

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:
CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

**PESQUISA DO LINFONODO SENTINELA EM
CÂNCER GÁSTRICO INDUZIDO POR
N-METIL-N-NITROSOUREA:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR**

Dissertação de Mestrado

Lissandro Tarso

Orientador: Prof^o Dr. Carlos Cauduro Schirmer

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Luíse Meurer

Porto Alegre, março de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA:
CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

**PESQUISA DO LINFONODO SENTINELA EM
CÂNCER GÁSTRICO INDUZIDO POR
N-METIL-N-NITROSOUREA:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR**

Dissertação de Mestrado

Lissandro Tarso

Orientador: Prof^o Dr. Carlos Cauduro Schirmer

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Luíse Meurer

Porto Alegre, março de 2011

T193p Tarso, Lissandro
Pesquisa do linfonodo sentinela em câncer gástrico induzido por *N-Methyl-N-Nitrosourea* : estudo experimental em ratos Wistar /
Lissandro Tarso ; orient. Carlos Cauduro Schirmer ; co-orient. Luise Meurer. – 2009.
87 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Neoplasias gástricas 2. Biópsia de linfonodo sentinela 3. Metilnitrosouréia 4. Neoplasias experimentais 5. Cirurgia I. Schirmer, Carlos Cauduro II. Meurer, Luise III. Título.

NLM: WI 320

À minha esposa **Helena**,

Pelo seu amor, incentivo e compreensão.

Aos meus pais **Alcides e Rejane**,

Pelo incentivo, amor e dedicação na educação dos filhos.

Às minhas irmãs **Franciele e Helen**,

Pelo conforto, carinho e colaboração nas horas difíceis.

Ao professor, orientador e amigo,

Carlos Cauduro Schirmer,

Exemplo de profissional e ser humano.

AGRADECIMENTOS

À enfermeira **Marta Giotti Cioato** e a veterinária **Fabíola Schons Meyer**, da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela competência, carinho, ética e dedicação.

À professora do Departamento de Patologia da UFRGS, **Dr^a Luíse Meurer**, pela orientação, análise e digitalização das lâminas.

À professora do Departamento de Medicina Interna da UFRGS, **Dr^a Nadine de Oliveira Clausell**, pelo incentivo à pesquisa nos primeiros anos da graduação em medicina.

À técnica em patologia **Flávia Grossmann** pela presteza e competência no processamento das lâminas.

Aos **professores** do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aos **médicos contratados** do Serviço de Cirurgia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo ensinamento e dedicação.

Ao **Hospital de Clínicas de Porto Alegre** por ser um Centro de Excelência em Assistência e Pesquisa.

SUMÁRIO

Agradecimentos	06
Lista de Figuras	08
Lista de Tabelas	09
Lista de Abreviaturas	10
Introdução	11
Revisão da Literatura	14
Referências Bibliográficas	21
Objetivos	27
Abstract	28
Resumo	29
Introdução	30
Materiais e Métodos	31
Resultados	38
Discussão	44
Conclusões	48
Perspectivas	49
Referências Bibliográficas	50
Artigo em Português	55
Artigo em Inglês	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exposição do estômago _____	33
Figura 2	Infiltração de azul patente na subserosa _____	34
Figura 3	Azul patente na subserosa da lesão suspeita _____	34
Figura 4	Migração do azul patente através dos linfáticos I _____	35
Figura 5	Migração do azul patente através dos linfáticos II _____	35
Figura 6	Eutanásia com secção de grandes vasos cardíacos _____	36
Figura 7	Sarcoma Gástrico (HE 40X) _____	40
Figura 8	Sarcoma Gástrico (HE 400X) _____	41
Figura 9	Processo inflamatório da mucosa gástrica (HE 100X) _____	41
Figura 10	Processo inflamatório da mucosa gástrica (HE 400X) _____	42
Figura 11	Adenocarcinoma gástrico (T2a) (HE 40X) _____	42
Figura 12	Adenocarcinoma gástrico (T2a) (HE 100X) _____	43
Figura 13	Adenocarcinoma gástrico (T2a) (HE 400X) _____	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Modelos experimentais _____	20
Tabela 2 Médias das variáveis da amostra _____	39
Tabela 3 Resultado dos exames histopatológicos das lâminas gástricas_____	40

LISTA DE ABREVIATURAS

TC -	Tomografia computadorizada
TNM -	<i>Tumour, nodes and metastases</i>
LS -	Linfonodo sentinela
VPN -	Valor preditivo negativo
VPP -	Valor preditivo positivo
MNNG -	<i>N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine</i>
MNU -	<i>N-methyl-N-nitrosurea</i>
PPM -	Partes por milhão
DMSO-	Dimetilsulfóxido
F344 -	Fischer 344
HE-	Hematoxilina e eosina
IC-	Intervalo de confiança

INTRODUÇÃO

O câncer gástrico é a segunda causa de morte por neoplasia maligna no mundo, afetando cerca de um milhão de pessoas a cada ano.¹ Apesar da redução da incidência nas últimas décadas, persiste como problema de saúde pública em nível mundial. A maior incidência, superior a 69 casos por 100.000 habitantes, ocorre no nordeste da Ásia (Japão, Coreia do Sul e China).² No Brasil, a estimativa para o ano de 2010 é de 14 homens e 8 mulheres por 100.000 habitantes/ano.³

Nos países com grande incidência de câncer gástrico há programas de rastreamento para os grupos de alto risco, entretanto, as evidências clínicas atuais são insuficientes para recomendá-los em nível mundial.^{2,4} No Japão, a sobrevivência total é estimada em 52%, atribuída à detecção precoce em programas de rastreamento. Nos EUA, Europa e China, varia entre 20 e 25%.⁵

Nos últimos anos, os avanços nos métodos diagnósticos proporcionaram um estadiamento mais acurado da doença, porém o prognóstico ainda permanece reservado. O único tratamento potencialmente curativo é a ressecção cirúrgica com esvaziamento linfonodal.⁶ Tumores restritos ao estômago, com invasão mínima da parede, têm potencial de cura superior a 90%.⁷

O envolvimento linfonodal no câncer gástrico é descrito por 2 sistemas principais: o estadiamento da *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, baseado no número de linfonodos positivos, e o sistema japonês, *Japanese Classification of Gastric Carcinoma (JCGC)*, baseado na localização dos

linfonodos positivos.¹ A definição da presença de metástases em linfonodos é crucial para o prognóstico dos pacientes.⁸ Diversos estudos prospectivos têm tentado definir a extensão ideal da linfadenectomia regional nos pacientes com câncer gástrico.⁹ Há evidências que a dissecação linfonodal D2 pode aumentar a sobrevida a longo prazo em pacientes com metástases linfonodais, sendo procedimento padrão no tratamento curativo de câncer gástrico na Coreia do Sul e no Japão.¹⁰ Dois estudos europeus, que compararam disseções D1 e D2, falharam em demonstrar maior sobrevida nos pacientes submetidos à dissecação D2, mas a falta de experiência com o procedimento cirúrgico e cuidados pós-operatórios podem ter contribuído para o resultado insatisfatório.^{11,12} Uma revisão da Cochrane de 2004 demonstrou aumento significativo da mortalidade após dissecação D2, sem benefício na sobrevivência.¹³ Um grande estudo japonês recente concluiu que dissecação além de D2, com dissecação de linfonodos para-aórticos, não parece ter qualquer benefício.²

A gastrectomia com dissecação linfonodal é responsável por maior morbidade, maior necessidade de transfusão sanguínea e maior permanência hospitalar.¹⁴⁻¹⁷ As técnicas diagnósticas, incluindo tomografia computadorizada (TC) e ultrassom, permanecem insatisfatórias para prever acuradamente a presença de metástases em linfonodos regionais.^{6,10} A acurácia pré-operatória da TC e da ultrassonografia endoscópica para detecção de metástases linfonodais varia entre 50 e 70%.^{18,19}

A frequência de metástases linfonodais é menor que 5% em pacientes com tumores mucosos e cerca de 16% em submucosos.¹⁰ Assim, em cerca de 95% dos pacientes com carcinoma gástrico precoce a linfadenectomia poderia

ser evitada e volume significativo do estômago preservado, reduzindo morbidade e mortalidade.²⁰⁻²³

O linfonodos sentinela (LS) é definido como o primeiro sítio de possíveis metástases ao longo da rota de drenagem linfática do tumor primário. O termo Linfonodo Sentinela surgiu em 1977, quando Cabañas descreveu e usou a técnica de linfangiogramas em pacientes com câncer de pênis.²⁴ A técnica não foi aplicada até 1992, quando Morton a reintroduziu em pacientes com melanoma cutâneo.²⁵ Desde então, tem sido aplicada rotineiramente no melanoma e no câncer de mama e, atualmente, tem sido avaliada no tratamento de pacientes com outros tumores, entre eles o câncer gástrico.^{8,21,26}

A biópsia do LS em câncer gástrico é alvo de controvérsias, pois alguns autores consideram-na pouco efetiva devido à complexa rede de linfáticos gástricos e à presença frequente de metástases saltatórias.^{27,28} Diversos estudos têm contrariado essa ideia, demonstrando que o LS pode ser promissor nos pacientes com câncer gástrico.¹⁹⁻²³

REVISÃO DA LITERATURA

Câncer Gástrico e Linfonodo Sentinela

O câncer gástrico precoce é definido como tumor que não ultrapassa a mucosa e/ou submucosa, independente do comprometimento linfonodal. O tratamento largamente utilizado no Japão e em alguns países europeus tem sido a gastrectomia total ou subtotal com linfadenectomia D2.² Entretanto, a incidência de metástases linfonodais em câncer gástrico mucoso e submucoso é de 2-5% e 13-20%, respectivamente.²⁹ Assim, muitos pacientes com lesões precoces estão sendo submetidos a disseções desnecessárias, aumentando morbidade e mortalidade.

A aplicabilidade do linfonodo sentinela em pacientes com câncer gástrico vem sendo amplamente pesquisada nos últimos anos, principalmente nos países asiáticos, com destaque para o Japão, onde a incidência é elevada e há programas para rastreamento da doença.³⁰

Mochiki e colaboradores avaliaram a possibilidade do conceito do linfonodo sentinela ser aplicado em pacientes com câncer gástrico através da técnica guiada por radiofármaco. Pacientes com adenocarcinoma gástrico, sem diagnóstico clínico de comprometimento linfonodal (T1, T2 ou T3N0M0), foram submetidos à gastrectomia e ao mapeamento dos linfonodos sentinelas com tecnécio-99. Depois de localizados, os LSs foram retirados e a gastrectomia parcial ou total foi realizada com disseção D2. A detecção dos LSs teve sucesso em 96% dos casos. A sensibilidade do estudo foi de 100% para tumores T1, 92% para tumores T2 e 62% para tumores T3. O estudo concluiu

que a técnica do LS é reproduzível em pacientes com câncer gástrico precoce (T1).²¹

Ishizakia e colaboradores demonstraram a possibilidade de identificação dos linfonodos sentinelas com uso de corante linfático. O estudo foi realizado em pacientes com tumores T1 e T2. Azul de isosulfano foi injetado na região submucosa do sítio tumoral através de um endoscópio e os LSs foram identificados e avaliados quanto à presença ou ausência de metástases. Gastrectomia padrão com linfadenectomia D2 foi realizada em todos os pacientes. A identificação do LS teve sucesso em 97% dos casos e a acurácia da detecção de metástases linfonodais foi de 86%.²²

Hiratsuka e colaboradores realizaram o mapeamento linfático em 74 pacientes com tumores T1 e T2 submetidos à gastrectomia com dissecação linfonodal estendida (linfadenectomia D2). LSs foram encontrados em 99% dos casos. Em pacientes com tumor T1 a sensibilidade, especificidade, acurácia e VPN foram de 100%.³¹

Boff e colaboradores usaram azul patente para o mapeamento linfático de pacientes com adenocarcinoma gástrico sem evidências pré-operatória de comprometimento linfático. Após coleta dos LSs, foi realizada gastrectomia com linfadenectomia D2. A acurácia do LS em prever comprometimento linfonodal foi de 91,6%.³²

Vários estudos usando radiofármaco, corante ou a combinação desses, ratificaram os resultados prévios. O sucesso de detecção dos LSs variou entre 79% a 97%, a sensibilidade 87 a 100%, a especificidade 95 a 100%, o valor preditivo positivo 90 a 100% e o valor preditivo negativo 79 a 100%. Todos

estudos concluíram que o mapeamento do LS é reproduzível e acurado em prever comprometimento linfonodal.^{27,33-35}

Morita e colaboradores examinaram todos os linfonodos ressecados dos pacientes com câncer gástrico (T1-T2) que foram submetidos à biópsia do LS e gastrectomia. Exame imuno-histoquímico revelou que metástases, especialmente micrometástases, não foram diagnosticadas em 9% dos casos, porém limitavam-se às estações às quais os LSs pertenciam. A partir desses dados, os autores consideraram aceitável limitar a dissecação linfonodal aos sítios aos quais pertencem o LS positivo.³⁶

Alguns cirurgiões estão realizando cirurgias guiadas por LS em tumores precoces (T1). Pacientes com metástases nos LSs são submetidos à gastrectomia D2 e, em casos de LS negativo, é realizada uma cirurgia menos extensa, com preservação do piloro e vago. Wang e colaboradores³⁰ publicaram resultados preliminares de estudo com ressecção laparoscópica local guiada por LS. Pacientes com tumores T1N0M0 com LS negativo foram submetidos à ressecção laparoscópica limitada. Todos os pacientes apresentaram LS negativo para metástases no exame de congelação e nenhum paciente foi submetido à ressecção estendida. Ichikura e colaboradores também avaliaram a gastrectomia limitada guiada por LS em pacientes com câncer gástrico precoce. Pacientes com LS negativo para metástases foram submetidos à dissecação linfonodal das estações às quais os LSs pertenciam. Nenhum dos pacientes com cirurgia limitada apresentou metástases linfonodais e sobreviveram sem evidência de recorrência. A média de área de estômago ressecado foi significativamente menor do que o procedimento padrão (92 ± 50 versus 189 ± 64 cm², $p < 0,001$). O estudo concluiu

que a cirurgia com gastrectomia limitada associada à biópsia do LS foi considerada segura e aceitável em pacientes com câncer gástrico precoce (T1N0M0).³⁷

A biópsia do LS mostra-se altamente reproduzível e promissora no tratamento dos pacientes com câncer gástrico precoce. Há necessidade de aprimoramento da técnica e realização de novos estudos com maior número de pacientes a fim de consolidar o seu benefício.

Modelos Experimentais de Carcinogênese em Ratos e Camundongos

Anatomia e Histologia

O estômago dos ratos é claramente separado em duas partes: o pré-estômago (porção proximal) e o corpo (porção distal). As características histológicas do pré-estômago são similares as do esôfago, com epitélio escamoso, e o restante do estômago com epitélio glandular. A região glandular é subdividida em camadas mucosa, submucosa, muscular própria e serosa.³⁸ Não foi encontrada na literatura a descrição da drenagem linfática específica e detalhada do estômago desses animais.

Modelos Experimentais

A carcinogênese é um processo sequencial e consiste na iniciação,

promoção e progressão tumoral. O câncer é o resultado do dano ao DNA, envolvendo mutação, perda, amplificação e recombinação de genes.³⁹ A carcinogênese química é órgão-específica e depende de muitos fatores, incluindo a estabilidade do carcinógeno, rota de captação, distribuição, ativação metabólica, detoxificação e eliminação.⁴⁰

Sugimura criou o primeiro modelo experimental de adenocarcinoma gástrico em ratos usando N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) publicado em 1967.⁴¹ Desde então, outros animais demonstraram suscetibilidade à carcinogênese, incluindo *hamsters*, *ferrets* e cachorros.^{42,43}

As nitrosaminas são consideradas potentes indutoras de tumores do trato digestivo. Estudo realizado por Binato e colaboradores avaliou o potencial da Dietilnitrosamina (DEN) na indução de tumores gástricos em camundongos. O estudo obteve altas taxas de indução de carcinoma epidermoide (46%) e adenocarcinoma (30%) gástrico.⁴⁴

O N-metil-N-nitrosourea (MNU) é um potente mutágeno e sua ação carcinogênica direta produz tumores em várias espécies e diversos órgãos, incluindo o sistema nervoso central, intestino, rim, estômago e pele.⁴⁵⁻⁴⁷ Em ratos, há evidências de que administração intermitente de MNU tem a capacidade de induzir câncer no pré-estômago e a administração contínua no epitélio glandular.⁴⁸ Os modelos experimentais de câncer gástrico com MNU demonstraram tumores mais semelhantes aos humanos, em relação às características histopatológicas, quando comparados aos tumores tipicamente encontrados em ratos.^{49,50} Altas doses em curtos períodos induzem mais lesões do que baixas doses por longos períodos.⁵¹

Maekawa e colaboradores pesquisaram o efeito do uso contínuo do MNU diluído em água, administrado *ad libitum* na concentração de 100 ppm em ratos F344. Após 42 semanas, 18% dos ratos apresentaram adenocarcinoma gástrico.⁵² Tatematsu e colaboradores utilizaram MNU em camundongos C3H na concentração de 120 ppm por 30 semanas e obtiveram 40% de adenocarcinomas após 54 semanas.⁵⁰ Yamamoto e colaboradores obtiveram 60% de adenocarcinomas com a mesma concentração administrado por 42 semanas a camundongos C3H.⁵³

Hirota e colaboradores administraram MNU diluído em água destilada na concentração de 400 ppm a ratos F344 por 25 semanas ou 15 semanas.⁴⁸ Os animais foram sacrificados 20 semanas após a cessação da ingestão do carcinógeno. Adenocarcinoma invasivo foi encontrado em 100% e 38% dos ratos, respectivamente. O MNU induziu seletivamente câncer gástrico na região glandular em alta incidência. Shimizu e colaboradores, usando a mesma concentração em ratos F344 por 12 semanas, obtiveram, após 36 semanas, 27 lesões no estômago de 20 ratos.⁵⁴ Os modelos de carcinogênese gástrica estão resumidos na Tabela 1.

O MNU comprovadamente induz câncer gástrico na região glandular do estômago de camundongos e ratos. As características histopatológicas dos tumores induzidos pelo MNU são semelhantes aos tumores encontrados em humanos.^{50,51} Portanto, esses modelos experimentais são extremamente úteis nas pesquisas relacionadas ao câncer gástrico.

Tabela 1. Modelos experimentais de carcinogênese gástrica com MNU em ratos F344 e camundongos C3H.

Autor	Animais	MNU (ppm)	Exposição*	Morte*	Adenocarcinoma gástrico (%)
Maekawa	F344	100	42	42	18
Tatematsu	C3H	120	30	54	40
Yamamoto	C3H	120	42	42	60
Hirota	F344	400	25	45	100
Shimizu	F344	400	12	36	100

*semanas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 2006; 24(14):2137-2150.
- (2) Mitsuru S, Takeshi S, Seichiro Y, et al. D2 Lymphadenectomy alone or with para-aortic nodal dissection for gastric cancer. *N Engl J Med* 2008; 359(5):453-462.
- (3) Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância do Câncer. Estimativas 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2010.
- (4) Hartgrink HH, Jansen E, van Grieken N, et al. Gastric cancer. *Lancet* 2009; 374(9688):477-490.
- (5) Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2(9):533-543.
- (6) Wang LB, Shen JG, Dong FL, et al. Laparoscopic local resection based on sentinel node evaluation for early gastric cancer: a preliminary report. *J Gastrointest Surg* 2008; 12(8):1359-1363.
- (7) Sue-Ling HM, Johnston D, Martin IG, et al. Gastric cancer: a curable disease in Britain. *BMJ* 1993; 307:591-596.
- (8) Rabin I, Chikman B, Halpern Z, et al. Sentinel node mapping for gastric cancer. *Isr Med Assoc J* 2006; 8(1):40-43.
- (9) Becher RD, Shen P, Stewart JH, et al. Sentinel lymph node mapping for gastric adenocarcinoma. *Am Surg* 2009; 75(8):710-714.

- (10) Chen Li , Kim S, Lai JF, et al. Solitary lymph node metastasis in gastric cancer. *J Gastrointest Surg* 2008; 12(3):550-554.
- (11) Bonenkamp JJ, Hermans J, Sasako M, et al. Extended lymph-node dissection for gastric cancer. *N Engl J Med* 1999; 340:908-914.
- (12) Cuschieri A, Weeden S, Fielding J, et al. Patient survival after D1 and D2 resections for gastric cancer: long-term results of the MRC randomized surgical trial. *Br J Cancer* 1999; 79:1522-1530.
- (13) McCulloch P, Nita ME, Kazi H, et al. Extended versus limited lymph nodes dissection technique for adenocarcinoma of stomach. *Cochrane Database Syst Rev* 2004.
- (14) Wanebo HJ, Kennedy BJ, Winchester DP, et al. Gastric carcinoma: does lymph node dissection alter survival? *J Am Coll Surg* 1996; 183:616-624.
- (15) Cushieri A, Fayers P, Fielding J, et al. Postoperative morbidity and mortality after D1 and D2 resections for gastric cancer: preliminary results of the MRC randomized controlled surgical trial. *Lancet* 1996; 347:995-999.
- (16) Dent DM, Madden MV, Price SK. Randomized comparison of R1 and R2 gastrectomy for gastric carcinoma. *Br J Surg* 1988; 75:110-116.
- (17) Robertson CS, Chung SC, Woods SD, et al. A prospective randomized trial comparing R1 subtotal gastrectomy with R3 total gastrectomy for antral cancer. *Ann Surg* 1994; 220:176-182.
- (18) Park SR, Lee JS, Kim CG, et al. Endoscopic ultrasound and computed tomography in restaging and predicting prognostic after neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced gastric cancer. *Cancer* 2008; 112:2368-2376.

- (19) Lee JH, Ryu KW, Kim CG, et al. Sentinel node biopsy using dye and isotope double tracers in early gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2006; 13:1168-1174.
- (20) Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M, et al. Radio-guided sentinel node detection for gastric cancer. *Br J Surg* 2002; 89:604-608.
- (21) Mochiki E, Kuwano H, Kamiyama Y, et al. Sentinel lymph node mapping with technetium-99m colloidal rhenium sulfide in patients with gastric carcinoma. *Am J Surg* 2006; 191(4):465-469.
- (22) Ishizaki M, Kurita A, Kubo Y, et al. Evaluation of sentinel node identification with isosulfan blue in gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32(2):191-196.
- (23) Zulfikaroglu B, Koc M, Ozmen M, et al. Intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy using radioactive tracer in gastric cancer. *Surgery* 2005; 138(5):899-904.
- (24) Cabanas RM. An approach to the treatment of penile carcinoma. *Cancer* 1977; 39:456-466.
- (25) Morton DL, Wen DR, Wong JH, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992; 127:392-399.
- (26) Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, et al. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg* 1994; 220:391-401.
- (27) Aikou T, Higashi H, Natsugoe S, et al. Can sentinel node navigation surgery reduce the extent of lymph node dissection in gastric cancer? *Ann Surg Oncol* 2001; 8(9 Suppl):90-93.
- (28) Park DJ, Lee HJ. Sentinel node biopsy for cT1 e cT2a gastric cancer. *EJSO* 2006; 32:48-54.

- (29) Seto Y, Shimoyama S, Kitayama J, et al. Lymph node metastasis and preoperative diagnosis of depth of invasion in early gastric cancer. *Gastric Cancer* 2001; 4:34-38.
- (30) Wang LB, Shen JG. Laparoscopic local resection based on sentinel node evaluation for early gastric cancer: a preliminary report. *J Gastr Surg* 2008;12:1359-1363.
- (31) Hiratsuka M, Miyashiro I, Ishikawa O, et al. Application of sentinel node biopsy to gastric cancer surgery. *Surgery* 2001; 129:335-340.
- (32) Boff MF, Schirmer CC, Edelweiss MI, et al. Sentinel lymph node mapping in gastric cancer using patent blue dye. *Rev Col Bras Cir* 2007; 34 (6)367-373.
- (33) Aikou T, Kitagawa Y, Kitajima M, et al. Sentinel lymph node mapping with gastrointestinal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25(2):269-277.
- (34) Uenosomo Y, Natsugoe S, Ehi K, et al. Detection of sentinel nodes and micrometastases using radioisotope navigation and immunohistochemistry in patients with gastric cancer. *Br J Surg* 2005; 92(7):886-889.
- (35) Kim MC, Kim HH, Jung GJ, et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy using ^{99m}Tc tin colloid in gastric cancer. *Ann Surg* 2004; 239(3):383-387.
- (36) Morita D, Tsuda H, Ichikura T, et al. Analysis of sentinel node involvement in gastric cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5:1046-1052.
- (37) Ichikura T, Sugasawa H, Sakamoto N, et al. Limited gastrectomy with dissection of sentinel node stations for early gastric cancer with negative sentinel node biopsy. *Ann Surg* 2009, 249 (6):942-947.

- (38) Percy DH, Barthold SW. Pathology of laboratory rodents and rabbits. Third edition, 2007, Blackwell Publishing, 325p.
- (39) Furihata C, Matsushima T. Reviews in Genetic Toxicology: In vivo short-term assays for tumor initiation and promotion in the glandular stomach of Fischer rats. *Mutation Research* 1995; 339:15-35.
- (40) Sugimura T, Terada M. Experimental chemical carcinogenesis in the stomach and colon. *Jpn J Clin Oncol* 1998; 28(3):163-167.
- (41) Sugimura T, Sugimura S. Tumor production in glandular stomach of rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. *Nature* 1967; 216:943-944.
- (42) Fujimura S, Kogure K, Oboshi S, et al. Production of tumors in glandular stomach of hamsters by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. *Cancer Res* 1970; 30:1444-1448.
- (43) Fox JG, Wishnok JS, Murphy JC, et al. MNNG-induced gastric carcinoma in ferrets infected with *Helicobacter mustelae*. *Carcinogenesis* 1993; 14:1957-1961.
- (44) Binato M, Schmidt MK, Volkweis BS, et al. Mouse model of diethylnitrosamine-induced gastric cancer. *J Surg Res* 2008; 148:152-157.
- (45) Graffi A, Hoffmann F, Schutt M. N-Methyl-N-nitrosourea as a strong topical carcinogen when painted on skin of rodents. *Nature* 1967; 214:611.
- (46) Magee PN, Barnes JM. Carcinogenic nitroso compounds. *Adv Cancer Res* 1967; 10:163-246.
- (47) Narisawa T, Wong CQ, Maronpot RR, et al. Large bowel carcinogenesis in mice and rats by several intrarectal doses of methylnitrosourea and negative effect of nitrite plus methylurea. *Cancer Res* 1976; 36:505-510.

- (48) Hirota N, Aonuma T, Yamada S, et al. Selective induction of glandular stomach carcinoma in F344 rats by N-Methyl-N-nitrosourea. *Jpn J Cancer Res* 1987; 78 (7):634-638.
- (49) Tatematsu M, Ogawa K, Hoshiya, T, et al. Induction of adenocarcinomas in the glandular stomach of BALB/c mice treated with N-methyl-N-nitrosourea. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83:915-918.
- (50) Tatematsu M, Yamamoto M, Iwata H, et al. Induction of glandular stomach cancers in C3H mice treated with N-methyl-N-nitrosourea in the drinking water. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84:1258-1264.
- (51) Yamachika T, Nakanishi H, Inada D, et al. N-Methyl-N-Nitrosourea concentration-dependent, rather than total intake-dependent, Induction of adenocarcinoma in the glandular stomach of BALB/c mice. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89:385-391.
- (52) Maekawa A, Matsuoka C, Onodera H, et al. Organ-specific carcinogenicity of N-Methyl-N-Nitrosourea in F344 and ACI/N rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 1985; 109:178-182.
- (53) Yamamoto M, Furihata C, Fujimitsu Y, et al. Dose-dependent induction of both pepsinogen-altered pyloric glands and adenocarcinomas in the glandular stomach of C3H mice treated with N-methyl-N-Nitrosourea. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88:238-244.
- (54) Shimizu M, Suzuic M, Moriwakib H, et al. No involvement of b-catenin gene mutation in gastric carcinomas induced by N-methyl-N-nitrosourea in male F344 rats. *Cancer Lett* 2003; 195:147-152.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRIMÁRIO

Correlacionar o tempo de indução da carcinogênese gástrica com estadiamento da lesão primária (T).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Induzir adenocarcinoma gástrico em ratos Wistar usando N-metil-N-nitrosourea diluído em água e administrado *ad libitum*.

Desenvolver um modelo experimental de detecção do linfonodo sentinela em ratos Wistar com adenocarcinoma gástrico.

Abstract

Background: The applicability of the sentinel lymph node (SLN) has been evaluated in patients with early gastric tumors. There are reports in the literature of experimental gastric carcinogenesis in rats using N-methyl-N-nitrosourea (MNU). However, there is no report of an experiential model of sentinel lymph node in gastric cancer.

Objective: To establish an experimental model of sentinel lymph node in Wistar rats with gastric cancer induced by MNU.

Methods: A total of 48 Wistar rats were used. They received MNU dissolved in water at a concentration of 200 ppm and administered *ad libitum* for a period ranging between 16 and 70 weeks. Every six weeks, a group of four rats were undergone to surgery and, in cases of suspected gastric lesions, patent blue was injected into the subserosal lesions and lymphatic mapping was performed. Possible sentinel lymph nodes were collected, and the animals undergone to total gastrectomy. In rats without a suspect lesion, only the total gastrectomy was performed.

Results: In total, 44 rats were undergone to surgery. We have not identified during surgery of gastric tumors with the histopathologic diagnosis of adenocarcinoma. The rate of gastric adenocarcinoma was 4.5% (0.5 to 15). The lymphatic mapping was performed in two animals with suspicious lesions. However, the pathological examination discarded malignancy.

Conclusions: The experimental model of carcinogenesis in Wistar rats, using a 200 ppm of MNU dissolved in water, in our study no practice viability was shown, due to the low rate of adenocarcinoma.

RESUMO

Introdução: A aplicabilidade do linfonodo sentinela vem sendo avaliada em pacientes com tumores gástricos precoces. Há registros na literatura de modelos experimentais de carcinogênese gástrica em ratos com uso de N-metil-N-nitrosourea (MNU). Entretanto, não há relatos de um modelo experimental de linfonodo sentinela em câncer gástrico.

Objetivo: Criar um modelo experimental de biópsia do linfonodo sentinela em ratos Wistar com câncer gástrico induzido por MNU.

Métodos: Usamos 48 ratos Wistar que receberam MNU diluído em água na concentração de 200 ppm *ad libitum* por um período que variou entre 16 e 70 semanas. A cada seis semanas, um grupo de quatro ratos foi submetido à cirurgia e, em caso de lesões gástricas suspeitas de malignidade, azul patente foi injetado na subserosa das lesões e o mapeamento linfático realizado. Os possíveis linfonodos sentinelas foram coletados e os animais submetidos à gastrectomia total. Nos ratos sem lesão suspeita, apenas a gastrectomia total foi realizada.

Resultados: No total, 44 ratos foram submetidos à cirurgia. Não identificamos tumores gástricos com diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma durante o transoperatório. A incidência de adenocarcinoma gástrico foi de 4,5% (0,5-15). O mapeamento linfático foi realizado em dois animais com lesões suspeitas, entretanto o exame anatomopatológico descartou malignidade.

Conclusões: O modelo experimental de carcinogênese em ratos Wistar, usando concentração de 200 ppm de MNU diluído em água, não demonstrou viabilidade prática devido à baixa incidência de adenocarcinoma gástrico.

INTRODUÇÃO

A definição do comprometimento linfonodal é um indicador prognóstico crucial em pacientes com câncer gástrico.¹ O único tratamento potencialmente curativo é a ressecção cirúrgica com esvaziamento linfonodal. Vários estudos prospectivos têm tentado estabelecer a extensão ideal da linfadenectomia.²

O linfonodo sentinela (LS) é definido como o primeiro sítio de drenagem linfonodal da lesão primária e representa o primeiro sítio de metástases ou micrometástases.³ O LS vem sendo usado amplamente nas últimas duas décadas nos pacientes com melanoma cutâneo e câncer de mama.^{3,4} Atualmente, o procedimento está sendo testado em pacientes com câncer gástrico na tentativa de reduzir a extensão da dissecação linfonodal, principalmente nos pacientes com lesões precoces. Apesar da drenagem linfática complexa e multidirecional do estômago, vários estudos demonstraram que a biópsia do linfonodo sentinela tem alta acurácia na detecção de metástases linfonodais em pacientes submetidos à gastrectomia.⁵⁻⁷

Sugimura e Sugimura criaram o primeiro modelo experimental de adenocarcinoma gástrico induzido por N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) em ratos e, desde então, outros modelos estão sendo criados.⁸ O N-metil-N-nitrosourea (MNU) é um agente carcinogênico direto que induz tumores em várias espécies e numa variedade de órgãos, incluindo o sistema nervoso central, estômago, intestino, rim e pele.⁹⁻¹² Os modelos experimentais de câncer gástrico com MNU induziram tumores mais semelhantes aos humanos, em relação às características histopatológicas, quando comparados aos tumores tipicamente encontrados em ratos.^{13,14}

Os camundongos e ratos são espécies úteis nos modelos experimentais de carcinogênese devido à sua disponibilidade e suscetibilidade. A eficácia do MNU na indução do câncer gástrico já foi comprovada.^{14,15-18} Entretanto, até o momento atual, não há registros na literatura de um modelo experimental de linfonodo sentinela.

O objetivo deste estudo foi criar um modelo experimental de detecção do linfonodo sentinela em ratos Wistar com adenocarcinoma gástrico induzido por MNU.

MATERIAIS E MÉTODOS

AMOSTRA

O presente estudo foi realizado no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Utilizamos quarenta e oito ratos Wistar (*Rattus norvegicus albicuns*), machos, adultos (oito semanas) e peso inicial variando entre 271 e 401 gramas. Os ratos foram acondicionados em gaiolas (três ratos/gaiola) em condições padronizadas (ciclos de 12h de luz/escuro, temperatura de 22±2°C, umidade relativa de 45%), acesso livre à água e dieta (Nuvilab CR-1 – Nuvital S/A) com proteína bruta 22 a 22,5%, extrato etéreo (gordura) 4,4 a 4,6 %, carboidrato 53 a 55% e energia metabolizável 2950 Kcal/Kg.

INDUÇÃO DO CÂNCER GÁSTRICO

N-metil-N-nitrosourea (MNU - Sigma Aldrich) foi diluído com dimetilsulfóxido (DMSO) e a solução padrão foi acondicionada em local fresco e protegido da luz. MNU foi adicionado à água na concentração de 200 ppm e preparado três vezes por semana. A água contendo MNU foi administrada *ad libitum* durante um período que variou entre 16 e 70 semanas, armazenada em garrafas de vidro opaco para evitar fotólise. Após 16 semanas de exposição ao MNU, quatro ratos foram escolhidos randomicamente e submetidos à cirurgia. A partir de então, a cada seis semanas, até a 70^a semana, novo grupo de quatro ratos foi selecionado e a cirurgia realizada.

TÉCNICA CIRÚRGICA

Anestesia: Após NPO de seis horas e acesso livre a água os animais foram anestesiados com solução de Ketamina (100 mg/Kg) + Xylazina (10 mg/Kg) intraperitoneal.

Laparotomia: Os animais foram submetidos à tricotomia abdominal e a uma incisão abdominal mediana de 4 cm. O estômago foi exposto através de mínima manipulação, a fim de não haver dano ao sistema de drenagem linfática, e avaliado por inspeção e palpação (Figura 1).

Mapeamento linfático: Nos casos de lesões suspeitas de malignidade, 0,1 ml de azul patente foi injetado com agulha 26 gauge na subserosa da lesão

(Figuras 2 e 3). Após 5 minutos de observação (Figuras 4 e 5), as áreas perigástricas de migração do corante foram coletadas e enviadas para exame anatomopatológico.

Gastrectomia: Gastrectomia foi realizada nos animais que sobreviveram além de 16 semanas e, nos casos de lesões suspeitas, após o mapeamento linfático. Os estômagos foram abertos pela grande curvatura e a macroscopia realizada na sala de cirurgia. Todo material coletado foi processado e analisado no laboratório de patologia.



Figura 1. Exposição do estômago

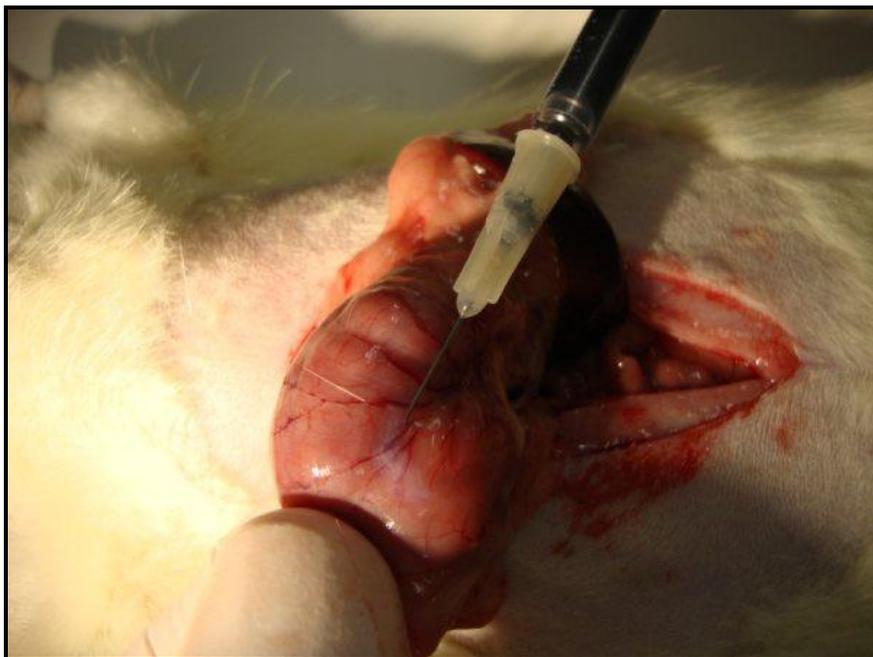


Figura 2. Infiltração de azul patente na subserosa da lesão suspeita

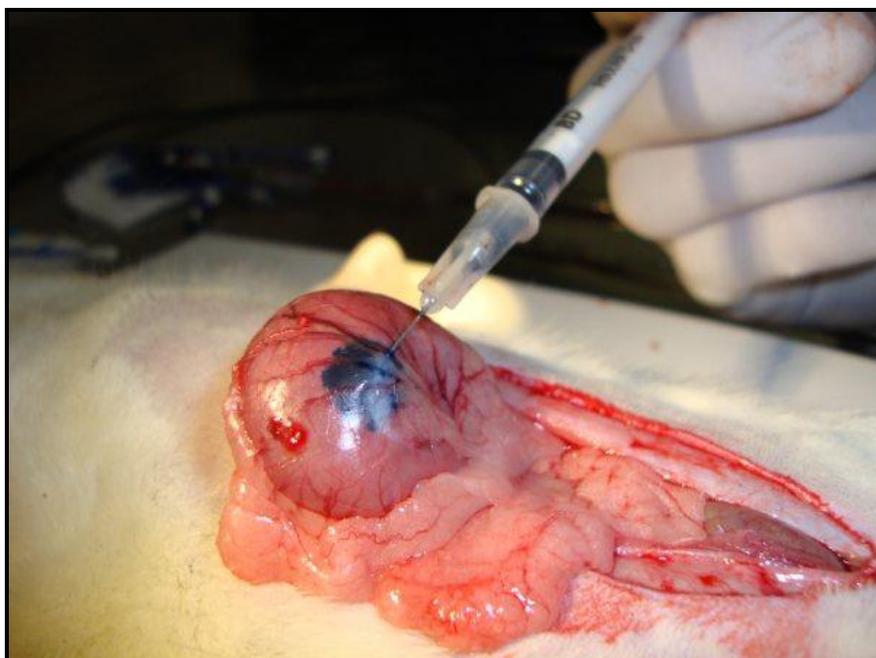


Figura 3. Azul patente na subserosa da lesão suspeita

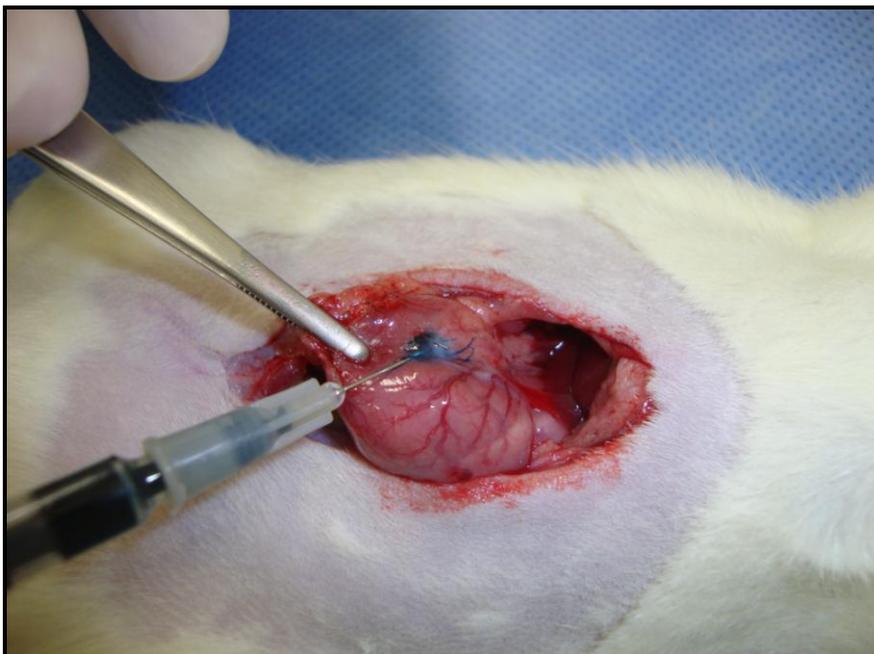


Figura 4. Migração do azul patente através dos linfáticos I

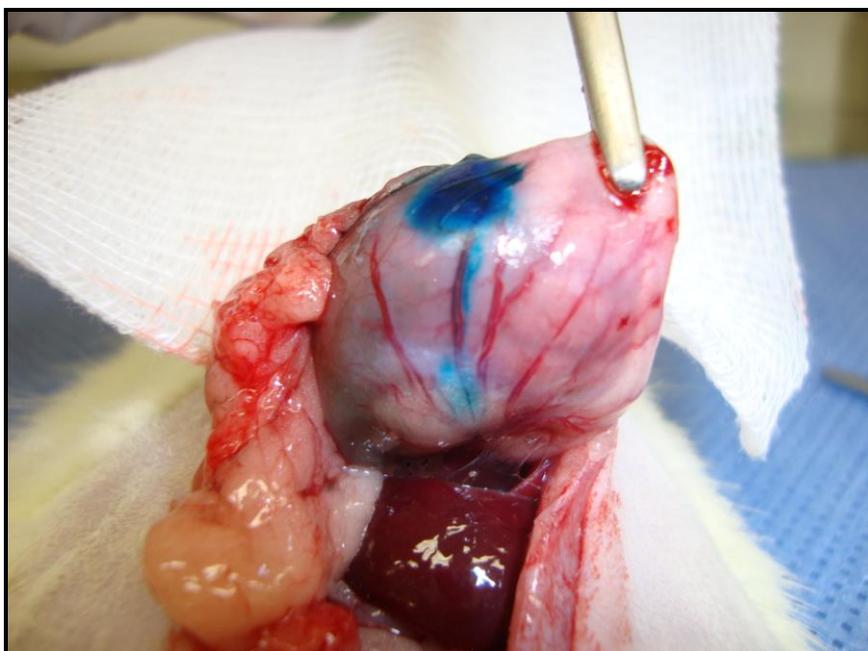


Figura 5. Migração do azul patente através dos linfáticos II

Morte dos Animais

Após a realização do mapeamento linfático e gastrectomia, foi realizada a eutanásia através de toracotomia com secção dos grandes vasos cardíacos.



Figura 6. Eutanásia com secção dos grandes vasos cardíacos

Crítérios de Exclusão

Animais que morreram antes das 16 semanas de exposição ao MNU foram excluídos do estudo e submetidos à necropsia.

Análise Histopatológica

Os estômagos foram fixados em solução de formalina, seccionados em oito fragmentos no maior eixo e processados em parafina. Os tecidos foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e realizada a análise histopatológica. As

lesões neoplásicas foram classificadas de acordo com o tipo histológico em adenocarcinoma, carcinoma epidermóide e sarcoma. Os adenocarcinomas foram classificados em bem diferenciados e pouco diferenciados. Os possíveis linfonodos coletados também foram avaliados quando à presença ou ausência de metástases.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

No cálculo da incidência de adenocarcinomas gástricos utilizamos o intervalo de confiança para proporções usando o Método Binomial. Nas médias de variáveis quantitativas utilizamos o teste *t de Student*.

ÉTICA

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA).

Este estudo necessitou observação dos animais por tempo prolongado. A ingestão da água contendo MNU e a carcinogênese ocorrem de maneira assintomática.^{13,14}

FINANCIAMENTO

Este projeto foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do HCPA e recursos próprios. O gasto total foi de 12.500,00 reais, sendo 10.000,00 reais do FIPE e 2.500,00 reais do pesquisador.

RESULTADOS

Do total de 48 ratos Wistar machos alocados, quatro morreram antes da 16ª semana e foram excluídos do estudo. A necropsia demonstrou que as mortes foram ocasionadas por pneumonia. A sobrevivência total foi de 92% e a média geral de peso inicial de 346 ± 33 gramas. O ganho de peso semanal durante o período de acompanhamento foi menor nos ratos que desenvolveram neoplasias em relação aos que não desenvolveram ($2,1 \text{ g} \times 3,2 \text{ g}$; $p=0,07$). As médias das variáveis da amostra estão descritas na Tabela 2.

No intervalo que variou entre 16 e 70 semanas, 44 ratos foram submetidos à cirurgia. Dois animais apresentaram lesões suspeitas de malignidade na avaliação inicial do estômago (semana 28 e 34). Nesses animais, realizamos o mapeamento linfático com azul patente. O material corado foi coletado e enviado ao laboratório de patologia. O estômago desses dois animais não apresentava lesões neoplásicas e o exame anatomopatológico não identificou linfonodos na amostra coletada.

Até a 70ª semana, quando o último grupo de ratos foi operado, não identificamos nenhuma lesão gástrica visível ou palpável que tenha sido confirmada como adenocarcinoma no exame histopatológico. Na 64ª semana,

encontramos uma lesão volumosa ocupando cerca de um terço da parede gástrica anterior e foi diagnosticada como sarcoma (Figuras 8 e 9). No período entre as semanas 52 e 70, seis estômagos apresentaram infiltrado inflamatório da mucosa (Figuras 10 e 11). Na semana 70, um rato apresentou volumosa massa em região abdominal inferior e teve diagnóstico de neoplasia adrenal. Na 22^a semana, foi identificado um carcinoma epidermóide indiferenciado no pré-estômago. Nas semanas 52 e 70, evidenciamos dois adenocarcinomas gástricos bem diferenciados invadindo discretamente a muscular própria (T2a) (Figuras 12-14). Obtivemos uma incidência de adenocarcinoma gástrico de 4,5% (IC 0,5-15%). Os principais achados histopatológicos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 2. Médias das variáveis da amostra

Número efetivo de ratos	Média de peso inicial (g)	Média de peso final (g)	Média de idade no óbito (semanas)
44	346±33	469±59	50±14

Tabela 3. Resultado dos exames histopatológicos das lâminas gástricas

Semanas	Infiltrado inflamatório	Adenocarcinoma	Carcinoma epidermoide	Sarcoma
22	0	0	1	0
52	2	1	0	0
58	3	0	0	0
64	1	0	0	1
70	0	1	0	0

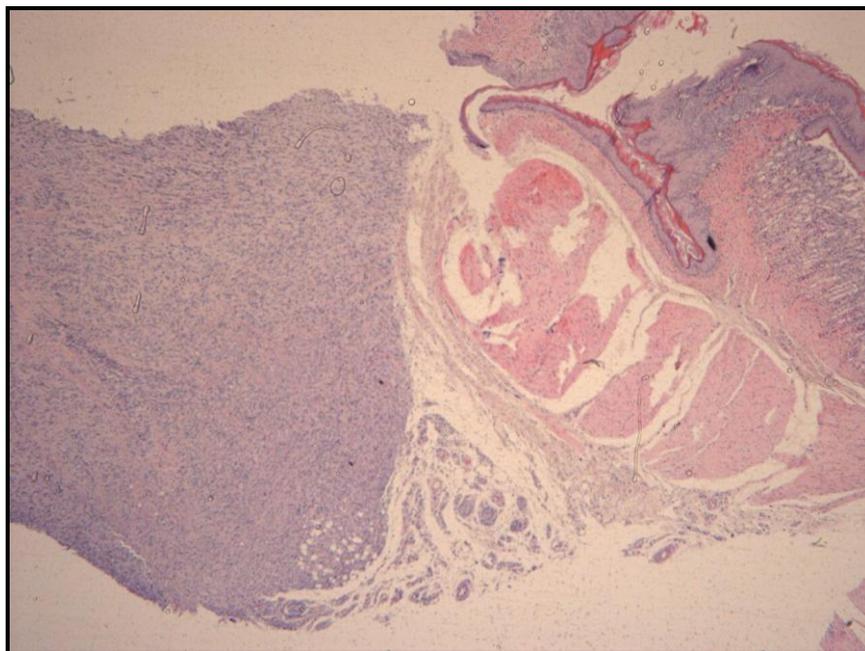


Figura 8. Sarcoma gástrico (HE 40 X)

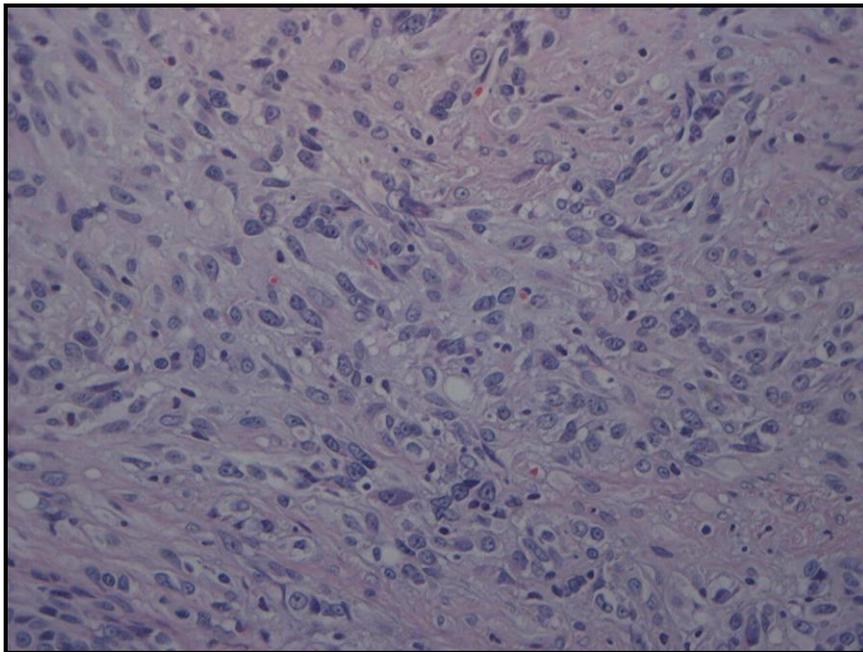


Figura 9. Sarcoma gástrico (HE 400X)

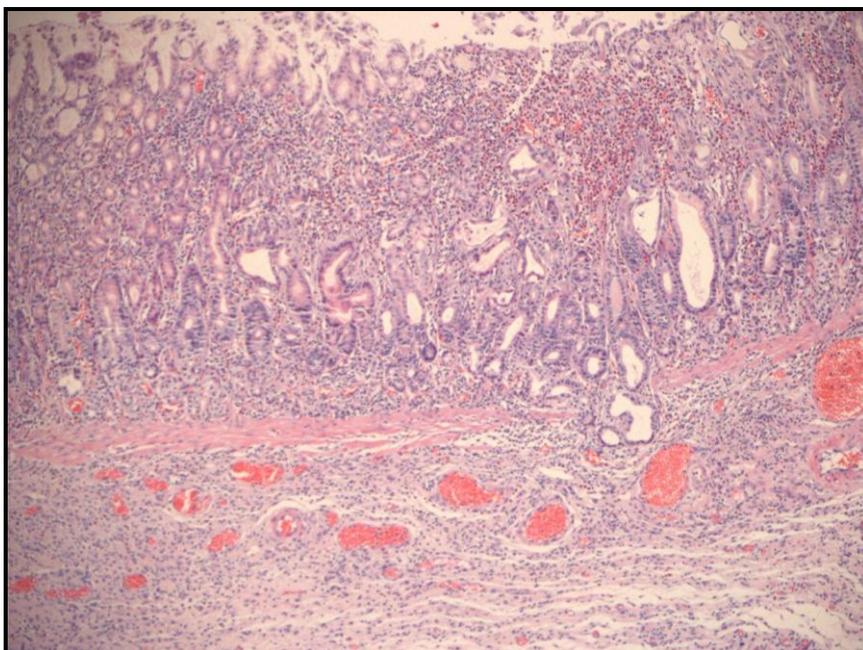


Figura 10. Processo inflamatório da mucosa gástrica (HE 100X)

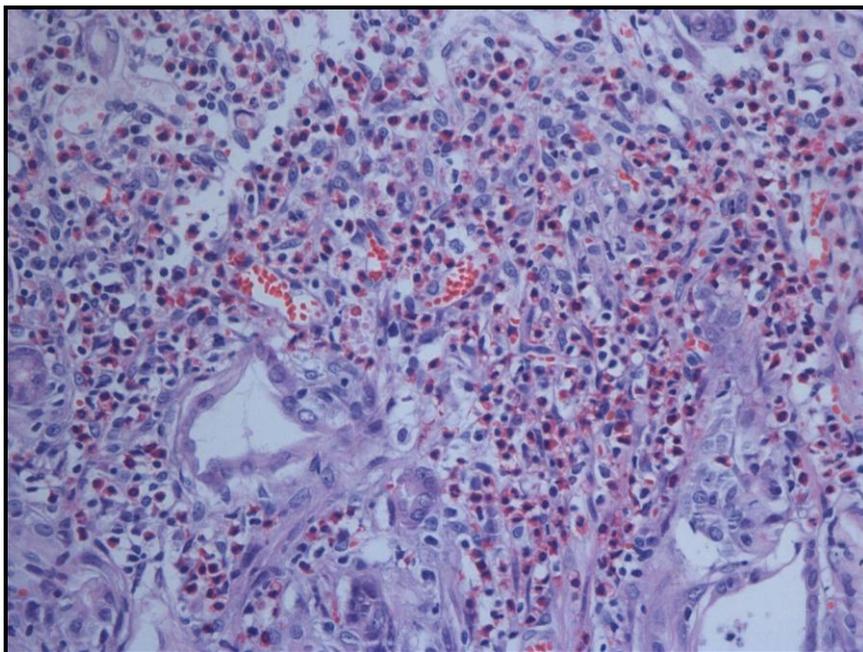


Figura 11. Processo inflamatório da mucosa gástrica (HE 400X)

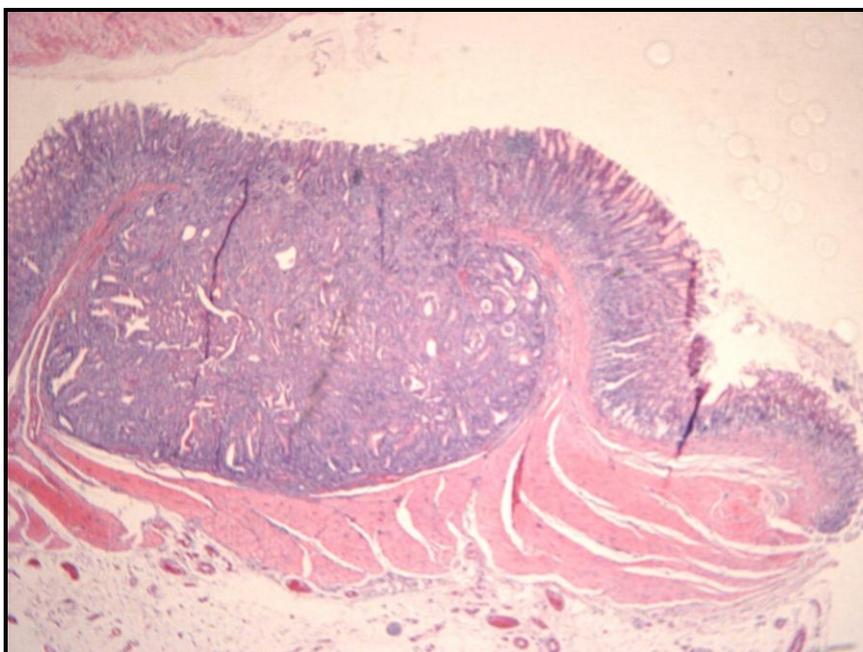


Figura 12. Adenocarcinoma gástrico (T2a) (HE 40X)

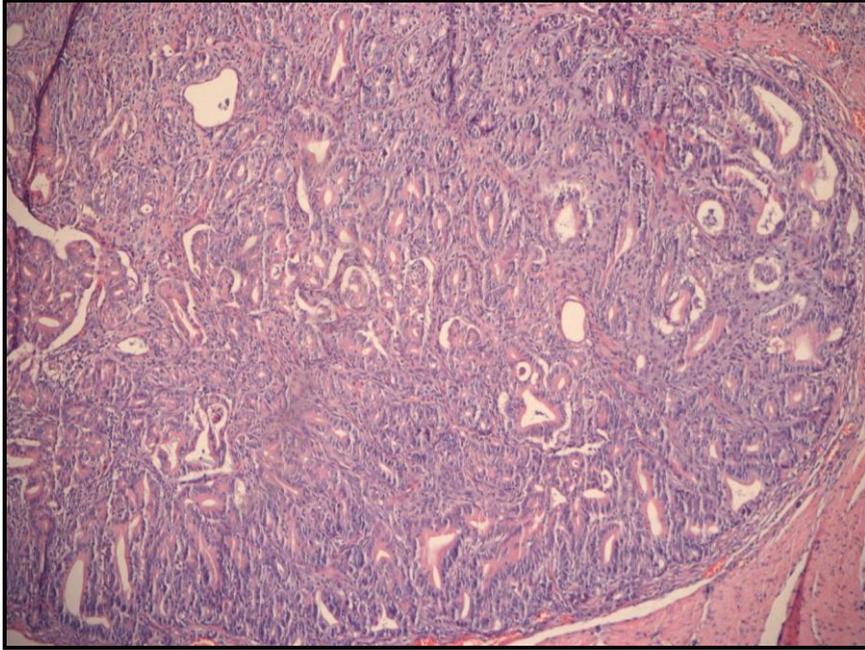


Figura 13. Adenocarcinoma gástrico (T2a) (HE 100X)

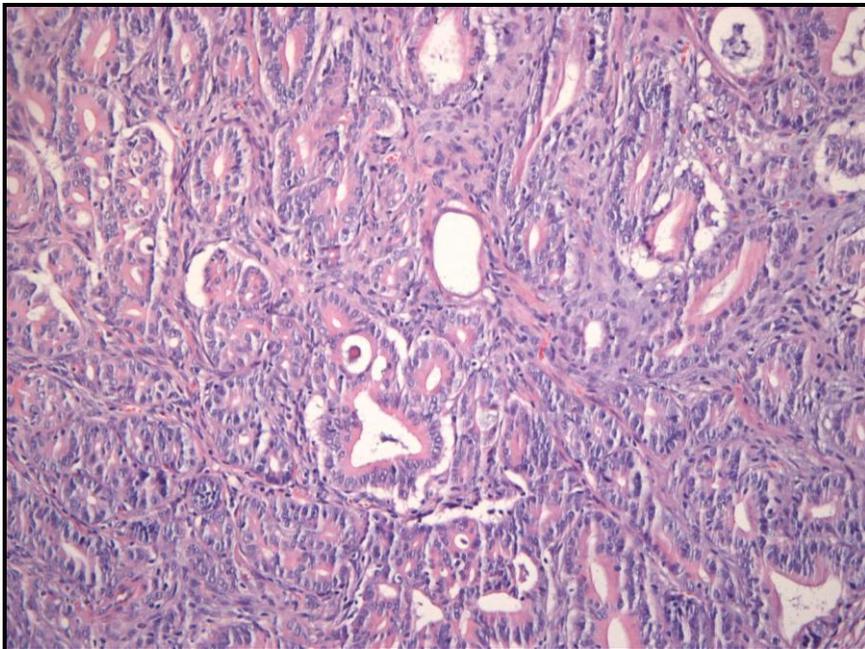


Figura 14. Adenocarcinoma gástrico (T2a) (HE 400X)

DISCUSSÃO

Escolha do Carcinógeno e Resultados Obtidos

Em nosso estudo, obtivemos baixa incidência de adenocarcinoma gástrico induzidos por MNU na concentração de 200 ppm. Há evidências na literatura, de que a administração contínua de MNU tem a capacidade de induzir câncer na região glandular do estômago de camundongos e ratos.¹³⁻¹⁸ Os modelos experimentais de câncer gástrico com MNU apresentaram tumores mais semelhantes aos humanos, em relação às características histopatológicas, quando comparados aos tumores tipicamente encontrados em ratos.^{13,14} Altas doses de MNU em curtos períodos induzem mais lesões do que baixas doses por longos períodos.¹⁹

Maekawa e colaboradores pesquisaram o efeito do uso contínuo de MNU diluído em água na concentração de 100 ppm em ratos F344. Após 42 semanas, 18% dos ratos apresentaram adenocarcinoma gástrico.¹⁵ Tatematsu e colaboradores usaram MNU em camundongos na concentração de 120 ppm por 30 semanas e obtiveram 40% de adenocarcinomas após 54 semanas.¹³ Yamamoto e colaboradores obtiveram 60% de adenocarcinomas em camundongos com a mesma concentração de MNU administrado por 42 semanas.¹⁶ Hirota e colaboradores usaram MNU na concentração de 400 ppm em ratos F344 por 25 semanas e obtiveram 100% de adenocarcinomas invasivos.¹⁷ Shimizu e colaboradores, usando a mesma concentração por 12

semanas, obtiveram 27 lesões malignas no estômago de 20 ratos F344 após 36 semanas.¹⁸

Os estudos prévios não descreveram com detalhes o nível de invasão das lesões primárias e o tempo mínimo de exposição ao MNU para essas lesões ocorrerem. Há apenas registros do tempo necessário para desenvolvimento dos tumores, sem a graduação das lesões. Nós realizamos as primeiras cirurgias após 16 semanas de exposição ao MNU no intuito de descrever o tempo mínimo necessário para obter determinado estágio da lesão (T). Nosso último grupo de ratos foi operado com 70 semanas e recebeu MNU até o dia do óbito. Portanto, nossos animais foram expostos ao MNU por tempo prolongado e superior aos estudos prévios. Certamente, não foi o tempo de exposição ao MNU o motivo da nossa baixa incidência de neoplasias.

Usamos uma concentração intermediária de MNU em relação aos estudos anteriores, pois concentrações menores obtiveram baixa incidência de adenocarcinomas e concentrações maiores demonstraram lesões gástricas avançadas e múltiplas. Estudos realizados em humanos evidenciaram que a técnica do LS é eficaz em lesões precoces (T1 e T2). Em lesões mais avançadas, há destruição dos linfáticos e o mapeamento é prejudicado.²⁰⁻²⁴ O nosso objetivo foi obter tumores precoces a fim de reproduzir a técnica do LS em um modelo experimental, entretanto obtivemos uma incidência de tumores inferior aos experimentos que usaram concentrações menores de MNU.^{14,15} Além disso, não identificamos os adenocarcinomas, diagnosticados pelo exame histopatológico, durante o transoperatório. Em vista disso, não foi possível a realização do mapeamento linfático nesses casos. Em humanos, vários estudos utilizaram o auxílio da endoscopia transoperatória para identificação

dos tumores primários e aplicação do corante ou radiofármaco.^{2,25,26} O uso da endoscopia digestiva alta poderia ter auxiliado na identificação das lesões não detectadas no transoperatório.

O sucesso na indução de tumores em modelos experimentais, entre outros fatores, também depende das características genéticas dos animais. Há registros na literatura de ratos resistentes ao potencial carcinogênico do MNU. O rato Búfalo é resistente ao MNU, sendo um traço herdado de caráter dominante.²⁷ Maekawa e colaboradores compararam a incidência de tumores entre ratos F344 e ACI/N. Os animais receberam MNU diluído em água e diversos órgãos foram avaliados, entre eles o estômago. A incidência de adenocarcinoma gástrico foi significativamente menor nos ratos ACI/N quando comparados aos F344. O estudo concluiu que a carcinogênese é influenciada pelas características genéticas dos animais.¹⁵ Até o momento da realização do nosso estudo, não encontramos na literatura modelos experimentais de adenocarcinoma gástrico em ratos Wistar, tampouco registros de uma possível resistência desses ao MNU.

A adição de algumas substâncias promotoras aos indutores da carcinogênese pode potencializar seus efeitos. Takahashi e colaboradores adicionaram cloreto de sódio ao MNNG e obtiveram aumento significativo da incidência de câncer gástrico em relação ao grupo de ratos que somente recebeu MNNG.²⁸ Outro estudo avaliou a adição de *Dimethylitaconate* (DMI) ao MNU em ratos F344 e demonstrou significativo aumento na incidência de adenocarcinomas gástricos quando comparados ao grupo controle (95% *versus* 12%; $p < 0,005$).²⁹

Os componentes nutricionais da dieta também podem ter influenciado os resultados obtidos. Tatsuda e colaboradores examinaram o efeito da dieta hipoproteica na incidência de câncer gástrico induzido por MNNG em ratos Wistar.³⁰ A incidência de lesões malignas foi significativamente maior em ratos com dieta hipoproteica quando comparada ao grupo que recebeu dieta padrão. Os mecanismos de efeito da dieta hipoproteica na potencialização da carcinogênese não são conhecidos, mas pelo menos três mecanismos são aventados. Uma hipótese seria que a dieta hipoproteica teria efeito na imunomodulação, o que poderia influenciar o desenvolvimento de neoplasias por alterar a regulação de mecanismos imunes do hospedeiro.^{31,32} Outra hipótese seria o possível efeito na secreção de vários hormônios, incluindo o hormônio do crescimento, TSH, gastrina e somatostatina.^{33,34} Esses hormônios são estreitamente relacionados ao crescimento da mucosa gastrointestinal.³⁰ A terceira possibilidade poderia estar relacionada ao aumento da atividade do sistema nervoso simpático, pois há evidências de controle neural na proliferação celular.⁵ Nossos ratos receberam dieta padrão e apresentavam bom estado nutricional no dia da cirurgia. Somente a realização de novos estudos, com administração de MNU associada à dieta hipoproteica, poderia elucidar o efeito dessa dieta na incidência de adenocarcinoma gástrico em ratos Wistar.

Mapeamento Linfático

A detecção do linfonodo sentinela pode ser realizada através do método radioguiado, com uso de corante ou a associação de ambos. Vários corantes já

foram testados para detecção do linfonodo sentinela: azul de isosulfano, azul patente, azul de metileno, azul de Evans, entre outros.^{5,35,36} Nós escolhemos o azul patente para o mapeamento linfático porque ele demonstrou ser eficaz nos estudos realizados em humanos^{37,38} e ser utilizado amplamente em nossa instituição.

A aplicação do azul patente na subserosa do estômago e o mapeamento linfático demonstraram ser factíveis em ratos. Conseguimos observar nitidamente a migração do corante através dos linfáticos gástricos e perigástricos. Entretanto, não foi possível avaliar a factibilidade da biópsia do linfonodo sentinela pela baixa incidência de tumores obtidos.

CONCLUSÕES

O modelo experimental de carcinogênese em ratos Wistar, usando concentração de 200 ppm de N-metil-N-nitrosourea diluído em água, não demonstrou viabilidade prática em nosso estudo devido à baixa incidência de adenocarcinoma gástrico.

O mapeamento linfático do estômago com o uso de azul patente demonstrou ser reproduzível em ratos. Entretanto, não conseguimos avaliar a factibilidade da biópsia do linfonodo sentinela em virtude do nosso pequeno número de animais que desenvolveu neoplasia.

PERSPECTIVAS

Apesar dos ratos serem suscetíveis à carcinogênese gástrica, a realização do modelo experimental de detecção do linfonodo sentinela demonstrou importantes dificuldades técnicas devido ao tamanho diminuto desses animais. A utilização de animais de maior porte, associada à endoscopia digestiva, poderia facilitar a identificação das lesões primárias. Além disso, haveria a possibilidade do corante linfático ser aplicado diretamente no sítio tumoral com auxílio do endoscópio. Novos estudos, com animais de maior porte associados à endoscopia digestiva, poderão validar a técnica do linfonodo sentinela em um modelo experimental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Wu CW, Hsieh MC, Lo SS, et al. Relation of number of positive lymph nodes to the prognosis of patients with primary gastric adenocarcinoma. *Gut* 1996; 38:525-527.
- (2) Becher RD, Shen P, Stewart JH, et al. Sentinel lymph node mapping for gastric adenocarcinoma. *Am Surg* 2009; (75):710-714.
- (3) Morton DL, Wen DR, Wong JH, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992; 127:392-399.
- (4) Morton DL, Thompson JF, Essner R, et al. Validation of the accuracy of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for early-stage melanoma: a multicenter trial. *Ann Surg* 1999; 230:453-463.
- (5) Hiratsuka M, Miyashiro I, Ishikawa O, et al. Application of sentinel node biopsy to gastric cancer surgery. *Surgery* 2001; 129:335-340.
- (6) Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M, et al. Radioguided sentinel node detection for gastric cancer. *Br J Surg* 2002; 89:604-608.
- (7) Hayashi H, Ochiai T, Mori M, et al. Sentinel lymph node mapping for gastric cancer using a dual procedure with dye and gamma probe-guided techniques. *J Am Coll Surg* 2003; 196:68-74.
- (8) Sugimura T, Sugimura S. Tumor production in glandular stomach of rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. *Nature* 1967; 216:943-944.
- (9) Graffi A, Hoffmann F, Schutt M. N-Methyl-N-nitrosourea as a strong topical carcinogen when painted on skin of rodents. *Nature* 1967; 214:611.

- (10) Magee PN, Barnes JM. Carcinogenic nitroso compounds. *Adv. Cancer Res* 1967; 10:163-246.
- (11) Alexandrov VA. Uterine, vaginal and mammary tumours induced by nitrosoureas in pregnant rats. *Nature* 1969; 222:1064-1065.
- (12) Narisawa T, Wong CQ, Maronpot RR, et al. Large bowel carcinogenesis in mice and rats by several intrarectal doses of methylnitrosourea and negative effect of nitrite plus methylurea. *Cancer Res* 1976; 36:505-510.
- (13) Tatematsu M, Ogawa K, Hoshiya T, et al. Induction of adenocarcinomas in the glandular stomach of BALB/c mice treated with N-methyl-N-nitrosourea. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 915-918.
- (14) Tatematsu M, Yamamoto M, Iwata H, et al. Induction of glandular stomach cancers in C3H mice treated with N-methyl-N-nitrosourea in the drinking water. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84:1258-1264.
- (15) Maekawa A, Matsuoka C, Onodera H, et al. Organ-specific carcinogenicity of N-Methyl-N-Nitrosourea in F344 and ACI/N rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 1985; 109:178-182.
- (16) Yamamoto M, Furihata C, Fujimitsu Y, et al. Dose-dependent induction of both pepsinogen-altered pyloric glands and adenocarcinomas in the glandular stomach of C3H mice treated with N-methyl-N-nitrosourea. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88:238-244.
- (17) Hirota N, Aonuma T, Yamada S, et al. Selective induction of glandular stomach carcinoma in F344 rats by N-Methyl-N-nitrosourea. *Jpn J Cancer Res* 1987; 78(7):634-638.

- (18) Shimizu M, Suzuic M, Moriwakib H, et al. No involvement of b-catenin gene mutation in gastric carcinomas induced by N-methyl-N-nitrosourea in male F344 rats. *Cancer Letters* 2003; 195:147-152.
- (19) Yamachika T, Nakanishi H, Inada D, et al. N-methyl-N-nitrosourea Concentration-dependent, rather than total Intake-dependent, induction of adenocarcinoma in the glandular stomach of BALB/c mice. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89:385-391.
- (20) Rabin I, Chikman B, Halpern Z, et al. Sentinel node mapping for gastric cancer. *Isr Med Assoc J* 2006; 8(1):40-43.
- (21) Aikou T, Kitagawa Y, Kitajima M, et al. Sentinel lymph node mapping with gastrointestinal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25(2):269-277.
- (22) Zulfikaroglu B, Koc M, Ozmen M, et al. Intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy using radioactive tracer in gastric cancer. *Surgery* 2005; 138(5):899-904.
- (23) Uenosomo Y, Natsugoe S, Ehi K, et al. Detection of sentinel nodes and micrometastases using radioisotope navigation and immunohistochemistry in patients with gastric cancer. *Br J Surg* 2005; 92(7):886-889.
- (24) Kim MC, Kim HH, Jung GJ, et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy using 99mTc tin colloid in gastric cancer. *Ann Surg* 2004; 239(3):383-387.
- (25) Ishizaki M, Kurita A, Kubo Y, et al. Evaluation of sentinel node identification with isosulfan blue in gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32(2):191-196.
- (26) Mochiki E, Kuwano H, Kamiyama Y, et al. Sentinel lymph node mapping with technetium-99m colloidal rhenium sulfide in patients with gastric carcinoma. *Am J Surg* 2006; 191(4):465-469.

- (27) Sugimura T, Masaaki Terada M. Experimental chemical carcinogenesis in the stomach and colon. *Jpn J Clin Oncol* 1998; 28(3):163-167.
- (28) Takahashi M, Kokubo T, Furukawa F, et al. Effect of high salt diet on rat gastric carcinogenesis induced by *N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine*. *Carcinogenesis* 1982; 3:1419-1422.
- (29) Lee YS, Jang J. Potent promoting activity of dimethylitaconate on gastric carcinogenesis induced by *N-methylnitrosourea*. *Cancer Lett* 1994; 85(2):177-184.
- (30) Tatsuta M, Iishi H, Baba M, et al. Enhanced induction of gastric carcinogenesis by *N-Methyl-N'-nitrosoguanidine* in Wistar rats fed a low-protein diet. *Cancer Res* 1991; 51:3491-3496.
- (31) Thomas IK, Erickson KL. Lipid modulation of mammary tumor cell cytotoxicity: direct influence of dietary fats on the effector component of cell-mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 1985; 74:675-680.
- (32) Olson LM, Clinton SK, Everitt JI, et al. Lymphocyte activation, cell-mediated cytotoxicity and their relationship to dietary fat-enhanced mammary tumorigenesis in C3H/OUJ mice. *J. Nutr* 1987; 117:955-963.
- (33) Sommerville BA, Harvey S. The effect of low levels of dietary protein and calcium on growth rate, growth hormone, and vitamin D metabolism in the chicken. *Gen Comp Endocrinol* 1988; 71:93-96.
- (34) Kaptein EM, Fisler JS, Duda MJ, et al. Relationship between the changes in serum thyroid hormone levels and protein status during prolonged protein supplemented caloric deprivation. *Clin Endocrinol* 1985; 22:1-15.
- (35) Ichikura T, Morita D, Uchida T, et al. Sentinel node concept in gastric

carcinoma. *World J Surg* 2002; 26:318-322.

(36) Ryu KW, Lee JH, Kim HS, et al. Prediction of lymph nodes metastasis by sentinel node biopsy in gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29:895-899.

(37) Orsenigo E, Tomajer V, Di Palo S, et al. Sentinel node mapping during laparoscopic distal gastrectomy for gastric cancer. *Surg Endosc* 2008; 22:118-121.

(38) Rino Y, Ohshima T, Yoshihara K, et al. Detection of gastric cancer cells in the blue lymph node and lymphaticus under sentinel lymph node biopsy using dye technique alone. *Hepatogastroenterology* 2010; 57(99-100):395-397.

O Modelo Experimental de Carcinogênese Gástrica Induzido por N-Metil-N-Nitrosourea em Ratos F344 e Camundongos C3H é Válido para os Ratos Wistar?

Lissandro Tarso¹, Fabíola Schons Meyer², Marta Giotti Cioato², Luíse Meurer^{2,3}, Carlos Cauduro Schirmer^{4,5}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

³Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

⁴Serviço de Cirurgia Digestiva do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

⁵ Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Título resumido: Modelo Experimental de Carcinogênese Gástrica em Ratos Wistar.

Agradecimento: Apoio financeiro concedido pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Endereço para correspondência:

Lissandro Tarso

Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90035-903, Porto Alegre (RS), Brasil

Telefone: +55 51 99774962

E-mail: lissandrotarso@hotmail.com

RESUMO

Introdução: O N-metil-N-nitrosourea (MNU) é uma substância carcinogênica de ação direta, induzindo tumores em várias espécies e numa variedade de órgãos. O MNU, diluído em água e administrado *ad libitum*, induz adenocarcinoma na região glandular do estômago de ratos F344 e camundongos C3H.

Objetivo: Estabelecer um modelo experimental de câncer gástrico induzido por N-metil-N-nitrosourea em ratos Wistar.

Métodos: Foram alocados 48 ratos Wistar que receberam N-metil-N-nitrosourea diluído em água na concentração de 200 ppm, administrado *ad libitum* por um período que variou entre 16 e 70 semanas. Após 16 semanas, quatro ratos foram sacrificados e seus estômagos examinados. A partir de então, a cada seis semanas um novo grupo de quatro ratos foi sacrificado até a 70ª semana.

Resultados: A sobrevivência dos animais durante o período de experimentação foi superior a 90%. Nós obtivemos a indução de dois adenocarcinomas, um carcinoma de células escamosas e um sarcoma gástrico. A incidência de adenocarcinoma gástrico foi de 4,5% (IC= 0,5-15).

Conclusões: O modelo experimental de carcinogênese gástrica em ratos Wistar, usando uma concentração de 200 ppm de N-metil-N-nitrosourea diluído em água, não demonstrou viabilidade prática em nosso estudo devido à baixa incidência de adenocarcinoma gástrico.

Palavras-chaves: N-metil-N-nitrosourea; carcinogênese gástrica, ratos Wistar

INTRODUÇÃO

Desde que o primeiro modelo experimental de adenocarcinoma gástrico induzido por N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) foi publicado¹, muitos outros modelos vêm sendo desenvolvidos.²⁻³ O N-metil-N-nitrosourea (MNU) é um agente carcinogênico direto que induz tumores em várias espécies e numa variedade de órgãos, incluindo o sistema nervoso central, estômago, intestino, rim e pele.⁴⁻⁷

Os camundongos e ratos são espécies particularmente úteis para estudo da carcinogênese devido à disponibilidade de linhagens transgênicas e mutantes. O MNU, diluído na água de beber por 25-42 semanas, induz câncer na região glandular do estômago de ratos F344 e camundongos C3H.⁸⁻¹⁴ Esses modelos animais têm sido amplamente utilizados, não apenas para investigar a patogênese do câncer gástrico, mas também para a identificação de possíveis agentes promotores e protetores.^{10,11} O objetivo do presente estudo foi criar um modelo experimental de indução de câncer na região glandular do estômago de ratos Wistar e descrever a relação entre tempo de indução e estadiamento da lesão primária (T).

MATERIAIS E MÉTODOS

Um total de 48 ratos Wistar, machos, com oito semanas de idade, foram acondicionados em caixas (três ratos em cada caixa), em condições padronizadas (ciclos de 12h de luz/escuro, temperatura de 22±2°C, umidade relativa de 45%), com acesso livre à água e dieta (Nuvilab CR-1 – Nuvital S/A).

MNU (Sigma-Aldrich) foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) e a solução padrão foi acondicionada em local fresco e protegido da luz. A água de beber dos animais foi preparada com MNU na concentração de 200 ppm e renovada três vezes por semana. Os animais receberam água e ração padrão *ad libitum* durante um período que variou entre 16 e 70 semanas. A água foi armazenada em garrafas de vidro opacas para evitar fotólise. Após 16 semanas de exposição ao MNU, quatro ratos foram escolhidos randomicamente e sacrificados. A partir de então, a cada seis semanas, até a 70^a semana, um novo grupo de quatro ratos foi selecionado, sacrificado e seus estômagos avaliados.

Critérios de exclusão: Os animais que morreram antes de 16 semanas foram excluídos do estudo e submetidos à necropsia.

Análise histopatológica: Os estômagos foram fixados em solução de formalina, seccionados em oito fragmentos no maior eixo e processados em parafina. Os tecidos foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e submetidos à avaliação histopatológica. As lesões neoplásicas foram classificadas em adenocarcinoma, carcinoma epidermóide e sarcoma.

Análise estatística: No cálculo da incidência de desenvolvimento de adenocarcinomas gástricos, utilizamos o intervalo de confiança para proporções usando o Método Binomial e o teste *t de Student* para as médias de variáveis quantitativas.

Ética: O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

RESULTADOS

Do total de 48 ratos Wistar machos, quatro animais morreram antes da 16ª semana e foram excluídos do estudo. A necropsia demonstrou que as mortes foram ocasionadas por pneumonia. A sobrevivência total foi de 92%. A média geral de peso inicial foi de 346 ± 33 gramas. O ganho de peso semanal durante o período de acompanhamento foi menor nos ratos que desenvolveram neoplasias em relação aos que não as desenvolveram (2,1 g x 3,2 g), entretanto a diferença não foi significativa ($p=0,07$). As médias das variáveis da amostra estão descritas na Tabela 1.

Na 64ª semana, encontramos uma lesão volumosa ocupando cerca de um terço da parede gástrica anterior, a qual foi diagnosticada como sarcoma. No período entre as semanas 52 e 70, evidenciamos seis casos com infiltrado inflamatório da mucosa gástrica (Figura 1). Na semana 70, um rato apresentou volumosa massa em região abdominal inferior que foi diagnosticada como neoplasia de adrenal. Na 22ª semana foi identificado um carcinoma epidermóide indiferenciado no pré-estômago. Nas semanas 52 e 70 tivemos o diagnóstico de dois casos de adenocarcinoma gástrico bem diferenciado invadindo discretamente a muscular própria (T2a) (Figura 2). A incidência de desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico foi de 4,5% (IC 0,5-15%). Os principais achados histopatológicos estão descritos na Tabela 2.

DISCUSSÃO

Em nosso estudo, obtivemos baixa incidência de adenocarcinoma gástrico induzido por MNU na concentração de 200 ppm. Há evidências na literatura de que a administração contínua de MNU a camundongos e ratos tem a capacidade de induzir câncer, de maneira seletiva, na região glandular do estômago.⁸⁻¹⁴

Maekava e colaboradores examinaram os efeitos do MNU diluído em água na concentração de 100 ppm e administrados a ratos F344. Após 42 semanas, 18% dos ratos apresentaram adenocarcinoma gástrico.⁸ Tatematsu e colaboradores administraram MNU a camundongos C3H na concentração de 120 ppm por 30 semanas e obtiveram 40% de casos de adenocarcinoma após 54 semanas.¹² Hirota e colaboradores, utilizando MNU a 400 ppm em ratos F344 por 25 semanas, obtiveram 100% de adenocarcinoma invasivo.⁹ Nós utilizamos uma concentração intermediária de MNU (200 ppm), pois estudos com concentrações menores tiveram baixa incidência de adenocarcinoma e concentrações maiores promoveram o desenvolvimento de tumores invasivos. Nosso objetivo foi obter lesões precoces a fim de estabelecer a relação entre tempo de indução e estadiamento da lesão primária (T).

A adição de algumas substâncias promotoras ao carcinógeno pode potencializar seus efeitos. Lee e colaboradores avaliaram a adição de *Dimethylitaconate* (DMI) ao MNU em ratos Fischer 344 e demonstraram significativo aumento na incidência de adenocarcinoma gástrico quando comparados ao grupo controle (95% x 12%; $p < 0,005$).¹⁵ Outro estudo que administrou cloreto de sódio ao MNNG obteve aumento significativo da

incidência de câncer gástrico em relação ao grupo que somente recebeu MNNG.¹⁶

Os componentes nutricionais da dieta também podem ter influenciado nos resultados obtidos. Tatsuta e colaboradores examinaram o efeito da dieta hipoproteica na incidência de câncer gástrico induzido por MNNG em ratos Wistar.¹⁷ A incidência de lesões malignas foi significativamente maior em ratos com dieta hipoproteica quando comparada ao do grupo que recebeu dieta padrão. Os mecanismos de efeito da dieta hipoproteica na potencialização da carcinogênese não são conhecidos, mas pelo menos três mecanismos são aventados. A primeira hipótese seria de que a dieta hipoproteica teria efeito na imunomodulação, o que poderia influenciar o desenvolvimento de neoplasias por alterar a regulação de mecanismos imunes do hospedeiro.^{18,19} Outra hipótese seria o possível efeito no aumento da secreção de vários hormônios, incluindo o hormônio do crescimento, TSH, gastrina e somatostatina.^{20,21} Esses hormônios são estreitamente relacionados ao crescimento da mucosa gastrointestinal. A terceira possibilidade poderia estar relacionada ao aumento da atividade do sistema nervoso simpático, pois há evidências de controle neural na proliferação celular.²² Nossos ratos receberam dieta padrão e apresentavam bom estado nutricional no dia do procedimento cirúrgico. Somente a realização de novos estudos, com administração de MNU associado à dieta hipoproteica, poderia elucidar o efeito dessa dieta na incidência de adenocarcinoma gástrico em ratos Wistar.

CONCLUSÃO

O modelo experimental de carcinogênese gástrica em ratos Wistar, usando concentração de 200 ppm de MNU diluído em água, não demonstrou viabilidade prática em nosso estudo devido à baixa incidência de tumores.

Agradecimento: ao apoio financeiro concedido pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Sugimura T and Sugimura S. Tumor production in glandular stomach of rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. *Nature* 1967; 216:943-944.
- (2) Fujimura S, Kogure K, Oboshi S, et al. Production of tumors in glandular stomach of hamsters by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. *Cancer Res* 1970; 30:1444-1448.
- (3) Fox JG, Wishnok JS, Murphy JC, et al. MNNG-induced gastric carcinoma in ferrets infected with *Helicobacter mustelae*. *Carcinogenesis* 1993; 14:1957-1961.
- (4) Graffi A, Hoffmann F, Schutt M. N-Methyl-N-nitrosourea as a strong topical carcinogen when painted on skin of rodents. *Nature* 1967; 214:611.
- (5) Magee PN, Barnes JM. Carcinogenic nitroso compounds. *Adv Cancer Res* 1967; 10:163-246.
- (6) Alexandrov VA. Uterine, vaginal and mammary tumours induced by nitrosoureas in pregnant rats. *Nature* 1969; 222:1064-1065.
- (7) Narisawa T, Wong CQ, Maronpot RR, et al. Large bowel carcinogenesis in mice and rats by several intrarectal doses of methylnitrosourea and negative effect of nitrite plus methylurea. *Cancer Res* 1976; 36:505-510.
- (8) Maekawa A, Matsuoka C, Onodera H, et al. Organ-specific carcinogenicity of N-Methyl-N-Nitrosourea in F344 and ACI/N rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 1985; 109:178-182.
- (9) Hirota N, Aonuma T, Yamada S, et al. Selective induction of glandular stomach carcinoma in F344 rats by N-Methyl-N-nitrosourea. *Jpn J Cancer Res* 1987; 78 (7):634-638.

- (10) Ohgaki H, Ludeke BI, Meier I, et al. DNA methylation in the digestive tract of F344 rats during chronic exposure to N-methyl-N-nitrosourea. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991; 117(1):13-18.
- (11) Shimizu M, Yoshimi N, Yamada Y, et al. Suppressive effects of chlorogenic acid on N-methyl-N-nitrosourea-induced glandular stomach carcinogenesis in male F433 rats. *J Toxicol Sci* 1999; 24:433-439.
- (12) Tatematsu M, Yamamoto M, Iwata H, et al. Induction of glandular stomach cancers in C3H mice treated with N-methyl-N-nitrosourea in the drinking water. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84:1258-1264.
- (13) Yamachika T, Nakanishi H, Inada D, et al. N-Methyl-N-Nitrosourea concentration-dependent, rather than total intake-dependent, induction of adenocarcinoma in the glandular stomach of BALB/c mice. *Jpn J Cancer Res* 1998; (89):385-391.
- (14) Shimizu M, Suzuic M, Moriwakib H, et al. No involvement of b-catenin gene mutation in gastric carcinomas induced by N-methyl-N-nitrosourea in male F344 rats. *Cancer Letters* 2003; 195:147-152.
- (15) Lee YS and Jang J. Potent promoting activity of dimethylitaconate on gastric carcinogenesis induced by N-methylnitrosourea. *Cancer Lett* 1994; 85(2):177-184.
- (16) Takahashi M, Kokubo T, Furukawa F, et al. Effect of high salt diet on rat gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* 1982; 3:1419-1422.
- (17) Tatsuta M, Iishi H, Baba M, et al. Enhanced induction of gastric carcinogenesis by N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats fed a low-protein diet. *Cancer Research* 1991; 51:3493-3496.

- (18) Thomas IK and Erickon KL. Lipid modulation of mammary tumor cell cytotoxicity: direct influence of dietary fats on the effector component of cell-mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 1985; 74:675-680.
- (19) Olson LM, Clinton SK, Everitt JI, et al. Lymphocyte activation, cell-mediated cytotoxicity and their relationship to dietary fat-enhanced mammary tumorigenesis in C3H/OUJ mice. *J. Nutr* 1987; 117:955-963.
- (20) Sommerville BA, Harvey S. The effect of low levels of dietary protein and calcium on growth rate, growth hormone, and vitamin D metabolism in the chicken. *Gen Comp Endocrinol* 1988, 71:93-96.
- (21) Kaptein EM, Fisler JS, Duda MJ, et al. Relationship between the changes in serum thyroid hormone levels and protein status during prolonged protein supplemented caloric deprivation. *Clin Endocrinol* 1985; 22:1-15.
- (22) Yong JB, Kaufman LN, Saville ME, et al. Increased sympathetic nervous system activity in rats fed a low-protein diet. *Am J Physiol* 1985; 248:R627-R637.

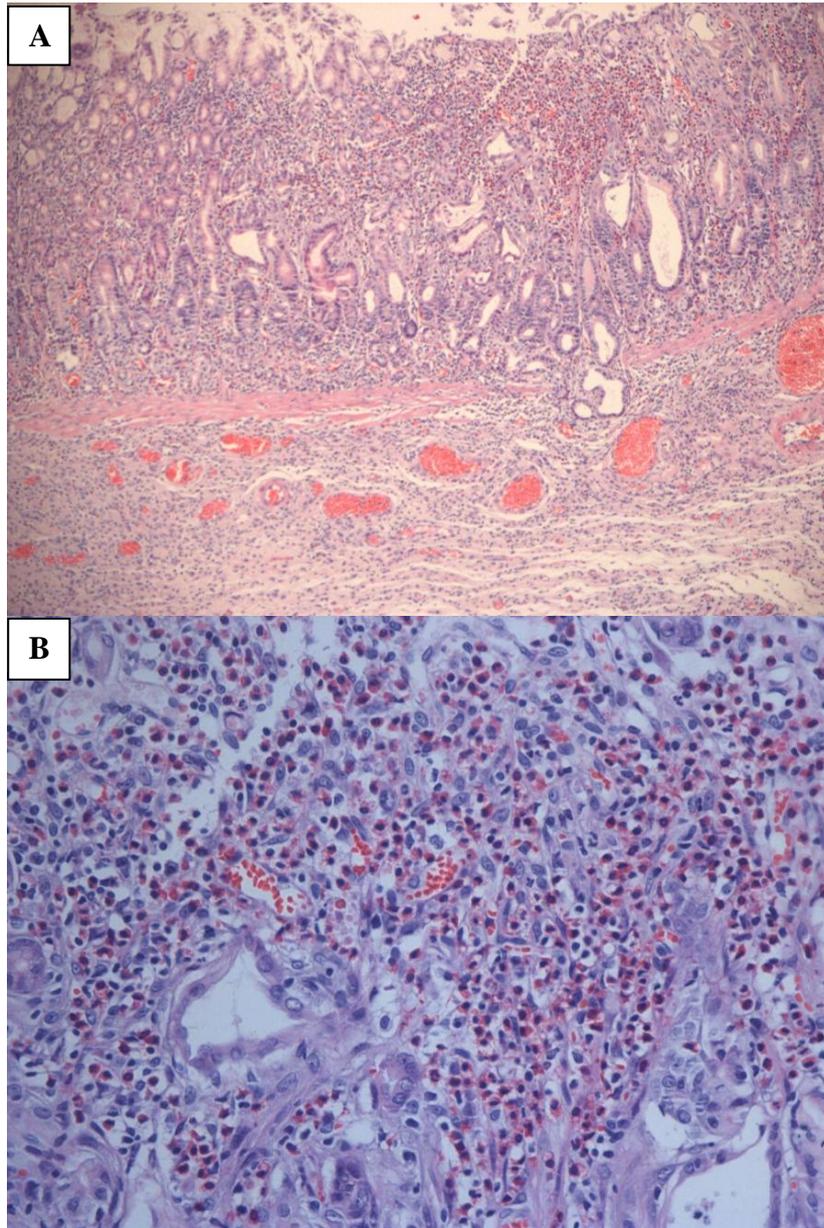


Figura 1. Infiltrado inflamatório da mucosa gástrica.

HE 100X (A), HE 400X (B).

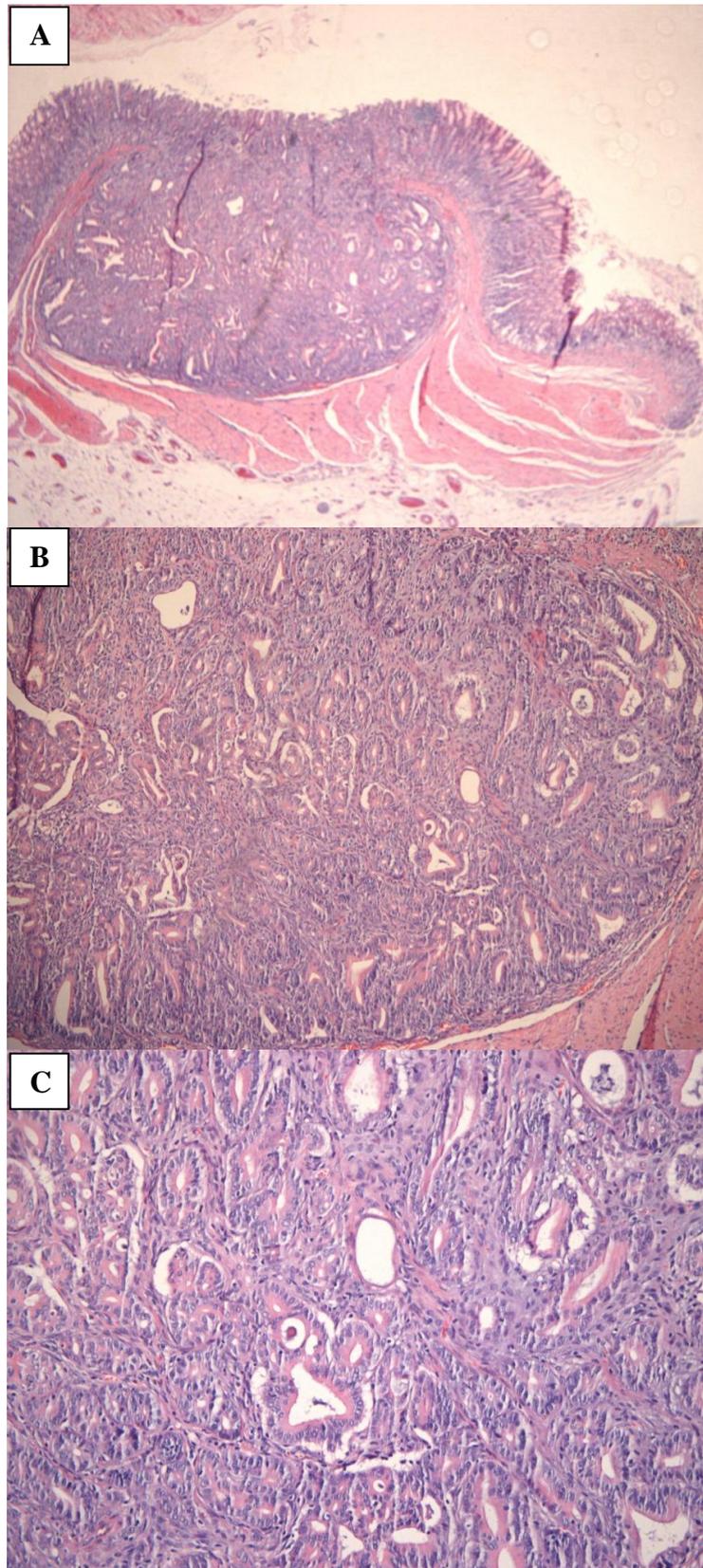


Figura 2. Adenocarcinoma gástrico (T2a).

HE 40X (A), HE 100X (B) e HE 400X (C).

Tabela 1. Médias das variáveis da amostra.

Número efetivo de ratos	Média de peso inicial (g)	Média de peso final (g)	Média de idade no óbito (semanas)
44	346±33	469±59	50±14

Tabela 2. Resultado dos exames histopatológicos dos estômagos.

Semanas	Infiltrado inflamatório	Adenocarcinoma	Carcinoma epidermóide	Sarcoma
22	0	0	1	0
52	2	1	0	0
58	3	0	0	0
64	1	0	0	1
70	0	1	0	0

The Experimental Model of Gastric Carcinogenesis with N-Methyl-N-Nitrosourea for F344 Rats and C3H Mice is valid for Wistar rats?

Lissandro Tarso¹, Fabíola Schons Meyer², Marta Giotti Cioato², Luíse Meurer^{2,3}, Carlos Cauduro Schirmer^{4,5}

¹Postgraduate Program in Surgical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

²Laboratory of Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

³Service of Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

⁴Service of Digestive Surgery, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

⁵Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Running title: Experimental Gastric Carcinogenesis with MNU in Wistar Rats.

Acknowledgements to the financial support granted by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Corresponding Address:

Lissandro Tarso

Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Rua Ramiro Barcelos, 2350

90035-903, Porto Alegre (RS), Brazil

Phone: 55 51 99774962

e-mail: lissandrotarso@hotmail.com

ABSTRACT

Background: The N-methyl-N-nitrosourea (MNU) is a direct acting carcinogen, inducing tumors in several species in a variety of organs, including stomach of rats. Treatment of MNU in the drinking water for 25-42 weeks selectively induced glandular gastric carcinoma in F344 rats and C3H mice.

Objective: To establish an experimental model for selective MNU induction of glandular stomach cancer in Wistar rats.

Methods: A total of 48 males eight-week-old Wistar rats were used in the present study. MNU (Sigma-Aldrich) was dissolved in DMSO and provided as the drinking water *ad libitum* for a period ranging from 16 to 70 weeks. After 16 weeks, four rats were randomly selected and killed. After every six weeks four animals were killed until 70 weeks.

Results: Survival rate was higher than 90%. We had the induction of two adenocarcinomas, one squamous cell carcinoma and one sarcoma. The incidence of gastric adenocarcinoma was 4.5% (0.5 to 15).

Conclusions: The experimental model of gastric carcinogenesis in Wistar rats, using a 200 ppm of MNU dissolved in water, showed not practice viability in our study due to the low rate of gastric adenocarcinoma.

Keywords: N-methyl-N-nitrosourea; Gastric carcinogenesis; Wistar rats.

INTRODUCTION

Since the first report of experimental production of adenocarcinomas of the glandular stomach in rats with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG)¹, many other mammals have been shown to be susceptible to this carcinogen, including hamsters, ferrets and dogs.^{2,3} The agent N-methyl-N-nitrosourea (MNU) is a direct acting carcinogen, inducing tumors in several species in a variety of organs, including the central nervous system, stomach, intestine, Kidney, and Skin.⁴⁻⁷

The mouse and rat are particularly useful species for carcinogenesis studies because of the availability of a number of transgenic, mutant, and chimeric strains. Treatment of MNU in the drinking water for 25-42 weeks selectively induced glandular gastric carcinoma in F344 rats and C3H mice.⁸⁻¹⁴ These animal models have been widely used not only for investigating the pathogenesis of gastric carcinogenesis but also for identifying possible tumor promoters and chemopreventive agents.^{10,11} The aims of the present study were establishing an experimental model for selective MNU induction of glandular stomach cancer in Wistar rats and describe the time to get a level of depth tumor (T).

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design: A total of 48 males eight-week-old Wistar rats were housed in plastic cages (three rats/cage) on hard wood chips in air-conditioned room with a 12 h light-12 h dark cycle. Rats were allowed two

weeks for acclimation before starting of experiments. MNU (Sigma-Aldrich) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and the resulting stock solution was stored in a cool, and dark place. The solution was diluted to 200 ppm with tap water just before using (three times a week), and provided as the drinking water *ad libitum* from light-shielded bottles to prevent photolysis for 16 to 70 weeks. Regular chow pellets (Nuvilab CR-1 – Nuvital S/A) were available *ad libitum*. At 16 weeks, four rats were randomly selected and killed, from each six weeks four animals were killed until 70 weeks.

Exclusion Criteria: Animals that survived less than 16 weeks were excluded in the effective numbers. Necropsies were performed on all animals which died.

Histopathological analysis: The excised stomachs were fixed in buffered formalin, cut into about eight strips, and routinely processed for embedding in paraffin. Tissue sections were stained with HE for histopathological assessment of lesion development. Neoplastic lesions were classified as adenocarcinomas, squamous carcinoma and sarcomas.

Statistical analysis: The confidence interval for proportions using the Binomial Method was applied for calculated of gastric adenocarcinomas incidence. Student's *t* test was performed for means of quantitative variables.

Ethics: The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Research and Postgraduate Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

RESULTS

A total of 48 rats were used in the present study. Four animals died before the week 16 and were undergone to autopsy. These deaths were caused by pneumonia, and they were excluded from the effective numbers. Survival rates were higher than 90%. The average initial body weight was 346 ± 33 g. The weekly body weight gain during follow-up was lower in rats that developed cancer than those who did not develop ($2.1\text{g} \times 3.2\text{ g}$, $p = 0.07$). A total of 44 animals were killed from weeks 16 to 70. Characteristics of the effective number of rats are summarized in Table 1.

Gross and microscopic findings: From weeks 52 to 70 weeks, diffuse inflammatory infiltration in the gastric mucosa were found (figure 1). Intestinal metaplasias were not found in the stomach of any rat in this experiment. At 64 weeks, one extensive lesion in the anterior wall of the stomach was found and histopathological analysis revealed to be a sarcoma. At 70 weeks, one adrenal tumor was found. In the forestomach, only one squamous carcinoma was found at week 22. At week 52 and 70, two well differentiated adenocarcinomas were observed in the glandular stomach. The tumors invaded the muscularis proper superficially (T2a) (figure 2). The incidence of gastric adenocarcinoma was 4.5% (0.5 to 15). Histopathological findings for the stomach are summarized in Table 2.

DISCUSSION

In the present study, we were not able to confirm that MNU in drinking water can induce a high incidence of carcinomas in the Wistar rat glandular stomach. Only two adenocarcinomas developed in Wistar rats receiving 200 ppm MNU. Earlier studies indicate that cancer of the glandular stomach can be produced in F344 rats and C3H mice by the administration of MNU, a widely used mutagen. When MNU is administered in a drinking water for 25-42 weeks, selectively induced glandular gastric carcinoma in F344 rats and C3H mouse.⁸⁻

14

Maekava et al examined the effects of MNU in the drinking water at 100 ppm in F344 rats. After 42 weeks, 18% of rats had adenocarcinoma gastric.⁸ Tatematsu et al induced glandular stomach cancer in C3H mice with MNU in the drinking water at 120 ppm for 30 weeks and had 40% of adenocarcinomas after 54 weeks.¹² Hirota used MNU at 400 ppm in F344 rats for 25 weeks and had 100% of invasive adenocarcinomas.⁹ We used an intermediate concentration of MNU (200 ppm), because studies with lower concentrations showed a low incidence of adenocarcinoma, and higher concentrations have developed advanced tumors. Our objective was obtain early lesions in order to describe the time to get a level of depth tumor (T).

Lee examined the effects of concomitant administration of Dimethylitaconate (DMI) and showed a significant increase of adenocarcinoma incidence, which was 95% compared with 12% MNU alone group ($p < 0.005$).¹⁵ There is evidence that sodium Chloride administration enhances the

carcinogenic effects of MMNG on the rat stomach.¹⁶ Maybe the addition of promoting substance with MNU could have increased our incidence of gastric adenocarcinoma.

Tatsuta et al examined the effects of a very-low-protein on the incidence of gastric cancer induced by MNNU in Wistar rats. Administration p.o. of a very-low-protein diet resulted in a significant increase in the incidence of gastric cancers.¹⁷ The mechanism of this diet is not known, but at least three possible mechanisms may be considered. One mechanism is immunomodulation by dietary protein. Dietary components may influence the development of neoplasias by effects on the host immune mechanisms. In particular, the level and type of fat have been shown to modulate immune responsiveness.^{18,19} Another possible mechanism is an effect on the secretions of various hormones, including growth hormone, thyroid hormones, gastrin, and somatostatin.^{20,21} Growth hormone and thyroid hormones are closely related to the growth of gastrointestinal mucosa. A third possibility is an increase in activity of the sympathetic nervous system. Diet influences the activity of the sympathetic nervous system in experimental animals. There is evidence of neural involvement in the control of cell proliferation.²² In our study, we used a normal protein diet.

It is well known that MNU is a multipotent carcinogen and the carcinogenic action of MNU varies with the strain of rat used and the route of administration.⁸ In addition, it has been demonstrated that the organ specificity of N-nitroso compounds given orally is influenced not only by chemical structure of the test compounds or by the strain of rats used, but also by the dose level of the test compounds.⁸ In this experiment, it was also shown that the organ

specificity of MNU was influenced by the strain of rats and/or by the dose level. Further studies are needed to explain this phenomenon.

CONCLUSION

The experimental model of carcinogenesis in Wistar rats, using a 200 ppm of MNU dissolved in water, showed not practice viability in our study, due to the low rate of development of adenocarcinomas.

ACKNOWLEDGMENTS

Acknowledgements to the financial support granted by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

REFERENCES

- (1) Sugimura T and Sugimura S. Tumor production in glandular stomach of rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. *Nature* 1967; 216:943-944.
- (2) Fujimura S, Kogure K, Oboshi S, et al. Production of tumors in glandular stomach of hamsters by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. *Cancer Res* 1970; 30:1444-1448.
- (3) Fox JG, Wishnok JS, Murphy JC, et al. MNNG-induced gastric carcinoma in ferrets infected with *Helicobacter mustelae*. *Carcinogenesis* 1993; 14:1957-1961.
- (4) Graffi A, Hoffmann F, Schutt M. N-Methyl-N-nitrosourea as a strong topical carcinogen when painted on skin of rodents. *Nature* 1967; 214:611.
- (5) Magee PN, Barnes JM. Carcinogenic nitroso compounds. *Adv Cancer Res* 1967; 10:163-246.
- (6) Alexandrov VA. Uterine, vaginal and mammary tumours induced by nitrosoureas in pregnant rats. *Nature* 1969; 222:1064-1065.
- (7) Narisawa T, Wong CQ, Maronpot RR, et al. Large bowel carcinogenesis in mice and rats by several intrarectal doses of methylnitrosourea and negative effect of nitrite plus methylurea. *Cancer Res* 1976; 36:505-510.
- (8) Maekawa A, Matsuoka C, Onodera H, et al. Organ-specific carcinogenicity of N-Methyl-N-Nitrosourea in F344 and ACI/N rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 1985; 109:178-182.
- (9) Hirota N, Aonuma T, Yamada S, et al. Selective induction of glandular stomach carcinoma in F344 rats by N-Methyl-N-nitrosourea. *Jpn J Cancer Res* 1987; 78 (7):634-638.

- (10) Ohgaki H, Ludeke BI, Meier I, et al. DNA methylation in the digestive tract of F344 rats during chronic exposure to N-methyl-N-nitrosourea. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991; 117(1):13-18.
- (11) Shimizu M, Yoshimi N, Yamada Y, et al. Suppressing effects of chlorogenic acid on N-methyl-N-nitrosourea-induced glandular stomach carcinogenesis in male F433 rats. *J Toxicol Sci* 1999; 24:433-439.
- (12) Tatematsu M, Yamamoto M, Iwata H, et al. Induction of glandular stomach cancers in C3H mice treated with N-methyl-N-nitrosourea in the drinking water. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84:1258-1264.
- (13) Yamachika T, Nakanishi H, Inada D, et al. N-Methyl-N-Nitrosourea concentration-dependent, rather than total intake-dependent, induction of adenocarcinoma in the glandular stomach of BALB/c mice. *Jpn J Cancer Res* 1998; (89):385-391.
- (14) Shimizu M, Suzuic M, Moriwakib H, et al. No involvement of b-catenin gene mutation in gastric carcinomas induced by N-methyl-N-nitrosourea in male F344 rats. *Cancer Letters* 2003; 195:147-152.
- (15) Lee YS and Jang J. Potent promoting activity of dimethylitaconate on gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Lett* 1994; 85(2):177-184.
- (16) Takahashi M, Kokubo T, Furukawa F, et al. Effect of high salt diet on rat gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* 1982; 3:1419-1422.
- (17) Tatsuta M, Iishi H, Baba M, et al. Enhanced induction of gastric carcinogenesis by N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats fed a low-protein diet. *Cancer Research* 1991; 51:3493-3496.

- (18) Thomas IK and Erickon KL. Lipid modulation of mammary tumor cell cytotoxicity: direct influence of dietary fats on the effector component of cell-mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 1985; 74:675-680.
- (19) Olson LM, Clinton SK, Everitt JI, et al. Lymphocyte activation, cell-mediated cytotoxicity and their relationship to dietary fat-enhanced mammary tumorigenesis in C3H/OUJ mice. *J. Nutr* 1987; 117:955-963.
- (20) Sommerville BA, Harvey S. The effect of low levels of dietary protein and calcium on growth rate, growth hormone, and vitamin D metabolism in the chicken. *Gen Comp Endocrinol* 1988, 71:93-96.
- (21) Kaptein EM, Fisler JS, Duda MJ, et al. Relationship between the changes in serum thyroid hormone levels and protein status during prolonged protein supplemented caloric deprivation. *Clin Endocrinol* 1985; 22:1-15.
- (22) Yong JB, Kaufman LN, Saville ME, et al. Increased sympathetic nervous system activity in rats fed a low-protein diet. *Am J Physiol* 1985; 248:R627-R637.

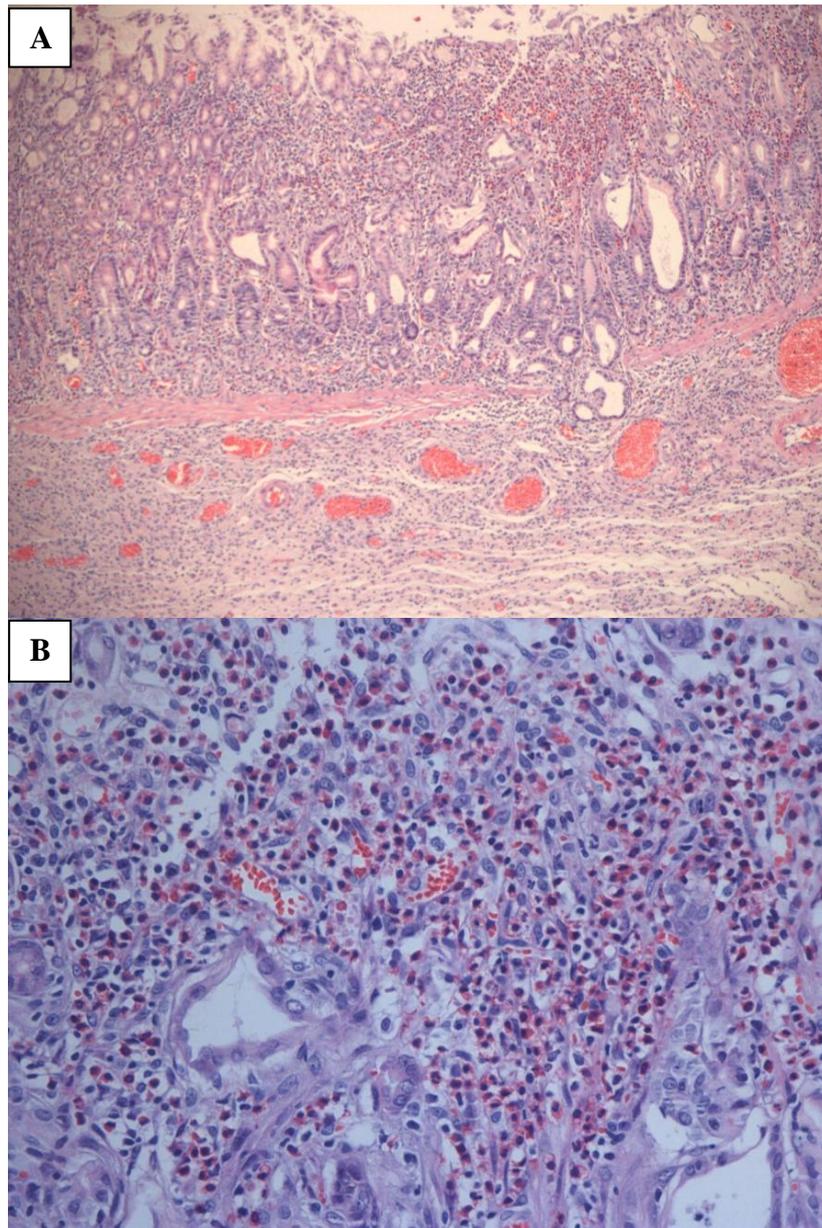


Figure 1. Inflammatory infiltration in the gastric mucosa.

HE 100X (A), HE 400X (B).

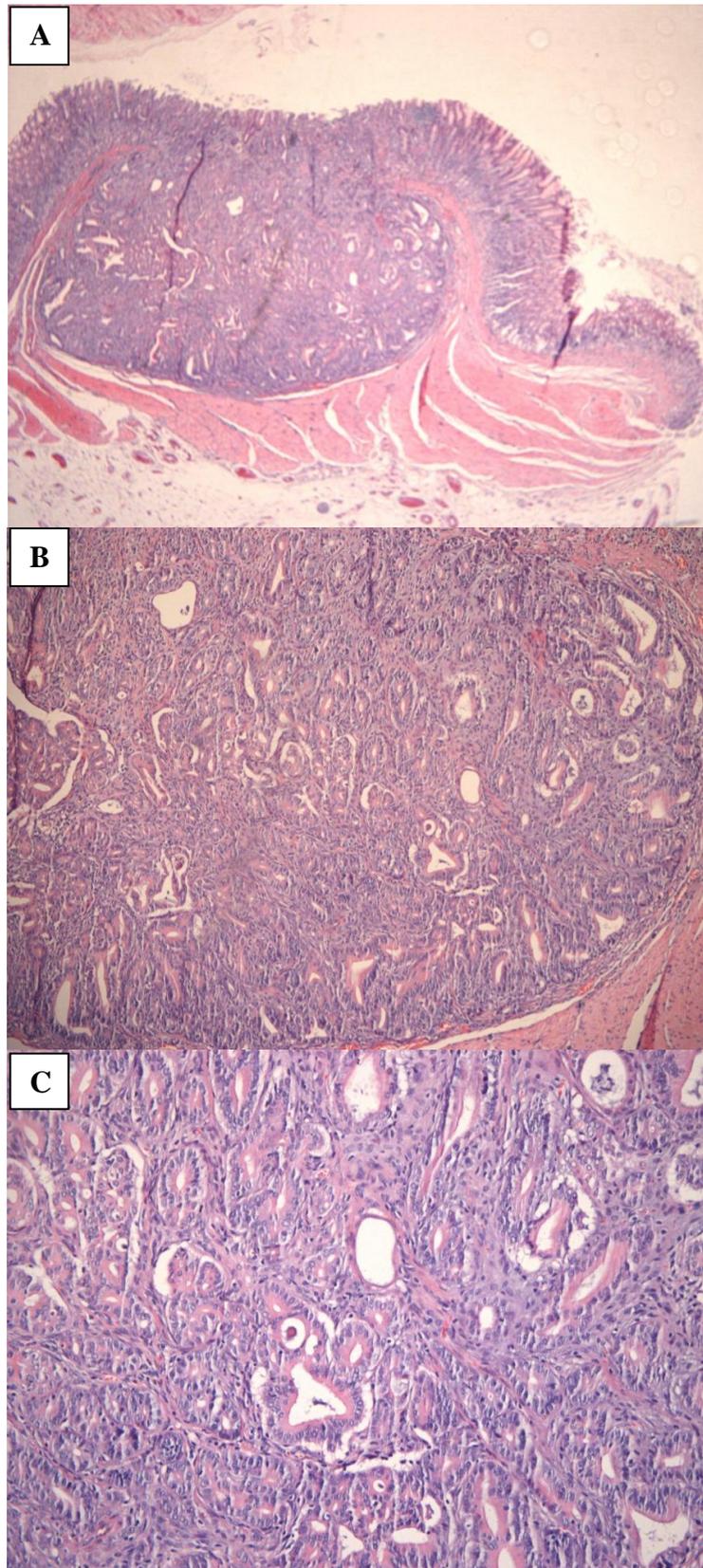


Figure 2. Gastric adenocarcinoma (T2a).

HE 40X (A), HE 100X (B) e HE 400X (C).

Table 1. Characteristics of the effective number of rats

Effective no. of rats	Initial Body wt (g)	Final body wt (g)	Final Age
44	346±33	469±59	50±14

Table 2. Histopathological findings for the stomach

Week	<i>Inflammatory infiltrate</i>	Adenocarcinoma	<i>Squamous carcinoma</i>	Sarcoma
22	0	0	1	0
52	2	1	0	0
58	3	0	0	0
64	1	0	0	1
70	0	1	0	0