N., 1989, p. 210.

DRUCKREY, H. et al. Carcinogenese wirkung von N-Methyl-N-Nitroso-Anilin. **Naturwissenschaften**, 48:722-723, 1961a apud KRUEL, C. D. P. 1992 p. 21.

DRUCKREY, H. et al. Chemische konstitution und carcinogenese wirkung bei nitrosaminen. **Naturwissenschaften**, 48:134, 1961b apud KRUEL, C. D. P. 1992, p. 21.

ENDER, F.; HAVRE, G.; HELGEBOSTAD, A.; KOPPANG, W.; MADSEN, R.; CEH, L. Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring. **Naturwissenschaften**, 51:637-638, 1964, apud LIJINSKY, W., 1992, p. 20

FORMAN, D.; SHUKER, D. Nitrate, nitrite and nitrosocompounds. **Cancer Surveys**, 8:205-206, 1989.

GHADIRIAN, P.; EKOÉ, J.; THOUÉZ, J. Food habits and esophageal cancer: an overview. **Cancer Detect. Prev.**, 16:163-168, 1992.

GREENEBAUM, E.; SCHEIBER, K.; SHU, Y.; KOSS, L. G. Use of the esophageal balloon in the diagnosis of carcinomas of the head, neck and upper gastrointestinal tract. **Acta Cytol.**, 28:9-15,1984.

GREENBLATT, M. S.; BENNETT, W. P.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C. C. Mutations in the p53 tumor supressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Res.**, 54:4855-4878, 1994.

HARTWELL, L. Defects in cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. **Cell**, 71:543-546, 1992.

HU, N.; DAWSEY, S. M.; WU, M.; BONNEY, G. E.; HE, L. J.; HAN, X.; FU, M.; TAYLOR, P. R. Familial aggregation of oesophageal cancer in Yangcheng county, Shanxi province, China. **Int. J. Epidem.**, 21:877-882, 1992.

IARC. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some n-nitroso compounds. **Iarc Monogr.**, 17:1-365, 1978.

IARC. Monogr. Eval. Carcinoma Risk Hum. 1993, vol. 56, p.83-113.

IGGO, R.; GATTER, K.; BARTEK, J.; LANE, D.; HARRIS, A. L.
Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. **Lancet**, 335:675-679, 1990.

IIZUKA, T.; ICHIMURA, S.; KAWACHI, T.; HIROTA, T.; ITABASHI, M.
Carcinoma of the esophagus of rabbits induced with n-methylbenzylamine and sodium nitrite. **Gann**, 68:829-835, 1977 apud KRUEL, C. D. P. 1992, p.22.

JANKOWSKI, J.; COGHILL, G.; HOPWOOD, D.; WOMSLEY, K. G.
Oncogene and onco-supressor gene in adenocarcinoma of the esophagus. **Gut**, 33:1033-1038, 1992.

JANZOWSKI, C.; EISENBRAND, G.; PREUSSMAN, R. Ocurrence and determination of n-nitroso-3-hydroxypyrrolidine in cure meat products. **J. Chromatog.**, 150:216-220,1978 apud LIJINSKY, 1992, p. 23.

JASKIEWICZ, K.; VENTER, F.; MARASAS, W. Cytopathology of the esophagus in Transkei. **JNCI**, 79:961-965, 1987.

JIANG, W.; KAHN, S. M.; TOMITA, N.; ZHANG, Y.; LU, S.; WEINSTEIN, I. B. Amplification and expression of the human cyclin d gene in esophageal cancer. **Cancer Res.**, 52:2980-2983, 1992.

JONES, A. R.; LJINSKY, W.; SINGER, G. M. Steric effects in the nitrosation of piperidines. **Cancer Res.**, 34:1079-1081, 1974.

JOZALA, E.; INFANTE, S.; MARCHINI, J. S.; OKANO, N. Alcoolismo, tabagismo e carcinoma epidermóide de terço médio do esôfago: estudo tipo caso-controle. **Rev. Saúde Publ.**, 17:221-225, 1983

KARP, J. E.; BRODER, S. New directions in molecular medicine. **Cancer Res.**, 54:653-665, 1994.

KITAGAWA, Y.; UEDA, M.; ANDO, N.; SHINOSAWA, Y.; SHIMIZU, N.; ABE, O. Significance of int-2/hst-1 coamplification as a prognostic factor in patients with esophageal squamous carcinoma. **Cancer Res.**, 51:1504-1508, 1991.

KITAMURA, K.; IKEBE, M.; MORITA, M.; MATSUDA, H.; KUWANO, H.; SUGIMACHI, K. The evaluation of submucosal carcinoma of the esophagus as a more advanced carcinoma. **Hepato. Gastroenterol.**, 40:236-239, 1993.

KOPPANG, N. An outbreak of toxic liver injury in ruminants. **Nord. Vet. Med.**, 16:305-322, 1964 apud LJINSKY, W., 1992, p. 20.

KRUEL, C. D. P. **Classificação citopatológica das lesões precursoras do carcinoma escamoso do esôfago: modelo experimental em camundongos.** São Paulo, 1992. 103p. Tese (Doutorado) Escola Paulista de Medicina.

LANE, D. P. Worrying about p53. **Current Biol.**, 2:581-583, 1992.

LEVISON, D. A.; HOPWOOD, D.; MORGAN, R. G. H.; COGHILL, G.; MILNE, G. A.; WORMSLEY, K. G. Oesophageal neoplasia in male wistar rats due to parenteral di(2-hydroxypropyl)-nitrosamine (dhpn): a combined histopathological, histochemical and electron microscopic study. **J. Path.**, 129:31-36,1979.

LIJINSKY, W. Comparative carcinogenicity of n-nitroso compounds in different species. **IARC**, 31:745-751, 1980.

LIJINSKY, W.; REUBER, M. D.; SINGER, G. M. Induction of tumors of the esophagus in rats by nitrosomethylalkylamines. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, 106:171-175, 1983.

LIJINSKY, W. **Chemistry and biology of n-nitroso compounds.** Cambridge Monographs on Cancer Research, Cambridge University Press, 1992.

LIVINGSTON, L. R.; WHITE, A.; SPROUSE, J.; LIVANOS, E.; JACKS, T.; TISTY, T. D. Altered cell cycle arrest and gene

amplification potential accompany loss of wild type p53. *Cell*, 70:923-935, 1992.

MAGEE, P. N.; BARNES, J. M. The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *British J. Cancer*, 10: 114-122, 1956.

MAGEE, P. N. The experimental basis for the role of nitroso compounds in human cancer. *Cancer Surveys*, 8:207-239, 1989.

MAGEE, P. N.; BARNES, J. M. Carcinogenic nitroso compounds. *Adv. Cancer Res.*, 10:163-246. 1967.

MAGEE, P. N.; FARBER, E. Toxic liver injury and carcinogenesis methylation of rat liver nucleic acids by dimeyhylnitrosamine in vitro. *Biochem. J.*, 83:114-124. 1962 apud LIJINSKY, W. 1992, P.151.

MAGEE, P. N.;; MONTESANO, R.; PREUSSMANN, R. N-nitroso compounds and related carcinogens. *ACS Monograph Series* No,

173, *Chemical Carcinogens*, p. 504-505, 1976 apud SCHMÄL, D.; HABS, M.; IVANKOVIC, S. 1978, p. 552.

MIRVISH, S. S. In vivo formation of n-nitroso compounds. Formation from nitrite and nitrogen dioxide, and relation to gastric cancer, 1982, In: MAGEE, P. N. (ed.) **Nitrosamines and Human Cancer**. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., p. 227-236 apud PREUSSMANN, R. 1984, p.12.

MONTESANO, R.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. **Int. J. Cancer**, 69:225-235, 1996.

MUKAIDA, H.; TOI, M.; HIRAI, T.; YAMASHITA, Y.; TOGE, T. Clinical significance of the expression of epidermal growth factor and its receptor in esophageal cancer. **Cancer**, 68:142-148, 1991.

MURPHY, S. E.; SPINA, D. A. Evidence for a high-affinity enzyme in rat esophageal microsomes which alpha-hydroxylates n'-nitrosornicotine. **Carcinogenesis**, 15:2709-2713, 1994.

NAIR, U. J.; AMMIGAN, N.; NAGABHUSHAN, M.; AMONKAR, A. J.; BHIDE, S. V. Effect of vitamin A status of rats on metabolizing enzymes after exposure to tobacco extract or n'nitrosonornicotine. **IARC**, p. 525-528, 1991.

NAPALKOV, V. P.; POZHARISSKI, K. M. Morphogenesis of experimental tumors of the esophagus. **J. Natl. Cancer Inst.**, 42:922-940, 1969.

NISHIMAKI, T.; TANAKA, O.; SUSUZI, T.; AIZAWA, K.; WATANABE, H.; MUTO, T. Tumor spread in superficial esophageal cancer: histopathological basis for rational surgical treatment. **World J. Surg.**, 17:766-772,1993.

OETTLE, G. J.; PATERSON, A. C.; LEIMAN, G.; SEGAL, I. Esophagitis in a population at risk for esophageal carcinoma. **Cancer**, 57:2222-2229, 1986.

OZAWA, S.; UEDA, M.; ANDO, N.; ABE, O.; SHIMIZU, N. High incidence of EGF receptor hyperproduction in esophageal squamous cell carcinoma. **Int. J. Cancer**, 39:333-337, 1987.

PITOT, H. C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, 72:962-970, 1993.

PREUSSMANN, R. Occurrence and exposure to n-nitroso compounds and precursors. **IARC**, 57:3-15, 1984a.

PREUSSMANN, R.; STEWART, B. W. N-nitroso carcinogens. In: Searle, C.E. (ed.) **Chemical Carcinogens**. 2. ed. (ACS Monograph Series n. 182), p.643-828, 1984b. American Chemical Society, Washington DC, apud MAGEE, P. N., 1989, p.210.

PREUSSMANN, R.: In *Handbuch der allgemeinen pathologie*. Vol. VI/6, p.421, Springer Verlag, Berlin, 1975 apud SCHMÄL, 1978.

PROLLA, J.C. **Mortalidade por neoplasias associadas ao tabagismo no Rio Grande do Sul, 1970-1989.** Porto Alegre, 1992. 99p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina da UFRGS.

QIU, S.; YANG, G. Precursor lesions of esophageal cancer in high-risk populations in Henan province, China. **Cancer**, 62:551-557, 1988.

REED, P. I.; JOHNSTON, B. J.; WALTERS, C. L.; HILL, M. J. Effect of ascorbic acid on the intragastric environment in patients at increased risk of developing gastric cancer. **IARC**, 139-142, 1991.

REFERENCES on naturally occurring neoplasms in animals, Rozof (ed). Registry of Veterinary Pathology, American Registry of Pathology. Washington, Armed Forces Institute of Pathology, 1974 apud KRUEL, C. D. P., 1992, p. 21.

REUBER, M. D. Carcinomas of the in rats diethylnitrosamine. **Eur. J. Cancer**, 11:97-99, 1975.

- REUBER, M. D. Histopathology of preneoplastic lesions of the esophagus in BUF rats ingesting diethylnitrosamine. **J. Natl. Cancer Inst.**, 58:313-321, 1977.
- RUBIO, C. A. Epithelial lesions antedating oesophageal carcinoma. **Path. Res. Pract.**, 176: 269-275, 1983.
- RUBIO, C. A. Post-carcinogen interval in carcinogenesis. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, 24:499-500, 1988.
- RUBIO, C. A.; LIU, F.; CHEJFEC, G.; SVEANDER, M. The induction of esophageal tumors in mice: dose and time dependency. **In Vivo**, 1:35-38, 1987.
- RUBIO C. A.; LIU F. S.; ZHAO H.Z. Histological Classification of intraepithelial neoplasias and microinvasive squamous carcinoma of the esophagus. **Am. J. Surg. Pathol.**, 13(8): 685-690, 1989.
- RUSTGI, A. K.; PODOSKY, D.K. Neoplasia and oncogenesis. In: SLEISENGER, M. H.; FORDTRAN J. S. (ed.) **Gastrointestinal**

disease. Philadelphia, Pennsylvania, W. B. Saunders Company, 1993. p. 87-112.

SAFFHILL, R.; MARGISON, G. P.; O'CONNOR, P. J. Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. **Bioch. Biophys. Acta**, 823:111-145, 1985.

SAKSHAUG, J; SÖGNEN, E.; HANSEN, M. A.; KOPPANG, N. Dimethylnitrosamine: Its hepatotoxic effect in sheep and its occurrence in toxic batches of herring meal. **Nature**, 206:1261-1262, 1965.

SASAJIMA, K; KAWACHI, T.; SANO, T. Esophageal and gastric cancers with metastases induced in dogs by n-ethyl-n'-nitrosoguanidine. **J. Natl. Cancer Inst.**, 58:1789-1794, 1977.

SASANO, H.; MIYAZAKI, S.; GOOUKON, Y.; NISHIHARA, T; SAWAI, T.; NAGURA, T. Expression of p53 in human esophageal cancer: An immunohistochemical study with correlation to

proliferating cell nuclear antigen expression. **Hum. Pathol.**, 23:1238-1243, 1992.

SCHMÄHL, D.; HABS, M.; IVANKOVIC, S. Carcinogenesis of n-nitrosodiethylamine (DENA) in chickens and domestic cats. **Int. J. Cancer**, 22:552-557, 1978.

SEN, N. P.; DONALDSON, B.; IYENGAR, J. R.; PANALAKS, T. Nitrosopyrrolidine and dimethylnitrosamine in bacon. **Nature**, 241:473:474, 1973.

SHEN, Q.; LIU, S.F.; DAWSEY, S.M.; CAO, J.; ZHOU, B.; WANG, D.Y.; CAO, S.G.; ZHAO, H.Z.; LI, G.Y.; TAYLOR, P.R.; GUO, W.D.; LIU, F.S.; BLOT, W.J.; LI, J.Y.; LI, B. Cytologic screening for esophageal cancer: results from 12,877 subjects from a high-risk population in China. **Int. J. Cancer**, 54:185-188,1993.

SPIEGELHALDER, B.; EISENBRAND, G.; PREUSSMANN, R. Contamination of beer trace with trace quantities of n-

nitrosodimethylamine. **Food Cosmet. Toxicol.**, 17:29-31, 1979 apud LIJINSKY, W., 1992, p. 5.

SPIEGELHALDER, B.; EISENBRAND, G.; PREUSSMANN, R.
Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva:
Possible relevance to in vivo formation of n-nitroso compounds.
Food Cosmet. Toxicol., 14:545-548, 1976 apud LIJINSKY, W.,
1992, p.5.

STEMMERMANN, G.; HEFFELFINGER, S. C.; NOFFSINGER, A.;
HUI, Y. Z.; MILLER, M.A.; FENOGLIO-PREISER, C. M. The
molecular biology of esophageal and gastric cancer and their
precursors: oncogenes, tumor suppressors genes, and growth factors.
Hum. Pathol., 25:968-981, 1994.

STINSON, S. F.; SQUIRE, R. A.; SPORN, M. B. Pathology of
esophageal neoplasms and associated proliferative lesions induced in
rats by N-methyl-n-benzilnitrosamine. **J. Natl. Cancer Inst.**,
61:1471-1475, 1978.

STINSON, S. F. Esophageal carcinoma. Animal model: esophageal carcinoma in the rat induced with methyl-alkyl-nitrosamines. **Amer. J. Path.**, 96:871-874, 1979.

SUGIMACHI, K.; KITAMURA, K.; BABA, K.; IKEBE, M.; KUWANO, H. Endoscopic diagnosis of early carcinoma of the esophagus using Lugol's solution. **Gastrointest. Endosc.**, 38:657-661, 1992.

SUGIMACHI, K.; IKEBE, M.; KITAMURA, K.; TOH, Y.; MATSUDA, H.; KUWANO, H. Long-term results of esophagectomy for early esophageal carcinoma. **Hepato-Gastroenterol.**, 40:203-206, 1993.

TAHARA, E. Growth factors and oncogenes in human gastrointestinal carcinomas. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, 116:121-131, 1990.

TRICKER, A. R.; SPIEGELHALDER, B.; PREUSSMANN, R. Environmental exposure to preformed nitroso compounds. **Cancer Surveys**, 8:251-272, 1989.

TSUDA, T.; TAHARA, E.; KAJIYAMA, G.; SAKAMOTO, H.; TERADA, M.; SUGIMURA, T. High incidence of coamplification of hst-1 and int-2 genes in human esophageal carcinomas. **Cancer Res.**, 49:5505-5508,1989.

ULRICH, A.; COUSSENS, L.; HAYFLICK, J. S.; DULL, T. J.; GRAY, A.; TAM, A. W.; LEE, J.; YARDEN, Y.; LIBERMANN, T. A.; SCHLESSINGER, J.; DOWNWARD, J.; MAYES, E. L. V.; WHITTLE, N.; WATERFIELD, M. D.; SEEBURG, P. H. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. **Nature**, 309:418-425, 1984.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. p53 function and dysfunction. **Cell**, 70:523-526,1992.

VON DAHN, H.; LOEWE, L.; BUNTON, C.A. Über die oxydation von ascorbinsäure durch salpetrige säure. Teil VI. übersicht und diskussion der ergebnisse. **Helv. Chim. Acta**, 43:320-333 apud LIJINSKY, W. 1992, p.36.

WANG, D.; XIANG, Y.; TANAKA, M.; LI, X.; LI, J.; SHEN, Q.; SUGIMURA, H.; KINO, I. High prevalence of p53 protein overexpression in patients with esophageal cancer in Linxian, China and its relationship to progression and progression. **Cancer**, 74:3089-3096,1994.

WANG, L. D.; HONG, J. Y.; QIU, S. L.; GAO, H.; YANG, C. S. Accumulation of p53 protein in human esophageal precancerous lesions: A possible early biomarker of carcinogenesis. **Cancer Res.**, 53:1783-1787, 1993.

WITTER, J. P.; GATLEY, S. J.; BALISH, E. Distribution of nitrogen-14 from labelled nitrate ($^{13}\text{NO}_3$) in humans and rats. **Science**, 205:1335-1377, 1979.

WU, Y.; HUANG, G.; SHAO, L.; ZHANG, Y.; LIN, X. Progress in the study and surgical treatment of cancer of the esophagus in China, 1940-1980. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, 84:325-333,1982.

YANG C. S.; Research on esophageal cancer in China: a review. **Cancer Res.**, 40: 2633-2644, 1980.

YANG, C. S.; SUN, Y.; YANG, Q.; MILLER, K. W.; LI, G.; ZHENG, S.; ESRHOW, A.; BLOT, W.; LI, J. Vitamin A and other deficiencies in Linxian, a high esophageal cancer incidence area in northern China. **JNCI**, 73:1449-1453, 1984a.

YANG, C. S.; TU, Y. Y.; HONG, J.; PATTEN, C. Metabolism of nitrosamines by cytochrome p-450 isozymes. **IARC**, 57:423-427, 1984b.

YANO, H.; SHIOZAKI, H.; KOBAYASHI, K.; YANOT, T.; TAHARA, H.; TAMURA, S.; MORI, T. Immunohistochemical detection of the epidermal growth factor receptor in human esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer**, 67:91-98, 1991.

YIN, Y.; TAINSKY, M.A.; BISCHOFF, F. Z.; STRONG, L. C.; WAHL, G. M. Wild type p53 restores cell cycle control and inhibits gene

amplification in cells with mutant p53 alleles. **Cell**, 70:937-948, 1992.

YOSHIDA, K.; KUNIYASU, H.; YASUI, W.; KITADAY, Y.; TOGE, T.; TAHARA, E. Expression of growth factors and their receptors in human esophageal carcinomas: Regulation of expression by epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, 119:401-407, 1993.

YU, M.C.; GARABRANT, D. H.; PETERS, J. M.; MACK, T. Tobacco, alcohol, diet, occupation and carcinoma of the esophagus. **Cancer Res.**, 48:3843-3848, 1988.

11 ABSTRACT

An experimental study in chickens (*Gallus domesticus*) was done in order to induce esophageal carcinoma by diethylnitrosamine, in the concentration of 0,04 ml/l in drinking water. One hundred eighty three animals were arranged into one treated (129 animals) and one control group (54 animals). The experiment was done in a 200 days period. The animals were sacrificed in the days 0, 30, 60, 90, 120 and 200. Hystological esophageal evaluation was done during each period. High grade intra-epitelial scamous lesions and invasor carcinoma were found in the treated group. These results demonstrated that chickens can be used as experimental models of esophageal carcinoma induced by diethylnitrosamine.