

## Influência da morfina na carcinogênese esofágica induzida pela dietilnitrosamina em ratos – resultados preliminares

Carlos F. Dillenborg<sup>1</sup>, Cleber Dario P. Kruehl<sup>1</sup>, Tiago Luís D. e Silva<sup>2</sup>,  
André Silvio Schier<sup>2</sup>, Giancarlo Marafon<sup>2</sup>

**OBJETIVOS:** A alta incidência de câncer esofágico no norte do Irã foi associada ao ópio. A dietilnitrosamina (DEN) é uma das nitrosaminas com maior potencial de produzir câncer experimental no esôfago. Morfina, o maior alcalóide do ópio, quando administrada em altas doses a ratos, aumentou a etilação do DNA esofágico pela DEN e reduziu seu metabolismo hepático de primeira passagem. O presente trabalho objetivou estudar o efeito da administração conjunta de morfina e DEN na carcinogênese esofágica.

**MATERIAIS E MÉTODOS:** Durante 23 semanas, estudamos o efeito da administração conjunta de morfina e DEN na carcinogênese esofágica em ratos.

**RESULTADOS:** Encontrou-se maior incidência tumoral nos animais que receberam somente DEN em relação aos que receberam DEN e morfina.

**CONCLUSÃO:** Concluiu-se que a morfina não apresentou influência sobre a carcinogênese esofágica induzida pela DEN em ratos.

*Unitermos:* carcinoma epidermóide do esôfago; carcinogênese esofágica; nitrosaminas; morfina.

### **Morphine influence on esophageal carcinogenesis induced by diethylnitrosamine in rats - preliminary results**

**OBJECTIVE:** In northern Iran, the high incidence of esophageal cancer was associated to opium. Diethylnitrosamine (DEN) is one of the nitrosamines that presents high risk for experimental cancer of the esophagus. Morphine, the largest alkaloid of opium, has been reported to increase the ethylation of esophageal DNA through DEN and to reduce first-passage hepatic metabolism, when administered in high doses to rats. Our objective was to study the effect of joint administration of morphine and DEN on esophageal carcinogenesis in rats.

**MATERIAL AND METHODS:** For 23 weeks, we studied the effect of joint administration of morphine and DEN on the esophageal carcinogenesis in rats.

**RESULTS:** The animal models that received only DEN presented a higher incidence of tumors than those that received DEN and morphine.

**CONCLUSION:** We concluded that morphine did not influence esophageal carcinogenesis induced by DEN in rats.

*Key-words:* Epidermoid esophageal carcinoma, esophageal carcinogenesis, nitrosamines, morphine.

---

Revista HCPA 2001;21(1):45-54

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Medicina: Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Correspondência: Carlos F. Dillenborg, Rua Joaquim Nabuco 1732, CEP 93310-002, Novo Hamburgo, RS, Brasil. Fone: +55-51-986.0979 / +55-51-594.6922; fax: +55-51-582.6922; e-mail: carlos.dillenborg@terra.com.br

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## Introdução

O ópio foi associado a regiões de alta incidência de câncer de esôfago no norte do Irã (1-5). As razões para esta associação não são conhecidas (6).

O único carcinógeno conhecido capaz de promover câncer de esôfago em animais são as N-nitrosaminas. Neste grupo, a dietilnitrosamina (DEN) é uma das substâncias com maior potencial de produzir câncer no esôfago de ratos e camundongos (6,7). O uso da DEN, induzindo carcinoma de células escamosas no esôfago de camundongos, foi realizado primeiramente por Clapp & Craig (8). Previamente, Schmähl et al. (9) mostraram que a ingestão de 5mg/kg de peso corporal por dia de DEN, diluída em água de beber, produzia carcinoma hepatocelular em ratos em um período de  $138 \pm 10$  dias. Mais tarde, Rubio (10) desenvolveu modelos experimentais em camundongos, em que utilizava a DEN em doses menores, oferecida também em água de beber, a fim de diminuir a mortalidade pela sua ação hepatotóxica.

Seres humanos são expostos às N-nitrosaminas predominantemente através da síntese natural no trato gastrointestinal. Embora não seja ainda conhecido se estes carcinógenos estão envolvidos no câncer de esôfago, evidências provenientes de duas fontes sugerem um papel para tal envolvimento: primeiro, de estudos realizados na China (11-13) e, segundo, de experimentos em animais com nitrosaminas e álcool (1,14,15). Na China, compostos nitrosos foram detectados em alimentos e na urina de moradores em áreas com alta incidência de câncer de esôfago. Além disso, a síntese natural dos compostos nitrosos parece ser maior que o normal na população destas áreas de alto risco (16). A  $O_6$ -metilguanina, um produto da reação das nitrosaminas com DNA, foi detectado no DNA esofágico de pessoas nessas áreas de alta incidência (6). Estudos com álcool em animais têm também mostrado evidências consistentes do envolvimento das nitrosaminas no câncer esofágico. Álcool, o maior fator associado com câncer de esôfago nos países ocidentais (1), mostrou um aumento substancial no número de tumores extra-hepáticos produzidos pelas

nitrosaminas em animais de laboratório, incluindo tumores do esôfago em ratos. Este aumento no número de tumores é primariamente devido às mudanças que o álcool produz na farmacocinética das nitrosaminas (17-19), e levou à hipótese que o efeito do álcool na incidência do câncer humano é o resultado do seu efeito na farmacocinética das nitrosaminas às quais o homem está exposto (16,20). Estudos com morfina também mostraram mudanças na farmacocinética e distribuição da DEN, similares aquelas produzidas pelo etanol (6). Desta forma, constitui a base metabólica para um possível aumento histopatogênico na formação de tumores esofágicos.

No presente estudo, ofereceu-se DEN na água de beber para ratos durante 3 dias por semana, por 161 dias, comparando-os a grupos que ingeriam morfina simultaneamente ou não à DEN. O objetivo foi o de estudar o efeito da administração conjunta de morfina e DEN na carcinogênese esofágica, através da avaliação da incidência de tumores esofágicos.

## Materiais e métodos

Foram utilizados ratos fêmeas da espécie *Rattus norvegicus*, da cepa Wistar (Biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul - FEPPS), com 2 meses de idade e peso médio de 205g, submetidos a temperaturas que variaram de 13°C a 27,5°C.

### Alimentação e substâncias em estudo

Foi oferecida ração para roedores *ad libitum* e a água de beber provinha da rede de abastecimento de Porto Alegre (utilizada para as diluições de todas as soluções). Características do carcinógeno dietilnitrosamina (Sigma Chemicals CO, St. Louis, USA): DEN - N-0756, frasco de 25 ml, densidade - 0,95 g/ml, peso molecular - 102,1 e fórmula química -  $C_4H_{18}N_2O$ ; sulfato de morfina (Cristália, Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira-SP, Brasil): frascos-ampolas de 1 ml, contendo 10 mg de sulfato de morfina DCB 0856.03-7 por 1 ml de solução.

As soluções finais eram renovadas

semanalmente, acondicionadas em recipientes plásticos e guardadas na geladeira a 4°C, protegidas da luz, até que fossem oferecidas aos animais em frascos que igualmente protegiam da luz. Nos dias das trocas das soluções, era medido o volume ingerido pelos animais de cada gaiola e o restante era desprezado.

### **Divisão dos grupos**

O delineamento consistiu de um Experimento Comparativo de Múltiplos Grupos, no qual 184 ratos foram distribuídas aleatoriamente em 5 grupos, assim constituídos:

Grupo 1 (G1 - 8 ratas): recebeu somente água (controle);

Grupo 2 (G2 - 44 ratas): recebeu solução aquosa de sulfato de morfina (controle);

Grupo 3 (G3 - 44 ratas): recebeu solução aquosa de DEN (controle);

Grupo 4 (G4 - 44 ratas): recebeu solução aquosa de DEN e sulfato de morfina diluídas simultaneamente (intervenção em estudo);

Grupo 5 (G5 - 44 ratas): recebeu solução aquosa de sulfato de morfina, sendo substituída por solução aquosa de DEN nos dias subsequentes (controle).

A solução de morfina foi oferecida durante 4 dias no G5 e durante 3 dias por semana nos demais respectivos grupos. A DEN foi ingerida durante 3 dias por semana nos respectivos grupos. A dose de 5mg/kg/dia foi a utilizada tanto para o sulfato de morfina quanto para a DEN.

Os animais foram pesados no início do estudo, aos 3 meses e imediatamente antes do sacrifício.

### **Eutanásia dos animais**

Ocorreu após 23 semanas ou 161 dias após o início do experimento, pela inalação de éter etílico em campânula plástica fechada.

### **Análise macroscópica**

O esôfago (incluindo a junção esofagogástrica) era preso a uma lâmina de isopor pelas extremidades, aberto na sua face

anterior, medido, e fixado em formalina tamponada a 10%. Alguns dias mais tarde, foi realizada a análise macroscópica pelo pesquisador, a quem as peças eram entregues sem qualquer identificação. Procedia-se à coloração com azul de toluidina e, com auxílio de microscópio estereoscópico com aumento de 10 vezes, realizava-se a contagem do número de lesões presentes no esôfago. Desta forma, obtinha-se o índice tumoral de Rubio ( $10 \times \frac{3}{4}$  número de lesões / comprimento do esôfago (cm)).

### **Análise estatística**

Para as variáveis quantitativas, foram calculadas medidas descritivas incluindo a média e o desvio padrão. A comparação dos grupos foi feita através da ANOVA, com um critério de classificação e localização das diferenças através do teste de Tukey. Nas situações onde encontramos forte assimetria na distribuição dos dados e/ou heterocedasticidade, optamos pela técnica não-paramétrica de Kruskal-Wallis, com localização de diferenças através do teste de Dunn. O nível de significância adotado no estudo foi de  $\alpha = 0,05$ . Os dados foram processados e analisados com o auxílio dos programas Excel 97 e SPSS versão 8.0.

### **Resultados**

Estudo piloto foi realizado, no qual definiu-se que a dose tolerada de sulfato de morfina para ingestão pelos animais, sem causar efeitos adversos, era de 5 mg/kg/dia.

Do total de 184 ratos, houve 2 mortes não programadas durante o experimento, ambas precocemente (aos 31 e 74 dias de experimento) e pertencentes ao Grupo 3.

A dosagem de cada substância ingerida variou de acordo com o tipo de solução oferecida (tabela 1). A dose realmente ingerida, por animal, foi calculada, com base na quantidade de solução semanal ingerida, do peso no início, as 12 e 23 semanas de experimento, e da concentração das substâncias na solução oferecida aos animais. A dose média recebida foi inferior à esperada para todos os grupos, variando entre 45,4% e

**Tabela 1.** Dose das substâncias ingeridas (mg/kg/dia) durante as 23 semanas

	Grupos que ingeriram Dietilnitrosamina			Grupos que ingeriram Sulfato de morfina		
	G3	G4	G5	G2	G4	G5
Semana 1	3,41	3,16	3,16	2,35	3,16	1,88
Semana 2	3,18	2,99	3,10	2,36	2,99	2,25
Semana 3	3,26	2,81	2,97	2,52	2,81	1,80
Semana 4	3,20	2,33	3,03	2,58	2,33	2,35
Semana 5	3,16	3,04	3,04	3,13	3,04	2,34
Semana 6	3,11	3,12	3,12	2,42	3,12	2,12
Semana 7	2,97	3,02	3,02	2,14	3,02	2,19
Semana 8	3,28	2,67	2,67	2,13	2,67	2,34
Semana 9	2,82	2,42	2,42	2,14	2,42	2,21
Semana 10	2,48	2,54	2,54	1,93	2,54	2,27
Semana 11	2,63	2,57	2,57	1,97	2,57	2,25
Semana 12	2,00	1,90	1,90	1,53	1,90	2,25
Semana 13	2,21	2,02	1,93	3,21	2,02	2,34
Semana 14	3,00	1,66	2,90	2,75	1,66	3,16
Semana 15	2,64	1,96	3,09	3,44	1,96	2,94
Semana 16	2,98	2,27	3,55	2,52	2,27	3,11
Semana 17	3,24	2,85	3,04	2,36	2,85	2,95
Semana 18	3,31	2,85	2,71	2,30	2,85	2,70
Semana 19	3,22	2,17	2,75	2,78	2,17	2,70
Semana 20	3,00	2,11	2,94	2,02	2,11	2,70
Semana 21	2,54	2,19	2,75	3,04	2,19	2,49
Semana 22	2,50	2,45	2,44	2,84	2,45	2,84
Semana 23	2,30	2,53	2,75	2,70	2,53	2,07
MÉDIA <sup>a</sup>	2,94 ±0,31 <sup>b</sup>	2,30 ±0,13 <sup>b</sup>	2,80 ±0,11 <sup>b</sup>	2,48 ±0,20 <sup>b</sup>	2,30 ±0,13 <sup>b</sup>	2,44 ±0,12 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão; <sup>b</sup> diferenças estatisticamente significativas dentro dos grupos que ingeriram as respectivas soluções. G2-morfina; G3-DEN; G4-DEN+morfina simultâneos; G5-DEN+morfina intercalados.

58,6% das doses esperadas de 5 mg/kg/dia. Entre os grupos que ingeriram DEN, todos mostraram diferença significativa entre si ( $P < 0,05$ ). Entre os grupos que ingeriram morfina, o G4 ingeriu significativamente menos opióide do que os outros grupos ( $P < 0,05$ ) (tabela 1).

Na análise macroscópica dos esôfagos, observou-se lesões papilares e vegetantes, indistintamente entre os grupos testados, apresentando entre 1 e 4 mm de diâmetro. As lesões apresentaram-se uniformemente distribuídas em toda a extensão do esôfago.

Do total de 182 animais expostos aos carcinógenos, já excluídas as perdas, observou-se lesões tumorais em 34 (18,68%).

No G3, 42,9% dos animais apresentaram tumores, enquanto que no G4 e G5, 13,6% e 22,7% foram acometidos, respectivamente.

O grupo que ingeriu DEN (G3) apresentou significativamente maior número de tumores do que os outros grupos ( $P < 0,05$ ). O grupo que ingeriu DEN e morfina intercalados (G5) apresentou maior número de tumores do que o grupo que ingeriu estas substâncias simultaneamente (G4) e do que os grupos que não ingeriram carcinógeno (G1 e G2), constituindo-se num grupo intermediário, cuja significância estatística a análise não conseguiu definir (tabela 2).

O índice de tumores proposto por Rubio

(10) (IT) foi calculado. O grupo que ingeriu DEN (G3) apresentou significativamente maior IT do que os outros grupos ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença estatística entre os demais grupos, embora o que ingeriu DEN e morfina intercalados (G5) tenha apresentado um IT mais elevado em relação aos grupos que ingeriram estas substâncias simultaneamente (G4) e aos que não ingeriram carcinógeno (G1 e G2) (tabela 2).

## Discussão

Os compostos nitrosos começaram a ser estudados neste século a partir da década de 30. Vários estudos demonstraram a sua hepatotoxicidade, manifestada por insuficiência e necrose hepáticas, tanto em seres humanos como em animais (9,21). Lijinsky (7) descreveu que as nitrosaminas produzem a alquilação do DNA em tecidos humanos *in vitro*. Os compostos N-nitrosos apresentam-se na dieta ou no ambiente em doses bem inferiores àquelas necessárias para desenvolver câncer, por isso a grande preocupação é com a sua exposição crônica. Vários autores (7,12,22,23) relataram a presença de nitratos carcinogênicos em peixes, carnes com conservantes, vegetais em conserva, cogumelos, queijos e leite, além de estar presente em baixas concentrações na cerveja, uísque, licores, e em alguns corantes e aromatizantes adicionados a alimentos. A exposição ocupacional na indústria da borracha, manufatura de pneus, pesticidas, cosméticos e curtimento do couro são fatores

adicionais importantes. O uso doméstico de cosméticos, xampus e detergentes foi também relacionado como fonte de exposição às nitrosaminas, além do consumo de tabaco. A partir desses estudos, foi sugerido que as nitrosaminas poderiam estar relacionadas ao câncer de esôfago no homem (11,16,24).

A descoberta de que as nitrosaminas apresentam um organotropismo bem definido permitiu o desenvolvimento de modelos de estudo de câncer em vários órgãos, entre eles o esôfago. Archer (25) afirmou que os compostos N-nitrosos exibem atividade biológica similar em tecidos animais e humanos. Vários autores (10,26-29) utilizaram a dietilnitrosamina e produziram com esta droga a carcinogênese esofágica em animais. As doses utilizadas nos trabalhos iniciais, como o de Baker (26), tinham uma elevada hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. Por isso, estudos posteriores como os de Rubio et al. (10) utilizaram doses menores a fim de diminuir a mortalidade dos animais de experimentação. Vários outros autores (30-34) utilizaram-se deste modelo em camundongos e ratos, mostrando graus variados de incidência tumoral esofagiana. Gibel (14) provocou tumores esofágicos em 30% e 56% dos ratos com as respectivas doses de 2,5 e 10 mg/kg/dia. Além disto, foi demonstrada a alquilação dos DNAs hepático e esofágico com a dose de 3mg/kg/dose (6). Schmähl et al. (9) provocaram tumores hepáticos em quase todos os ratos de seu experimento, no período de  $138 \pm 10$  dias, utilizando a dose de 5mg/kg/dia de DEN, ingerida diariamente. No presente estudo, optou-

**Tabela 2.** Achados de macroscopia estratificados por grupos de tratamento

	Número de tumores	Comprimento dos esôfagos	Índice de Rubio <sup>a</sup>
Grupo 1	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	7,19 ± 0,61 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
Grupo 2	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	6,68 ± 0,38 <sup>b,c</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>
Grupo 3	0,98 ± 1,47 <sup>c</sup>	6,92 ± 0,54 <sup>b</sup>	0,13 ± 0,20 <sup>c</sup>
Grupo 4	0,20 ± 0,55 <sup>b</sup>	6,77 ± 0,41 <sup>b</sup>	0,03 ± 0,08 <sup>b</sup>
Grupo 5	0,41 ± 0,95 <sup>b,c</sup>	6,95 ± 0,51 <sup>b</sup>	0,06 ± 0,13 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Índice Tumoral de Rubio (10) (IT) - número de lesões / tamanho esôfago (cm);

<sup>b,c</sup> dados são apresentados como média ± desvio padrão. Letras-índice distintas representam diferenças estatisticamente significativas.

se pela dose de 5mg/kg/dia de DEN, durante 3 dias por semana, com o intuito de diminuir a mortalidade de origem hepática. O tempo de exposição de 23 semanas ou 161 dias foi adotado por ser um período em que ocorre um grande número de lesões cancerosas com níveis aceitáveis de mortalidade (32,34).

A incidência do câncer de esôfago é influenciada por diferentes fatores nas diversas áreas endêmicas do mundo. Na Europa e Estados Unidos da América, é associado com o consumo do álcool (35,36), e no norte do Irã foi associado por epidemiologistas com o fumo do ópio e a ingestão de resíduos do cachimbo de ópio (*sukhteh*). Estudos prévios mostraram que o etanol altera a farmacocinética das nitrosaminas (17,20). Desta forma, elas são mais expostas ao tecido esofágico, sendo capazes de induzir câncer de esôfago em animais (15,17,20). Estes estudos aumentaram ainda mais as suspeitas de que a exposição às nitrosaminas seria um importante fator neste tipo de câncer no homem. Ribeiro Pinto & Swann (6) mostraram que a morfina, o principal alcalóide do ópio, também modifica a farmacocinética e distribuição da DEN e que as mudanças são similares àquelas produzidas pelo etanol. Estes autores mostraram que uma dose única de 5mg/kg/dia de sulfato de morfina aumentou a alquilação do DNA esofágico de ratos em 90% e diminuiu a do hepático em 10%, quando administrada previamente a uma única dose de DEN. Estes resultados não se alteraram significativamente com o aumento das doses de sulfato de morfina para 10 e 20 mg/kg/dia. No presente estudo, optou-se pela utilização de 5mg/kg/dia de sulfato de morfina, por ser uma dose capaz de provocar a alteração farmacocinética demonstrada por Ribeiro Pinto & Swann (6). Adicionalmente, os animais toleraram bem a ingestão desta dose, sem causar alterações em seu grau de atividade, como demonstrado em estudo piloto prévio. Embora esta seja uma dose sensivelmente superior do que a de morfina geralmente utilizada para analgesia na medicina ocidental, ela é compatível ou mesmo inferior às relatadas entre adictos, que recebiam doses diárias de ópio tão altas quanto 3g (3), e em cujo grupo a relação entre ópio e câncer de esôfago foi primeiramente descrita (37).

Duas foram as mortes não programadas (1,39%), ocorridas aos 31 e 74 dias de experimento, que parecem não ter tido relação com o tipo de substância ingerida, devido à precocidade com que ocorreram (31 e 74 dias). Não foram evidenciadas alterações secundárias à morfina no comportamento dos animais.

O índice Tumoral de Rubio (10) (IT) - número de lesões / tamanho esôfago (cm), adotado no presente estudo, mostrou-se adequado na avaliação da incidência tumoral esofágica macroscópica em outros estudos (31,34).

Os animais apresentavam seus pesos médios elevados em 8,56% aos 3 meses e 17,82% no final dos 6 meses, em relação ao início do experimento. O conhecimento de tais dados permitiu a correção da concentração das substâncias oferecidas na água de beber.

As dosagens semanais realmente ingeridas de cada substância para cada animal pareceram ser parâmetro mais objetivo e preciso do que as quantidades ingeridas das soluções isoladamente, e por isso foi utilizado neste estudo. Estas dosagens foram 41,62% a 55,66% menores do que as esperadas para todas as substâncias. As baixas temperaturas ambientais secundárias ao inverno rigoroso (13 a 20°C em metade do período), podem ter contribuído para uma menor ingestão líquida e, em consequência, pelas menores dosagens. Embora a carcinogênese esofágica seja reconhecidamente dose dependente, a menor dosagem de DEN não teria influído decisivamente sobre os resultados da carcinogênese esofágica neste estudo. Rubio et al. (10,38) descreveram que, além da dose administrada, o tempo transcorrido seria de grande importância na formação de tumores em esôfagos de camundongos. Segundo estes autores, clones de células esofagianas seriam "programadas" à carcinogênese em estágios precoces do tratamento com a DEN, e que um grande número de tumores ocorreria em intervalos maiores, mesmo após algumas poucas doses de DEN. Enquanto animais tratados por 3 meses apresentaram IT = 0,9, animais tratados por 3 meses e mantidos vivos por 4 meses adicionais, com uma dieta livre de carcinógeno, apresentaram IT 5 vezes maior

(IT = 4,6) (38). No presente estudo, desenvolveu-se, no grupo que ingeriu somente DEN (G3), uma percentagem de animais acometidos por tumores próxima ao estimado previamente ao início do estudo (obtido = 43%, estimado = 30%). A partir disto, pode-se inferir que: a) tanto o tempo transcorrido de 6 meses quanto às doses realmente ingeridas de DEN foram adequados para provocar os efeitos carcinogênicos esperados; b) as baixas temperaturas ambientais, embora tenham diminuído a ingestão hídrica pelos animais e, em consequência, da dosagem das substâncias, também não interferiram significativamente no processo de carcinogênese esofágica induzida pela DEN.

Na análise macroscópica, observou-se que cerca de 43% dos animais expostos à DEN apresentaram tumores na luz esofágica. Vários autores relataram previamente valores semelhantes em seus estudos com ratos (14,26,39). Não há referência na literatura, até o momento, de modelos experimentais que estudaram efeitos carcinogênicos diretos ou indiretos da morfina sobre a mucosa esofágica.

Ao se compararem os grupos sob o ponto de vista macroscópico, nota-se que há uma diferença estatística significativamente maior em relação ao número de tumores e índice tumoral de Rubio (IT) (10) entre o grupo que ingeriu somente o carcinógeno (G3) e todos os outros grupos (tabela 2). Os 3 grupos que usaram DEN apresentaram número de tumores e IT diferentes entre si, proporcionais à dosagem recebida de carcinógeno. Embora as doses de DEN tenham sido significativamente diferentes entre estes grupos ( $P < 0,05$ ), o IT encontrou significância estatística somente para o grupo que ingeriu DEN (G3) em relação aos outros que receberam também morfina.

A ingestão da solução concomitante de morfina e DEN (G4) provocou IT inferior, porém sem alcançar significância estatística, ao do grupo que ingeriu as mesmas substâncias em soluções separadas, em dias alternados (G5). A principal causa teria sido a significativa menor dosagem ingerida de DEN no G4 em relação ao G5 ( $P < 0,05$ ), provocando um menor efeito dose dependente sobre a carcinogênese esofágica. Esta menor dosagem deveu-se à menor média de ingestão líquida diária por

animal: 22,9 ml para G4 e 28,7 ml para G5 ( $P < 0,05$ ). Desconhecem-se as razões para esta menor ingestão, porém é possível que a solução contendo DEN e morfina concomitante tenha sido menos tolerada pelos animais.

Entre os grupos que ingeriram sulfato de morfina, houve uma maior incidência tumoral no grupo que ingeriu morfina e DEN alternados (G5) do que o que recebeu estas substâncias simultaneamente (G4) e o que ingeriu somente morfina (G2) (tabela 2). Não houve diferença estatística entre nenhum dos grupos em relação ao IT, porém houve menor consumo de morfina por G4 em relação aos outros dois grupos ( $P < 0,05$ ), reforçando a possibilidade da menor tolerância dos animais à solução constituída por DEN e morfina concomitante.

Desta forma, pode-se inferir que a morfina não apresentou, neste estudo, influência sobre a carcinogênese esofágica induzida pela DEN, e que a incidência tumoral foi proporcional à dose administrada do carcinógeno.

O mecanismo das mudanças produzidas pela morfina não é claro. A inibição do metabolismo de outras drogas pela morfina é conhecida desde 1956 (6,40). Tratamento crônico ou subagudo de ratos machos adultos com morfina diminuíram os níveis de alguns P450s, tais como P450 2C11 (41). Por outro lado, quando doses de morfina entre 5 e 20 mg/kg/dia foram administradas a ratos por 4 dias ou mais, outros P450s, como P450 1A2, 2B1 e 2E1, foram induzidos (41). Desde que uma parcela substancial do metabolismo hepático da DEN no rato é realizada pelo P450 2E1, o aumento do nível deste P450 produzido pela morfina poderia impedir qualquer inibição do metabolismo da DEN a este nível (6). Isto explicaria porquê a administração crônica da morfina teria um menor efeito sobre a alquilação do DNA tecidual esofágico pela DEN do que uma dose única deste opióide (6). Assim, a DEN é largamente metabolizada no fígado do rato pelo P450 2E1 (42), e a morfina, administrada de forma crônica, induziria este subgrupo da enzima P450. Desta maneira, o metabolismo de primeira passagem da DEN não seria inibido pela morfina, e possivelmente até estimulado. Esta poderia ser a razão pela qual, no presente estudo, os grupos que ingeriram DEN e morfina

apresentaram um menor número de tumores do que o grupo que ingeriu somente o carcinógeno.

Cabe salientar que, no presente estudo, a presença de neoplasias foi avaliada unicamente pela macroscopia, estando sujeita, desta forma, a potenciais distorções em relação a real presença de neoplasias malignas. A avaliação microscópica será objeto de estudo futuro, e necessária para conclusões mais definitivas sobre o assunto.

Neste modelo experimental, concluímos que:

- a morfina não apresentou influência sobre a carcinogênese esofágica induzida pela DEN em avaliação macroscópica;
- índice de tumores esofágicos foi proporcional à dose realmente ingerida de DEN, e não sofreu influência do sulfato de morfina;
- a DEN ingerida isoladamente, na dosagem média de 2,94 mg/kg/dia durante 3 dias por semana em 23 semanas, induziu tumores esofágicos macroscópicos com incidência satisfatória para modelos de carcinogênese que objetivam estudar fatores promotores da mesma.

**Agradecimentos.** À Fundação Estadual de Proteção e Pesquisa em Saúde (FEEPS), pela disponibilização do biotério e dos animais utilizados nesta pesquisa, e ao Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que, através do seu Fundo de Incentivo à Pesquisa, disponibilizou apoio financeiro decisivo para a realização desta pesquisa.

## Referências

1. Ghadirian P, Vobecky J, Vobecky JS. Factors associated with cancer of the oesophagus: an overview. *Cancer Detect Prev* 1988;11:225-34.
2. Ghadirian P, Stein GF, Gorodetzky C, Roberfroid MB, Mahon GA, Bartsch H, et al. Oesophageal cancer studies in the Caspian littoral of Iran: some residual results, including opium use as a risk factor. *Int J Cancer* 1985;35:593-7.
3. Hewer T, Rose E, Ghadirian P, Castegnaro M, Malaveille C, Bartsch H, et al. Ingested mutagens from opium and tobacco pyrolysis products and cancer of the oesophagus. *Lancet* 1978;2:494-6.
4. Malaveille C, Friesen M, Camus AM, Garren L, Hautefeuille A, Béréziat JC, et al. Mutagens produced by the pyrolysis of opium and its alkaloids as possible risk factors in cancer of the bladder and oesophagus. *Carcinogenesis* 1982;3:577-85.
5. Cook-Mozaffari PJ, Azordegan F, Day NE, Ressicaud A, Sabai C and Aramesh B. Oesophageal cancer studies in the Caspian Littoral of Iran: results of a case-control study. *Br J Cancer* 1979;39:293-309.
6. Ribeiro Pinto LF, Swann PF. Opium and oesophageal cancer: effect of morphine and opium on the metabolism of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in the rat. *Carcinogenesis* 1997;18:365-9.
7. Lijinsky W. Chemistry and biology of N-nitroso compounds. Cambridge: Cambridge University Press; 1992.
8. Clapp NK, Craig AW. Carcinogenic effects of diethylnitrosamine in RF mice. *J Natl Cancer Inst* 1967;39:903-16.
9. Schmähel D, Preussmann R, Hamperl H. Leberkrebs-erzeugende wirkung von diäthylnitrosamin nach oraler gabe bei ratten. *Naturwissenschaften* 1960;47:89.
10. Rubio CA, Liu FS, Chejfec G, Sveander M. The induction of esophageal tumors in mice: dose and time dependency. *In Vivo* 1987;1:35-8.
11. Lu SH, Chui SX, Yang WX, Hu XN, Guo LP, Li FM. Relevance of N-nitrosamines to oesophageal cancer in China. *IARC Sci Publ* 1991;105:11-7.
12. Cheng KK, Day NE, Duffy SW, Lam TH, Fok M, Wong J. Pickled vegetables in the aetiology of oesophageal cancer in Hong Kong Chinese. *Lancet* 1992;339:1314-8.
13. Wu Y, Chen J, Ohshima H, Pignatelli B, Boreham J, Li J, et al. Geographic association between urinary excretion of N-nitroso compounds and oesophageal cancer mortality in China. *Int J Cancer* 1993;54:713-9.
14. Gibel W. Experimentelle untersuchungen zur zynkarzinogenese beim ösophaguskarzinom. *Arch Geschwulstforsch* 1967;30:181-9.
15. Aze Y, Toyoda K, Furukawa F, Mitsumori K, Takahashi M. Enhancing effect of ethanol on esophageal tumor development in rats by initiation of diethylnitrosamine. *Carcinogenesis* 1993;14:37-40.
16. Bartsch H, Ohshima H, Pignatelli B, Calmels S.

- Human exposure to endogenous N-nitroso compounds: quantitative estimates in subjects at high risk for cancer of the oral cavity, oesophagus, stomach and urinary bladder. *Cancer Surv* 1989;8:335-62
17. Swann PF, Coe AM, Mace R. Ethanol and dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine metabolism and disposition in the rats. Possible relevance to the influence of ethanol on human cancer incidence. *Carcinogenesis* 1984;5:1337-43.
  18. Swann PF. The possible role of nitrosamines in the link between alcohol consumption and esophageal cancer in men. *Toxicol Pathol* 1984;12:357-60.
  19. Swann PF. Effect of ethanol on nitrosamine metabolism and distribution. Implications for the role of nitrosamines in human cancer and for the influence of alcohol consumption on cancer incidence. *IARC Sci Publ* 1984;57:501-12.
  20. Anderson LM, Chhabra SK, Nerurkar PV, Souliotis VL, Kyrtopoulos SA. Alcohol-related cancer risk: a toxicokinetic hypothesis. *Alcohol* 1995;12:97-104.
  21. Bartsch H. N-Nitroso compounds and human cancer: where do we stand? *IARC Sci Publ* 1991;1-10.
  22. Ender F, Havre GN, Madsen R, Ceh L, Helgebostad A. Studies on conditions under which N-nitrosodimethylamine is formed in herring meal produced from nitrite-preserved herring. The risk of using nitrite uncritically as a preservative agent. *Z Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd* 1967;22:181-9.
  23. Siddiqi MA, Tricker AR, Kumar R, Fazili Z, Preussmann R. Dietary sources of N-nitrosamines in a high-risk area for oesophageal cancer--Kashmir, India. *IARC Sci Publ* 1991;105:210-3.
  24. Forman D. Are nitrates a significant risk factor in human cancer? *Cancer Surv* 1989;8:443-58.
  25. Archer MC. Mechanisms of action of N-nitroso compounds. *Cancer Surv* 1989;8:241-50.
  26. Baker JR, Mason MM, Yerganian G, Weisburger EK, Weisburger JH. Induction of tumors of the stomach and esophagus in inbred Chinese hamsters by oral diethylnitrosamine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974;146:291-3.
  27. Reuber MD. Carcinomas of the esophagus in rats ingesting diethylnitrosamine. *Eur J Cancer* 1975;11:97-9.
  28. Reuber MD. Histopathology of preneoplastic and neoplastic lesions of the esophagus in BUF rats ingesting diethylnitrosamine. *J Natl Cancer Inst* 1977;58:313-21.
  29. Rubio CA. Epithelial lesions antedating oesophageal carcinoma. I. Histologic study in mice. *Pathol Res Pract* 1983;176:269-75.
  30. Krueel CDP. Classificação citopatológica das lesões precursoras do carcinoma escamoso do esôfago: modelo experimental em camundongos [tese] São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1992.
  31. Gurski RR, Schirmer CC, Krueel CR, Komlos F, Krueel CD, Edelweiss MI. Induction of esophageal carcinogenesis by diethylnitrosamine and assessment of the promoting effect of ethanol and N-nitrosornicotine: experimental model in mice. *Dis Esophagus* 1999;12:99-105.
  32. Melo LL, Krueel CD, Kliemann LM, Cavazzola LT, Boeno R da L, Silber PC, et al. Influence of surgically induced gastric and gastroduodenal content reflux on esophageal carcinogenesis--experimental model in Wistar female rats. *Dis Esophagus* 1999;12:106-15.
  33. Schirmer CC. Avaliação do efeito da cafeína na carcinogênese esofágica induzida pela dietilnitrosamina. Estudo experimental em camundongos [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1999.
  34. Velho AV. A influência do chá preto sobre a indução tumoral esofágica pela dietilnitrosamina: modelo experimental em camundongos [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1998.
  35. Blot WJ. Esophageal cancer trends and risk factors. *Semin Oncol* 1994;21:403-10.
  36. Tuyns AJ, Castegnaro M, Toussaint G, Walker EA, Griciute LL, Le Talaer JY, et al. Research on the etiological factors of oesophageal cancer in the West of France. *Bull Cancer* 1980;67:15-28.
  37. Dowlatshahi K, Miller RJ. Role of opium in esophageal cancer: a hypothesis. *Cancer Res* 1985;45:1906-7.
  38. Rubio C, Munck-Wikland E, Fagerberg J, Strander H, Kuylenstierna R, Krueel C. Further studies on the carcinogenic-free interval following exposure in experimental esophageal tumorigenesis. *In Vivo* 1993;7:81-4.
  39. Mandard AM, Marnay J, Herlin P, Elie H, Tuyns

- AJ, Le Talaer JY. Cancer of the esophagus induced in the Wistar rat by ethyl-N-butyl-nitrosamine. *Bull Cancer* 1984;71:419-24.
40. Cochin J, Axelrod J. Biochemical and pharmacological changes in the rat following chronic administration of morphine, nalorphine and normorphine. *J Pharmacol Exp Ther* 1959;(125):105-10.
41. Rane A, Liu Z, Henderson CJ, Wolf CR. Divergent regulation of cytochrome P450 enzymes by morphine and pethidine: a neuroendocrine mechanism? *Mol Pharmacol* 1995;47:57-64.
42. Yoo JS, Ishizaki H, Yang CS. Roles of cytochrome P450IIE1 in the dealkylation and denitrosation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in rat liver microsomes. *Carcinogenesis* 1990;11:2239-43.