

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CAFEÍNA NA CARCINOGENESE ESOFÁGICA
INDUZIDA PELA DIETILNITROSAMINA
ESTUDO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

CARLOS CAUDURO SCHIRMER

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Isabel Edelweiss

Co-orientador: Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Kruel

Tese de Doutorado

1999



MED
T
wi250 S37a 1999

05189704

[0283516] Schirmer, Carlos Cauduro. Avaliação do efeito da cafeína na carcinogênese esofágica induzida pela dietilnitrosamina: estudo experimental em camundongos. 1999. 113 f. : il.

FICHA CATALOGRÁFICA

S37a

Schirmer, Carlos Cauduro

Avaliação do efeito da cafeína na carcinogênese esofágica induzida pela dietilnitrosamina. Estudo experimental em camundongos. / Carlos Cauduro Schirmer; orient. Maria Isabel Edelweiss. Porto Alegre: UFRGS, 1999.

Fis. 113

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina: Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica.

1. Neoplasia do esôfago 2. Carcinoma Epidermóide do Esôfago 3. Carcinogênese esofágica: Cafeína: Nitrosaminas 4. Modelo experimental I. Maria Isabel Edelweiss. II. Título.

CDU: 616.329-006

CDD: 616.32

"A ciência sem religião é parálitica – a religião sem a ciência é cega."

ALBERT EINSTEIN



À minha esposa Siglia, pelo estímulo, compreensão e amor que nos unem ao longo destes anos.

À nossa amada filha Luiza, razão maior de nossas vidas.

Aos meus pais Gastão e Marta, pela dedicação, amor e honestidade com que me educaram para a vida.

Às minhas irmãs Silvana, Lúcia e Maria Alice, pelo carinho e amor fraterno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas e instituições que tornaram possível a realização desta tese e de modo especial:

à Dra Maria Isabel Edelweiss, professora do Departamento de Patologia da UFRGS, minha orientadora, que soube inteligentemente estimular o nosso trabalho, não economizando carinho, compreensão e dedicação, qualidades fundamentais num ótimo orientador;

ao Dr. Cleber Kruehl, professor do Departamento de Cirurgia da UFRGS, co-orientador desta tese, pela amizade e oportunidade de seguir esta linha de pesquisa;

ao Dr. Marco Antônio Dexheimer, professor de Bioquímica da UFRGS, que abriu as portas de sua empresa privada a Pró Ambiente Análises Químicas e Toxicológicas, orientando a diluição das soluções utilizadas com alto rigor técnico;

aos funcionários da Pró Ambiente Análises Químicas e Toxicológicas pela simpatia e despreendimento;

às veterinárias Luiza Maria Gomes de Macedo Braga e Mara de Souza Motta, e a bióloga Patrícia Sesterheim, pela capacitação profissional, cuidado e dedicação com os animais, que foram fundamentais na realização deste trabalho experimental;

aos funcionários do FEEPS que durante 180 dias auxiliaram no trato e cuidados dos animais;

ao médico residente de cirurgia Dr. Rafael Da Fontoura, pela dedicação e auxílio fundamentais na dissecação dos animais e confecção do banco de dados;

ao colega cirurgião Dr. Richard Gurski pelo convívio e estímulo diários;

ao colega patologista Dr. Diego de Mendonça Uchoa que realizou as microfotografias;

aos funcionários do Serviço de Patologia do HCPA, principalmente dos setores de secretaria, processamento de material e preparo de lâminas, em especial à funcionária Elhane Gomes, pela competência e tempo extra dispendidos nestas tarefas;

à estatística Vânia Naomi Hirakata do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA, pela orientação nesta área do conhecimento;

ao Prof. Dr. Jarbas de Oliveira, bioquímico do HCPA, pelo auxílio no processo da dosagem plasmática da cafeína;

à bibliotecária Mônica Nodari, pela revisão das referências bibliográficas e sua normatização;

à professora Rosângela Benati, pela revisão final do português;

à Dra Adriana Mikich e ao Dr. Luis Fernando Moreira, pela tradução do artigo para o inglês;

às secretárias do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica: Helena Beatriz Silva da Costa, Débora Fraga de Campos Velho e Leticia Konrath, pela compreensão e auxílio durante o curso;

ao Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica e seus Professores, pelos ensinamentos e pela oportunidade de aprofundar-me na busca do conhecimento científico;

ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, minha segunda casa, que permitiu o uso de seus serviços e funcionários de forma direta e indireta na realização desta pesquisa;

à Fundação Estadual de Proteção e Pesquisa em Saúde, pela disponibilização do biotério e dos animais utilizados nesta pesquisa;

à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, marco inicial desta caminhada na busca do aperfeiçoamento científico aplicado à humanidade;

à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior, que forneceu auxílio financeiro para este bolsista;

aos duzentos e quarenta camundongos que de forma anônima e silenciosa permitiram a realização desta pesquisa.



SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	11
INTRODUÇÃO.....	12
REVISÃO DA LITERATURA.....	15
Carcinoma Epidermóide do Esôfago – CEE –.....	15
Compostos N-nitrosos (Dietilnitrosamina - DEN -).....	21
Carcinogênese esofágica experimental.....	23
Cafeína.....	26
Cafeína e carcinogênese.....	29
OBJETIVOS.....	32
Geral.....	32
Específicos.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	33
ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS.....	42
Resumo.....	42
Introdução.....	44
Material e Métodos.....	46
Resultados.....	55
Discussão.....	62
Conclusão.....	69
Referências Bibliográficas.....	70
VERSÃO DO ARTIGO EM INGLÊS	76

ANEXOS.....	106
1. Formulário com o volume das soluções ingeridas por semana.....	106
2. Formulário para coleta de dados do peso dos animais.....	107
3. Volume (ml) das soluções ingeridas de 2ª a 4ª feira.....	108
4. Volume (ml) das soluções ingeridas de 5ª a domingo.....	109
5. Fórmula da ração consumida pelos camundongos.....	110
6. Formulário para coleta de dados da avaliação macroscópica.....	111
7. Formulário para coleta de dados do exame microscópico.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

CEE:	Carcinoma epidermóide do esôfago
DEN :	Dietilnitrosamina
IARC :	International Agency for Research on Cancer
HPV :	Papiloma vírus humano
DNA :	Ácido desoxirribonucleico
NATE :	Nitrosaminas tabaco-específicas
EMIT :	Enzyme multiplied immunoassay technique
FEPPS :	Fundação Estadual de Proteção e Pesquisa em Saúde
DMAE :	Departamento Municipal de Água e Esgotos
G1 G2	Grupos 1, 2 , 3 , 4 e 5
Temp	Tempo
IT	Índice Tumoral
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	Hematoxilina Eosina

LISTA DE TABELAS

TABELA A - Concentração de cafeína em algumas bebidas	26
TABELA 1 - Soluções ingeridas pelos diferentes grupos durante a semana	47
TABELA 2 - Peso médio por camundongo em gramas durante o experimento	50
TABELA 3 - Média da concentração de cafeína (ug/ml) no plasma dos camundongos	51
TABELA 4 - Média do volume (ml) de solução ingerida por camundongo conforme o período semanal, durante as 25 semanas do experimento	56
TABELA 5 - Resultados do exame microscópico do esôfago dos animais dos grupos: G1, G2 e G3, em relação a presença de neoplasia	57
TABELA 6 - Resultados do exame microscópico do esôfago em cada grupo	58
GRADE 1 - Soluções consumidas por cada grupo	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fotografia da dissecação do esôfago do camundongo	59
FIGURA 2 - Macrofotografia do esôfago normal do camundongo	59
FIGURA 3 - Macrofotografia do esôfago de animal do grupo G2. Observa-se lesão vegetante parcialmente corada com azul de toluidina	60
FIGURA 4 - Microfotografia da parede esofágica normal de animal do grupo G5. Observam-se as camadas: mucosa (m), submucosa (sm), muscular da mucosa (mm) e muscular própria (mp). HE 250 x	60
FIGURA 5 - Microfotografia do esôfago de animal do grupo G2. Observa-se lesão intraepitelial escamosa (L) abaulando a membrana basal (mb). HE 100 x	61
FIGURA 6 - Microfotografia do esôfago de animal do grupo G3. Observa-se invasão neoplásica de células escamosas atípicas na submucosa (setas). HE 250 x	61

INTRODUÇÃO

O Carcinoma epidermóide do esôfago (CEE) é neoplasia com alta taxa de mortalidade e distribuição geográfica peculiar (6). A etiologia do CEE está comprovadamente ligada ao uso do tabaco e do álcool. Outros fatores etiológicos têm sido implicados e estudados: chás em temperaturas elevadas, ervas com carcinógenos e principalmente compostos N-nitrososos (124).

A partir do experimento de Duckrey et al. (27), que demonstrou o aparecimento de carcinoma esofágico em ratos que receberam N-metil-N-nitrosoaniline e, mais tarde, quando o mesmo autor observou que de 65 nitrosocompostos testados, 20 induziram tumores epiteliais no esôfago de ratos, as nitrosaminas foram reconhecidas como os carcinógenos mais importantes para indução de câncer do esôfago. Acredita-se que estes compostos nitrosos atuem na bioquímica e na genética celular, alterando o DNA de maneira a impedir a reparação e replicação corretas. A partir destas alterações celulares surgem as lesões pré-malignas e, mais tarde, o carcinoma escamoso (75).

Em nosso meio, a carcinogênese esofágica foi estudada por Kruel (59), em experimento no qual induziu CEE em camundongos, após administrar dietilnitrosamina – DEN – diluída na água de beber dos animais por um período de 180 dias. No estudo histo e citopatológico das alterações da mucosa esofágica destes animais observou desde esofagite até carcinoma. A partir destes resultados houve a proposição de uma classificação citopatológica para as lesões precursoras do CEE e uma definição metodológica clara para a indução de carcinogênese esofágica experimental. O autor utilizou, para comprovação macroscópica, o índice tumoral de Rubio et al. (96) que consiste na proporção do número de tumores observados em relação ao tamanho do esôfago em centímetros.

A associação entre a ingestão de café e aparecimento de neoplasia foi primeiramente descrita há mais de 20 anos, sendo sugerida uma correlação entre ingestão de altas doses de café e neoplasia do trato urinário (125).

Existe um grande impasse em relação à ação promotora ou protetora do café e da cafeína especificamente na carcinogênese de um modo geral. A ação desta substância parece ser dose dependente, e foram publicados vários trabalhos de expressão à respeito, porém com resultados divergentes (30,110).

Resultados mais consistentes publicados em uma extensa revisão por Nehlig et al. (81), relatam a ação mutagênica do café e da cafeína em relação a bactérias e fungos. Descreve, também, que a cafeína em altas concentrações tem efeito mutagênico para as células mamárias, porém este efeito foi revertido "in vitro" quando associado à enzimas hepáticas. O café e a cafeína podem interagir com vários outros mutágenos e seus efeitos são sinérgicos com os Raios-X, luz ultravioleta e alguns agentes químicos. Em controvérsia, a cafeína pode inibir o efeito mutagênico, dependendo do momento da sua administração em relação ao agente químico estudado (81). A administração oral de chá verde ou preto com cafeína apresentou importante efeito inibitório sobre a carcinogênese na pele de camundongos induzida por luz ultravioleta (50)

Vários trabalhos experimentais foram analisados pelo grupo do IARC (52), abordando estudos com a cafeína em animais de experimentação. O maior número destas experiências estudou o possível efeito protetor ou promotor desta substância quanto à carcinogênese do sistema urinário, pâncreas, fígado, mama e pulmões, associada ou não a conhecidos agentes carcinógenos. Não estão relatados trabalhos estudando especificamente a ação do café ou da cafeína sobre a mucosa esofágica. Nishikawa et al. (83) relatou efeito inibitório da cafeína na promoção de tumores gástricos induzidos por N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine e cloreto de sódio.

A estimativa do consumo de cafeína por habitante nos diversos países demonstra uma variação importante: no EUA o consumo “per capita” é de 211 mg/dia, na Inglaterra é de 444 mg/dia, somando-se a cafeína ingerida no café, chás, refrigerantes e outros alimentos com a droga. O consumo de cafeína “per capita” no mundo está aumentando gradativamente (52).

No presente trabalho experimental estudou-se o efeito da cafeína na carcinogênese esofágica, utilizando-se um modelo experimental conhecido de esofagocarcinogênese em camundongos desenvolvido por Kruel (59). Avaliou-se qual o efeito da cafeína na carcinogênese esofágica induzida por dietilnitrosaminas, e qual a ação da cafeína diluída na água de beber e ingerida isoladamente sobre a mucosa esofágica destes animais.

REVISÃO DA LITERATURA

CARCINOMA EPIDERMÓIDE DO ESÔFAGO – CEE -

O câncer do esôfago é doença conhecida há mais de dois mil anos. Naquela época relatos em documentos como o “Smith Surgical Papyrus” do Egito descreviam os sinais e sintomas da disfagia progressiva. Autores chineses também relatavam a gravidade, o sofrimento dos pacientes e a evolução fatal desta patologia (13, 132).

A neoplasia de esôfago é a quarta em mortalidade no Brasil e o Rio Grande do Sul ocupa o primeiro lugar no país e o quinto no mundo em mortalidade por câncer do esôfago, perdendo apenas para regiões da China, Irã, do norte da França e da África do Sul. Neste Estado a incidência é de 17 casos por 100.000 habitantes/ano, com aproximadamente 800 novos pacientes a cada ano, oriundos de várias microrregiões localizadas principalmente ao sul do estado (6, 89, 124). No Rio Grande do Sul foram encontrados coeficientes de mortalidade muito diferentes nas 24 microrregiões, com variações de até 4 vezes. A neoplasia ocorre predominantemente em homens, é rara na juventude aumentando sua incidência com a idade, com pico entre 50 e 70 anos, sugerindo como causa a exposição prolongada a agentes carcinógenos do ambiente externo (87, 69). Os altos coeficientes de mortalidade apresentados enfatizam a importância de fatores externos e demonstram a necessidade de pesquisas que permitam a identificação dos fatores envolvidos na gênese do câncer do esôfago, para que medidas primárias preventivas possam ser adotadas (5, 89).

Apesar de todo o progresso técnico em relação ao diagnóstico, estadiamento e tratamento desta neoplasia, os índices de morbidade e mortalidade permanecem elevados. A maioria dos pacientes do hemisfério ocidental – 75% - apresentam tumores avançados no momento do diagnóstico (105, 59). O prognóstico destes doentes é ruim

com sobrevida média em cinco anos inferior a 2,4% (90). No Japão e na China, programas de rastreamento para diagnóstico precoce do carcinoma do esôfago, elevaram as taxas de sobrevida para 60 a 95% em cinco anos, após tratamento cirúrgico dos pacientes com doença em fase inicial (1). O preciso estadiamento clínico da doença é muito importante para determinar se o tratamento proposto será paliativo ou curativo, evitando-se expor o paciente a riscos desnecessários em operações ineficazes de grande porte e alto custo. Além do estadiamento clínico, a avaliação do risco cirúrgico é obrigatória em todos os pacientes (105, 37).

O carcinoma epidermóide do esôfago – CEE – é o tipo histológico responsável por mais de 95% dos casos em seres humanos. O crescimento do tumor é lento sendo necessários entre 3 a 4 anos para evolução de carcinoma “in situ” para câncer avançado (16, 40, 91). A disfagia e a perda de peso são as principais manifestações clínicas deste tumor. A disfagia está presente quando mais de 60% da circunferência do órgão estiver comprometida pelo tumor, e o lúmen for menor que 10 a 12 milímetros de diâmetro (94). O adenocarcinoma originado em áreas com epitélio de Barrett predomina entre as outras neoplasias malignas do órgão.

As relações anatômicas do esôfago com órgãos vitais na região cervical, torácica e abdominal explicam a elevada freqüência de tumores irresssecáveis devido à invasão de órgãos vizinhos por crescimento local. A drenagem linfática esofágica inclui uma rede extensa de vasos com orientação longitudinal e múltiplas conexões transversas o que facilita a disseminação da doença por esta via, e contribui para a dificuldade de uma abordagem terapêutica eficaz (105).

O prognóstico do CEE varia conforme o grau de invasão da neoplasia na parede do órgão. A invasão da submucosa apresenta taxa de sobrevida em cinco anos de 46,1% que decresce progressivamente com o comprometimento das camadas mais profundas:

muscular própria 29,5%, adventícia 21,7% e estruturas vizinhas 7%. Nos pacientes com metástases à distância a sobrevida cai para 3% (78).

A desenvolvimento do CEE está comprovadamente ligada ao uso do álcool e do tabaco. Estes fatores de risco demonstram uma relação causal bem definida quando analisados isoladamente e, quando associados, aumentam 6,1 vezes o risco relativo de desenvolver a doença em comparação com a população em geral (124, 25, 23, 130, 121). No sul do Brasil, especialmente no Rio Grande do Sul, o hábito do chimarrão deglutido em altas temperaturas – acima de 70 graus centígrados - foi citado como possível fator etiológico por Victora et al. (124) em estudo epidemiológico. Na verdade acredita-se que o modo pelo qual o chimarrão contribui no desenvolvimento do CEE, depende das lesões térmicas causadas na mucosa esofageana, facilitando a ação das substâncias carcinógenas (6). Outros fatores como a dieta pobre em proteínas animais e vitaminas têm sido citados como responsáveis pelo aumento do risco do carcinoma esofágico (135, 122, 20). Nas regiões do norte da China, a deficiência de zinco no solo está implicada como causa da alta incidência da neoplasia. No Irã, o hábito de lamber os recipientes vazios que continham ópio e, na ilha de Curaçao, a ingestão de chás com ervas que contêm carcinógenos são responsáveis pela alta incidência da doença (53). Estes dados esclarecem a característica epidemiológica do CEE, com áreas de alto índice de mortalidade próximas geograficamente de outras de baixo índice. A incidência mundial de câncer do esôfago varia muito: 7,4/100.000 hab./ano na Inglaterra (90); 150/100.000 hab./ano na província de Gonbad, no Irã; 150/100.000 hab./ano em Henan, na China; 63/100.000 hab./ano na região do Transkei, na África do Sul, curiosamente no mesmo paralelo do estado do Rio Grande do Sul (126). Neste estado brasileiro a mortalidade é de 17/100.000 hab./ano na proporção de 3 homens para 1 mulher, representando a segunda neoplasia em freqüência nos homens e a oitava em mulheres (88, 124, 5).

A associação existente entre o CEE com tumores aerodigestivos é conhecida e tem sido reportada na literatura mundial, sendo o tabaco e o álcool fatores importantes na etiologia destes tumores (103, 53, 77). Além disso, fatores genéticos podem ter papel relevante, devido à associação de neoplasias do trato aerodigestivo superior com história familiar positiva para neoplasias de cabeça e pescoço e de esôfago (63, 21). A incidência de neoplasias associadas ao CEE numa casuística de 261 pacientes do grupo de cirurgia do esôfago e estômago do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) é de 7,28% sendo o carcinoma epidermóide o tipo histológico predominante da neoplasia associada (68,42%). O sítio mais freqüente é a árvore respiratória (53,8%), seguido da cavidade oral e orofaringe (23%) e laringe (23%). Este fato ressalta a importância do estadiamento criterioso dos pacientes com CEE devido à associação significativa com outras neoplasias, principalmente tumores aerodigestivos (106). Outros fatores predisponentes para o CEE são estenose crônica após ingestão de substâncias cáusticas, megaesôfago, síndrome de Plumer-Winson e tilose (105).

Entre outros fatores etiopatogênicos do carcinoma de células escamosas do esôfago tem sido relacionada ao papiloma vírus humano (HPV), sendo os tipos mais freqüentes o 16 e 18. O mecanismo de ação mais provável deste vírus seria a presença de oncoproteínas E6 e E7, que inativariam a ação de dois genes supressores Rb e p53, induzindo a multiplicação celular exagerada (8, 19).

O estudo de alterações genéticas na etiologia e patogênese do câncer do esôfago por Montesano et al. (76), procura associar mutações específicas a esta neoplasia. Observações experimentais em animais e humanos mostram que a neoplasia pode desenvolver-se secundariamente à alterações dos padrões moleculares caracterizadas por aquisições e acumulações de aberrações morfológicas e comportamentos celulares característicos. No câncer do esôfago, semelhante ao glioma maligno, os dados indicam uma alta prevalência de mutações no p53 e alelos do 17p (49, 67). Estes achados

sugerem que a mutação p53 é o primeiro evento na carcinogênese esofágica e que a proteína p53, resultante desta mutação, pode exercer um efeito dominante negativo suficiente para anular a função do alelo original.

Uma série de estudos tem analisado as mutações do p53 no câncer do esôfago. Entre 240 casos de CEE referidos na literatura, 110 (45,8%) apresentaram mutações confirmadas e identificadas na seqüência do DNA (82). A freqüência destas mutações varia entre as regiões geográficas, de 80% em áreas de alto risco como a Normandia (4) até 35% nas áreas de baixo risco da França (43, 44). Embora as mutações no p53 sejam mais freqüentes no códon 175 (8%), mutações nos codons 248, 273 e 270 também foram detectadas em 3 a 4% das vezes (45). As mutações no p53 resultam de processos endógenos ou de ataques de carcinógenos externos (35). A análise do espectro das mutações do p53 pode ajudar a identificar carcinógenos envolvidos na gênese do carcinoma do esôfago (45). O espectro de mutações do p53 no CEE é indicativo do envolvimento de carcinógenos externos, de acordo com os estudos epidemiológicos que acusam agentes etiológicos exógenos como o tabaco, componentes nutricionais e o álcool. A alta freqüência de mutações adenina para timina podem refletir o aumento da depuração do DNA por reações de carcinógenos com a adenina e/ou exposição do DNA à ação de agentes como o acetaldeído, um metabólito do etanol (76).

O tabaco e o álcool têm sido identificados como os principais fatores etiológicos no CEE em muitas regiões do mundo. Barros (6) estudou pacientes masculinos, acima de 30 anos, consumidores de bebidas alcoólicas (mais de 80 gramas por dia), fumantes (20 cigarros por dia por mais de 10 anos) e bebedores de chimarrão (mais de 500 mililitros por dia por mais de 10 anos), considerados de "maior risco" e comparou-os com pacientes de "menor risco". Encontrou uma elevada presença de esofagite crônica em vários graus, no primeiro grupo, sugerindo que a exposição intensa ao álcool, ao fumo e ao chimarrão contribuíram para esta diferença. A avaliação de 91 pacientes com carcinoma do esôfago

expostos ao fumo e/ou álcool demonstrou uma alta frequência de mutações no p53 revelando uma forte relação entre estes carcinógenos e o CEE (45, 38). Apenas 20% dos não-fumantes apresentaram mutações p53, comparados com 80% nos pacientes que fumavam mais de 20 cigarros por dia. Nos que fumavam menos de 20 cigarros/dia a frequência de mutações foi de 50%. Em relação ao consumo de álcool a frequência de mutações p53 foi de 51% quando o consumo de vinho foi de um litro/dia e 58% para bebedores de maiores quantidades de álcool. Contudo estes fatores de risco são difíceis de medir pois um grande número dos pacientes estavam expostos a ambos. Os dados referentes ao carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço são semelhantes (12).

Algumas evidências de suscetibilidade genética para o CEE foram estudadas em famílias de regiões de alta incidência na China: Yangcheng e Linxian (17, 48). Um destes estudos demonstrou caráter mendeliano autossômico recessivo em 4% da população examinada (17).

A tilose, que é uma doença hereditária que envolve hiperqueratose da palma das mãos e um risco aumentado para CEE, apresenta uma alteração no gen 17q 23-qter (123). O papel desta rara alteração genética para o câncer do esôfago deverá ser melhor determinado.

No CEE, a exposição simultânea ao tabaco e álcool parece ser o principal fator para a mutação no p53 (14). As mutações no p53 são frequentes e ocorrem cedo na progressão para a neoplasia, sugerindo que a proteína p53 tem papel fundamental na manutenção da homeostase da mucosa esofágica normal. As células que perdem a função supressora do p53 através da mutação do mesmo, estão aptas a proliferar com o DNA alterado podendo dar origem à populações de células precursoras de lesões neoplásicas (76). No CEE outras alterações genéticas estão presentes nas lesões displásicas e podem ser detectadas, como perda dos alelos 3q21.3 e 9q31 (71).

Alguns autores que revisaram os estudos sobre o p53, relatam que o exame de material celular obtido por punção com agulha, citologia esfoliativa, tecido fixado, pode ser utilizado para avaliação das alterações presentes no p53. A mutação do p53 é geralmente um evento pré-invasivo, dependendo do tipo de neoplasia, e pode ser utilizado como um biomarcador para algumas neoplasias (41).

Quanto aos valores prognósticos do CEE, vários parâmetros histopatológicos foram estudados em 138 pacientes, entre eles: o grau de queratinização, o polimorfismo nuclear, padrão de invasão, atividade mitótica e resposta inflamatória. Estudou-se o impacto prognóstico destes parâmetros através de análise uni e multivariadas. A conclusão dos autores foi que o padrão de invasão e a resposta inflamatória apresentam independentemente importância prognóstica (102).

COMPOSTOS N-NITROSOS (DIETILNITROSAMINAS - DEN -)

As nitrosaminas formam um grande grupo de carcinógenos químicos genotóxicos, que estão presentes na dieta humana, no meio ambiente e podem ser formados endogenamente pelo corpo humano. Os compostos nitrosos também são utilizados para induzir câncer em animais de experimentação. Existem aproximadamente 300 tipos diferentes de N-nitrosaminas carcinogênicas e 40 espécies de animais são sensíveis aos seus efeitos (42, 7). Trabalhos experimentais e alguns dados epidemiológicos sugerem que estas substâncias são fatores de risco para neoplasias de esôfago, estômago e nasofaringe (119, 26, 133). Após o desenvolvimento de um detector altamente específico e sensível para as nitrosaminas por Fine et al. em 1975 (29), foi logo estabelecida qual a exposição humana a estes carcinógenos, que estão presentes nos gêneros alimentícios (31, 46, 47, 118). Embora existam centenas de compostos N-nitrosos carcinogênicos, a

maioria dos experimentos tem sido realizada com a dimetil e a dietilnitrosaminas, e mais recentemente as nitrosaminas tabaco específicas (NATE): nitrosonornicotina e 4-metilnitrosamina-1-3-piridil-1-butanone (74).

A formação de compostos N-nitrosos nos alimentos é obtida através de complexo processo químico de nitrosação das aminas, que pode ocorrer sob várias condições de pH e temperatura. Este processo ocorre através da formação de óxidos de nitrogênio durante o beneficiamento, a preservação e preparação dos alimentos. As duas principais fontes de óxidos de nitrogênio resultam da adição de nitratos ou nitritos aos alimentos e o cozimento ou defumação destes alimentos na combustão de gases nos quais o nitrogênio molecular é oxidado. A reação de nitrosação pode ser influenciada pela presença de inibidores como a vitamina E, o ascorbato e catalisada por íons metálicos, compostos carbonil e ânions como Cl, I (18, 131). A nitrosação endógena pode ser intra ou extragástrica e depende da ingestão de dieta com nitrosaminas (62). Os gêneros alimentícios freqüentemente contaminados com compostos N-nitrosos são classificados em vários grupos: alimentos preservados com a adição de nitratos e nitritos como carnes e queijos (peixes e carnes defumadas), "pickle" e alimentos preservados com sal, alimentos preservados em condições úmidas que favoreçam a contaminação por fungos, entre outros (109, 107). Na China, a concentração de nitrosaminas voláteis nos alimentos da dieta habitual é consideravelmente maior que nos alimentos consumidos diariamente nos países ocidentais (108). Estudos epidemiológicos de caso-controles concluem que a exposição a dietas com nitrosaminas são importantes fatores de risco para câncer do esôfago, estômago e nasofaringe (119).

A ação carcinogênica dos compostos N-nitrosos é conseqüente à capacidade de alquilação do DNA celular em alguns sítios nucleofílicos, basicamente por doação de radicais etil e metil, efeito reconhecido como mutagênico (65). As nitrosaminas necessitam ser ativadas pela isoenzima P450, encontrada nas células hepáticas e

epiteliais, para formação do metabólito ativo final capaz de se ligar ao DNA e iniciar o processo carcinogênico (127).

A dietilnitrosamina (DEN) é uma nitrosamina de peso molecular 102,1, constituída de um radical nitroso ligado a quatro átomos de carbono e dez de hidrogênio ($C_4H_{10}N_2O$). Trata-se de um carcinógeno completo, que induz e promove neoplasias do tipo epitelial em várias espécies de animais, com preferência pelo sistema respiratório, digestivo alto, fígado e rins (51).

CARCINOGENESE ESOFÁGICA EXPERIMENTAL

Os tumores induzidos por compostos N-nitrosos em animais de experimentação apresentam propriedades morfológicas semelhantes as neoplasias encontradas nos órgãos correspondentes de humanos (27). Os resultados de vários estudos "in vitro" sugerem que as nitrosaminas exibem atividade biológica similar em tecidos animais e humanos (74).

O processo de carcinogênese no epitélio do esôfago passa por vários estágios envolvendo gerações sucessivas de células, até alcançar o fenótipo maligno. O primeiro estágio é a iniciação, quando ocorre alteração irreversível do genoma das células alvo que podem expressar o desenvolvimento da neoplasia. Estas alterações são constituídas de uma ou mais mutações simples, transversões, transições e ou deleções. Neste estágio de iniciação as células ainda não apresentam fenótipo tumoral e, portanto, não podem ser identificadas diretamente (86). O próximo estágio é o da promoção, quando as alterações ocorrem na expressão do genoma e são mediadas por interações entre agentes químicos promotores e moléculas receptoras que interagem ou se ligam a regiões específicas do DNA, o que produz as alterações de expressão. O último estágio, o da progressão, é

irreversível, caracterizando-se por instabilidade cariotípica e expansão tumoral, originando o fenótipo neoplásico (85, 72, 28).

As N-nitrosaminas são estáveis e necessitam de ativação metabólica pelo citocromo P450, que são enzimas celulares presentes no retículo endoplasmático e mitocôndrias. Esta ativação metabólica ocorre através da hidroxilação do carbono adjacente ao grupo N-nitroso produzindo uma alfa hidroxinitrosamina. As nitrosaminas e seus compostos são quimicamente ativos sob pH fisiológico e decompõem-se para formar alquildiazohidróxidos passo intermediário na produção do íon alquildiazônio, o carcinógeno final que irá reagir nos sítios nucleofílicos dos constituintes celulares. A reação de alquilação do DNA celular é o alvo inicial para a carcinogênese (119).

Algumas nitrosaminas apresentam organotropismo específico na dependência de sua estrutura química. Apesar de ingeridas via oral e formadas no estômago ou outro sítio qualquer do trato gastrointestinal, não implica que este seja o local da neoplasia (27). Observou-se a presença de citocromo P450 nas células da mucosa esofágica, o que pode ser muito importante em termos de toxicidade local. A ingestão simultânea de álcool pode estimular a replicação de células displásicas na mucosa do esôfago por competir com as nitrosaminas pelo metabolismo hepático, o que facilita a circulação e ativação destas pelo sistema citocromo P450 da célula epitelial esofágica (134, 99).

Vários estudos experimentais de dose-resposta referidos na literatura como o de Lijinsky et al. (64), demonstraram o potencial carcinogênico da dietilnitrosamina diluída na água de beber de ratos, os quais desenvolveram neoplasia de esôfago e, em doses maiores, carcinoma hepático. Um estudo com 4080 ratos testou 16 diferentes dosagens de dimetil e dietilnitrosaminas e obteve tumores principalmente no esôfago e fígado. Observou-se que a incidência de tumores é proporcionalmente dose e tempo-dependente (68).

A dietilnitrosamina (DEN) diluída na água de beber na dosagem de 40 mg/l foi utilizada em modelo experimental de carcinogênese em camundongos por Rubio et al. (95). Recentemente Kruel (59) demonstrou a efetividade deste modelo experimental para câncer de esôfago em camundongos e Sallet (101) para ratos da raça Wistar. Vários modelos animais foram testados além de roedores, Pessini (84) demonstrou carcinogênese esofágica com DEN em frangos.

A análise microscópica destes esôfagos submetidos à ação da DEN demonstra vários tipos de alterações celulares desde a esofagite até o carcinoma invasor. As displasias são classificadas em baixo grau quando apresentam hiperplasia celular basal e polimorfismo nuclear, e alto grau na presença de polimorfismo nuclear intenso e acentuado hiperchromatismo em níveis mais elevados dentro do epitélio. O carcinoma "in situ", apresenta alterações similares a displasia de alto grau, com as mesmas protusões estromais do epitélio, porém sem maturação citoplasmática das células superficiais (98). O carcinoma invasor atinge além da lâmina própria e pode ser dividido em microinvasivo (a lesão chega na muscular da mucosa), submucoso (invade a submucosa), ou avançado (além da muscular própria) (97).

Os modelos experimentais oferecem a oportunidade para o estudo sistemático e compreensivo da morfogênese tumoral do esôfago e da sua etiopatogenia, além de serem facilmente reproduzíveis, permitindo o progresso das pesquisas nesta área do conhecimento (59).

CAFEÍNA

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina, $C_8H_{10}N_4O_2$) é uma substância exógena presente em várias plantas amplamente distribuídas geograficamente. Sua obtenção a partir de grãos de café foi descrita em 1820, a sua estrutura definida em 1875, e sua síntese realizada em 1895 (11). Vários sinônimos da cafeína são conhecidos: cafeína anidra, guaranina, metilteobromina, metilteofilina, teína, entre outros. Trata-se de um pó branco inodoro, com gosto amargo, densidade de 1.23, e solubilidade na água de 1 grama em 46 ml na temperatura de 20 graus Celcius (52).

Vários alimentos, principalmente bebidas, consumidos diariamente contêm quantidades variáveis de cafeína (Tabela A).

TABELA A – Concentração de cafeína em algumas bebidas

Bebida	Quantidade de cafeína (mg/180ml)
Chá	40 – 100
Café passado	100 – 150
Café instantâneo	60 – 180
Café descafeinado	1 – 6
Refrigerante tipo cola	17 – 55

Fonte: Hand Book of Pediatric Drug Therapy, 1990.

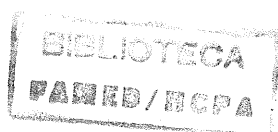
Outros autores entre os quais Lamarine et al. (61), apresentam dados bastante semelhantes aos da tabela A. Aproximadamente 80 a 90% da cafeína extraída dos grãos de café verdes é usada na indústria de bebidas e na indústria farmacêutica. A principal

fonte de cafeína é o café, com duas espécies mais consumidas: arábica e robusta. A espécie robusta tem maior porcentagem de cafeína seca com 2,2%/kg, enquanto a arábica apresenta 1,2%/kg (81). Mais de 60 espécies de plantas conhecidas no mundo contêm cafeína, entre elas a "Ilex paraguariensis". As folhas desta planta são utilizadas no preparo do mate (chimarrão) nas regiões sul do Brasil e da América do Sul, e apresentam níveis importantes de cafeína. No mate, a quantidade de cafeína varia de 0,9 a 2,2% na dependência da idade da folha da planta (34).

A cafeína é considerada, junto com o tabaco, uma das substâncias psicoativas mais consumidas no mundo (58). O efeito estimulante sobre o sistema nervoso central, manifestado pela capacidade de manter esforço intelectual e avaliação de idéias mais perfeita é provavelmente o que torna seu uso tão popular. O aumento progressivo da dose ingerida causa ansiedade, inquietude, insônia, hiperestesia, podendo progredir para convulsões focais e generalizadas (22). O estudo de Grossarth-Maticek et al. (36) relata que os bebedores de café têm uma baixa incidência de câncer e uma alta incidência de doença coronariana.

As estimativas do consumo "per capita" de cafeína por dia no mundo é de 70 mg/dia. A quantidade consumida varia muito conforme o país: Estados Unidos da América do Norte, 211 mg/dia; Canadá, 238 mg/dia; Suécia, 425 mg/dia; e Inglaterra, 444 mg/dia. Considerando-se que um adulto pesa em média 70 kg, observamos que este consumo é de 3 mg/kg/dia nos Estados Unidos e aumenta para mais de 6 mg/kg/dia na Inglaterra. A tendência atual é de aumento progressivo no consumo diário de cafeína, devido à ingestão crescente de alimentos que contêm cafeína, principalmente chocolates e refrigerantes (33).

No homem, a absorção gastrointestinal da cafeína é rápida e completa e a biodisponibilidade absoluta. Após a administração via oral concentrações plasmáticas máximas são atingidas em uma hora. Vários fatores podem afetar a farmacocinética da



caféina e, entre eles, o tabagismo, fenobarbital, omeprazole, fenitoína, álcool e acetaminofen (3, 32).

Estudos experimentais com animais demonstram que a caféina é rápida e completamente absorvida e distribuída pelo sistema gastrointestinal e está presente em todos os tecidos em 5 minutos. A fração da droga no plasma ligada à albumina varia de 10 a 30% e é excretada, após metabolização hepática, por via renal. A meia vida em camundongos e ratos é de 0,7 a 1 hora, com limite na capacidade de absorção e metabolização de 10 – 25 mg/kg/dia (10).

O metabolismo da caféina em humanos é quase que exclusivamente hepático (97%) pelas enzimas microssomiais do sistema citocromo P-450. Estas enzimas são responsáveis pela demetilação da caféina, que é um dos principais passos da sua metabolização. Além da demetilação, ocorre a 8-hidroilação para formar 1-3-7 trimetilurato. A enzima CYP1A2 metaboliza a caféina em paraxantina e é a rota predominante da demetilação (9). Nos roedores, entre eles os camundongos, a metabolização é muito semelhante a dos humanos com a formação de dimetilxantinas e derivados uracil. Em ratos a demetilação hepática da droga mostra um declínio com a idade (2).

A toxicidade da caféina é dose dependente podendo levar à convulsões e morte em intoxicações agudas. São descritas síndromes clínicas de abstinência da droga, com diminuição da atividade locomotora, alterações do padrão do sono, diminuição da concentração, ansiedade, irritabilidade, depressão, cefaléia, vômitos, entre outras (112).

A dosagem tóxica via oral para camundongos é de 127 mg/kg (114). Alguns efeitos sobre a reprodução e dosagem de hormônios femininos em animais do sexo feminino foram relatados. Richardson et al. (92) descreve efeitos teratogênicos, toxicidade pré-natal e alterações genéticas com modificações na estrutura e na síntese do DNA de roedores.

A dosagem plasmática da cafeína pode ser realizada através de diversas técnicas. O método mais aplicado atualmente, pois tem menor custo e facilidade de execução em laboratórios que disponham de espectrofotômetro para leitura dos resultados, é o ensaio imunoenzimático (EMIT – enzyme multiplied immunoassay technique) (136, 66).

CAFEÍNA E CARCINOGENESE

A cafeína consumida em quantidades moderadas não tem praticamente nenhum efeito deletério na saúde ou como promotor de doenças. Muitos aspectos biomédicos desta droga ainda não foram explicados e, portanto, não há objeções quanto ao consumo equilibrado da mesma (113).

Vários trabalhos experimentais em animais estudaram os possíveis efeitos da cafeína associada à drogas conhecidamente carcinogênicas, apresentaram deficiências metodológicas e técnicas para chegar a uma conclusão fidedigna (52).

Nakanishi et al. (79, 80) e Kunze et al. (60) estudaram a ação da cafeína administrada na água de beber associada ao carcinógeno N-nitroso-N-butil sobre a bexiga urinária de ratos e não observaram qualquer efeito. Trabalhos semelhantes abordaram o papel da cafeína em neoplasia mamária de ratas, induzida com dimetilbenzantraceno. Welsch et al. (128, 129) não observou qualquer efeito da cafeína, porém Minton et al. (73) relata diminuição do período de latência e aumento do número de tumores mamários por animal. Brune et al. (15) obteve aumento no número de neoplasias gástricas em ratos, quando associou a cafeína com benzopireno, porém na análise deste experimento observam-se rotas diferentes entre os animais tratados e os controles. Denda et al. (24) observou diminuição da quantidade de nódulos pancreáticos quando a cafeína foi administrada após o agente carcinogênico (4-hidroxi-aminoquinolina-1-óxido). A cafeína

administrada em associação com a droga carcinógena uretane resultou na diminuição da incidência de tumores de pulmão em ratos (116). Outro trabalho experimental recente com ratas apresenta resultados contrários da cafeína, na carcinogênese induzida pelos antioxidantes naturais alfa-tocoferol e n-tritriacontane-16-18-dione no 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-b]piridine em glândula mamária e cólon. O resultado indica que a cafeína exerce potente efeito químio-preventivo na mama, mas age como um co-carcinógeno no cólon (39). Estudo experimental com ratos empregando novos compostos N-nitroso como: mononitrosocafeidine e dinitrosocafeidine, presentes em um chá muito consumido em Kashmir, demonstraram um definido aumento de tumores malignos em distintos órgãos do tubo digestivo. Este fato explica a alta incidência de câncer gastrointestinal nesta região da Índia (56).

Os efeitos da cafeína sobre o metabolismo, estrutura e função do DNA são vários e listados por Roberts et al. (93). Entre os mais importantes podemos citar: indução de mitoses prematuras, inibição da excisão de bases danificadas, reversão da depressão na síntese do DNA induzida por agentes específicos e diminuição nos sítios de replicação.

Estudo epidemiológico tipo coorte com 10.064 participantes, avaliando o efeito da cafeína na hipertensão e a mortalidade por câncer em qualquer órgão, não demonstrou associação da droga com neoplasia (70).

Vários estudos caso-controlado sobre os possíveis efeitos da cafeína na neoplasia de mama em mulheres, não evidenciaram associação. Em mulheres pré-menopáusicas, observou-se um discreto aumento no risco para câncer de mama, porém este risco está abaixo de um (104, 55). Um trabalho realizado na Itália, no período de 1983 a 1994, com 5.984 mulheres abaixo dos 75 anos com câncer de mama confirmado histologicamente e 5.504 controles, exclui a possibilidade de associação entre a ingestão de café e o aumento no risco de câncer de mama (115).

Outro estudo caso-controle, realizado na Dinamarca por Jensen et al. (57), encontrou uma fraca associação do consumo de cafeína em chás e café e carcinoma da bexiga urinária, mesmo após o ajuste para a idade, tabaco e outras bebidas.

A cafeína é definitivamente um agente mutagênico para bactérias e fungos, mas não é considerada mutagênica para humanos em doses normais. Esta droga exerce efeitos teratogênicos em humanos quando em dosagem elevada. As razões que justificariam a ausência de efeitos mutagênicos no homem, com doses habituais são: a rápida metabolização, notável efeito anti-mitóticos, diminuindo as chances de que células afetadas reproduzam-se com sucesso e, por último, o longo tempo de exposição da humanidade à cafeína, o que possibilitaria o desenvolvimento de tolerância aos efeitos mutagênicos (117).

O possível risco carcinogênico da cafeína em humanos é limitado, existindo a possibilidade de correlação entre o consumo de café e câncer de bexiga urinária e faltam evidências para relacionar a cafeína com a neoplasia de mama em mulheres. Existem, porém, algumas evidências da relação inversa entre o consumo de café e o câncer do intestino grosso. Quanto ao pâncreas e ovário não foram encontradas associações carcinogênicas conclusivas com a cafeína. Não há relatos de estudos para avaliar cafeína e carcinogênese esofágica (52, 114).

Novas linhas de pesquisa testando a cafeína como adjuvante no tratamento do câncer estão surgindo. Estudo japonês de Tsuchiya et al. (120) conclui que a cafeína potencializa a quimioterapia com cisplatina e doxorubicina e aumenta a ressecabilidade de sarcomas de tecidos moles (estágio II), como: histiocitoma maligno, sarcoma sinovial, lipossarcoma e schwannoma. Outra publicação de Sadzuka et al. (100) descreve que a cafeína modula e aumenta a ação antineoplásica da adriamicina.

OBJETIVOS

GERAL

- Avaliar o efeito da cafeína no esôfago de camundongos, num modelo experimental de esofagocarcinogênese induzida por dietilnitrosamina (DEN).

ESPECÍFICOS

- Identificar o efeito da ingestão de cafeína no índice de tumores esofágicos induzidos pela DEN em camundongos.
- Identificar o efeito da ingestão de cafeína em relação às lesões precursoras do carcinoma epidermóide do esôfago (CEE), induzidas pela DEN em camundongos.
- Identificar se o efeito da ingestão de cafeína no índice de tumores esofágicos induzidos pela DEN em camundongos é dose dependente.
- Identificar qual o efeito da cafeína, ingerida isoladamente, sobre a mucosa esofágica em camundongos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Akiyama H, Tsurumaru M, Udagawa H. Imaging techniques. In: Delarue NC, Eschapasse H, editors. International trends in general thoracic surgery. Saint Louis: Mosby; 1988. v.4, p.53-68.
2. Arnaud MJ. Comparative metabolic disposition of [1-Me¹⁴ C] caffeine in rats, mice, and chinese hamsters. *Drug Metab Dispos* 1985;13:471-8.
3. Arnaud MJ. The pharmacology of caffeine. *Prog Drug Res* 1987;31:273-313.
4. Audrezt MP, Robaszkiecwicz M, Mercier B, Nousbaun JB, Bail JP, Hardy E, et al. TP53 gene mutation profile in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 1993;53:5745-9.
5. Barcelos LB, Peccin DA. Incidência e mortalidade por câncer no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Saúde Pública* 1983;17:367-76.
6. Barros SGC. Detecção de lesões precursoras em indivíduos sob risco para o carcinoma epidermóide do esôfago: experiência com a histopatologia e a citopatologia da mucosa esofágica através de biópsias endoscópicas e do esfregaço pelo balão citológico chinês [tese]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1992.
7. Bartsch H, Ohshima H, Pignatelli B. Inhibitors of endogenous nitrosation. Mechanisms and implications in human cancer prevention. *Mutat Res* 1988;202:307-24.
8. Benamouzig R, Pigot F, Amiroga G, Nahidiri P, Chaussade S, Catalan F, et al. Human papillomavirus infection in esophageal squamous-cell carcinoma in Western Countries. *Int J Cancer* 1992;50:549-52.
9. Benet, LZ, Kroetz DL, Sheiner, LB. Pharmacokinetics – The dynamics of drug absorption, distribution, and elimination. In: Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 9th ed. New York: Mc Graw-Hill; 1996. p. 3-26.
10. Bonati M, Garatini S. Interspecies comparison of caffeine disposition. In: Dews PB, editor. Caffeine. Perspectives from recent research. Berlin: Springer; 1984. p.48-56.
11. Bonati M, Garattini S. Pharmacokinetics of caffeine. *ISI Atlas Sci*, 1988. p. 33-39.
12. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, et al. Association between cigaret smoking and mutation of the p53 gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995;332:712-7.
13. Brewer LA. Historical notes on surgery of the esophagus. In: Hill L, Kosarek R, McCallum R, Mercer CD, editors. The esophagus medical and surgical management. Philadelphia: Saunders; 1988. p. 1-15.
14. Brown LM, Silverman DT, Pottern LM, Schoenberg JB, Greenberg RS, Swanson, GM, et al. Adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction in white men in the United States: alcohol, tobacco, and socioeconomic factors. *Cancer Causes Control* 1994;5:333-40.

15. Brune H, Deutsch-Wenzel RP, Habs M, Ivankovic S, Schmähl D. Investigation of the tumorigenic response to benzo(a)pyrene in aqueous caffeine solution applied orally to Sprague-Dawley rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 1981;102:153-7.
16. Caletti GC, Ferrari A, Fiorino S, Bocus P, Barbara L. Staging of esophageal carcinoma by endoscopy. *Endoscopy* 1993;25:2-9.
17. Carter CL, Hu N, Wu M, Lin PZ, Murigande C, Bonney GE. Segregation analysis of esophageal cancer in 221 high-risk Chinese families. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:771-6.
18. Challis BC, Challis JA. N-Nitrosamines. In: Patai S, editor. *The chemistry of amines, nitroso, and N-nitrocompounds and their derivatives*. New York: Wiley; 1982. p. 1151-223.
19. Chang F, Syrjänen S, Shen O, Wang L, Syrjänen K. Screening for human papillomavirus infections in esophageal squamous cell carcinomas by in situ hybridization. *Cancer* 1993;72:2525-30.
20. Cheng KK, Day NE, Duffy SW, Law TH, Fok M, Wong J. Pickled vegetables in the aetiology of oesophageal cancer in Hong Kong Chinese. *Lancet* 1992;339:1314-8.
21. Coffin CM, Rich SS, Dehner LP. Family aggregation of nasopharyngeal carcinoma and other malignancies. *Cancer* 1991;68:1323-8.
22. Curatolo PW, Robertson D. The health consequences of caffeine. *Ann Intern Med* 1983;98:641-653.
23. De Jong UW, Breslow N, Hong JG, Sridharan M, Shanmugaratnam K. Aetiological factors in oesophageal cancer in Singapore Chinese. *Int J Cancer* 1974;13:191-203.
24. Denda A, Yokose Y, Emi Y, Murata Y, Ohara T, Sunagawa M, et al. Effects of caffeine on pancreatic tumorigenesis by 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in partially pancreatectomized rats. *Carcinogenesis* 1983;4:17-22.
25. DeStefani E, Muñoz N, Esteve J, Vassalo A, Victora C, Teuchmann S. Mate drinking, alcohol, tobacco, and esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Res* 1990;50:426-31.
26. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981;66:1192-308.
27. Druckrey H, Preussmann R, Ivankovic S, Schmähl D. Organotrope carcinogene Wirkung bei 65 verschiedenen N-nitroso-Verbindungen and BD-Ratten. *Z Krebsforsch* 1967;69:103-201.
28. Farber E. Cancer development and its natural history. A cancer prevention perspective. *Cancer* 1988;62:1676-9.
29. Fine DH, Lieb D, Rufeh F. Principle of operation of the thermal energy analyser (TEA) for the trace analysis of volatile and non-volatile N-nitroso compounds. *J Chromatogr* 1975;107:351-7.
30. Folsom AR, McKenzie Dr, Bisgard KM, Kushi LH, Sellers TA. No association between caffeine intake and postmenopausal breast cancer incidence in the Iowa Women's Health Study. *Am J Epidemiol* 1993;138:280-3.

31. Forman D. Dietary exposure to N-nitroso compounds and the risk of human cancer. *Cancer Surv* 1987;6:719-38.
32. Fuchs FD, Wannmacher L. Farmacocinética Clínica. In: *Farmacologia clínica. Fundamentos da terapêutica racional*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1992. p.43-9.
33. Gilbert RM. Caffeine consumption. In: Spiller GA, editor. *The methylxanthine beverages and foods: chemistry, consumption, and health effects*. New York: Alan Liss; 1984. p. 185-213.
34. Graham HN. Mate. In: Spiller GA, editor. *The methylxanthines beverages and foods: chemistry, consumption, and health effects*. New York: Alan Liss; 1984. p. 179-83.
35. Greenblatt MS, Bennett WT, Hollstein M, Harris CC. Mutation in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4855-78.
36. Grossarth-Maticcek R, Eysenck HJ. Coffee-drinking and personality as factors in the genesis of cancer and coronary heart disease. *Neuropsychobiology* 1990;23:153-9.
37. Gurski RR. Avaliação nutricional em pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1994.
38. Gurski RR. Avaliação da ação indutora da dietilnitrosamina e do efeito promotor do álcool etílico e da n-nitrosomonocotina na carcinogênese esofágica experimental em camundongos [tese]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1999.
39. Hagiwara A, Boonyaphiphat P, Tanaka H, Kawabe M, Tamano S, Kaneko H, et al. Organ-dependent modifying effects of caffeine, and two naturally occurring antioxidants alpha-tocopherol and n-tritriacontane-16,18-dione, on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced mammary and colonic carcinogenesis in female F344 rats. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:399-405.
40. Halvorsen RA Jr, Thompson WM. Computed tomography staging of gastrointestinal tract malignancies. Part I: Esophageal and stomach. *Invest Radiol* 1989;22:2-16.
41. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. *N Engl J Med* 1993;329:1318-27.
42. Hecht SS. Approaches to cancer prevention based on understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;216:181-91.
43. Hollstein MC, Metcalf RA, Welsh JA, Montesano R, Harris CC. Frequent mutation of the p53 gene in human esophageal cancer. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:9958-61.
44. Hollstein MC, Peri L, Mandard AM, Welsh JA, Montesano R, Metcalf RA, et al. Genetic analysis of human esophageal tumors from two high incidence geographic

areas: frequent p53 base substitutions and absence of ras mutations. *Cancer Res* 1991;51:4102-6.

45. Hollstein M, Shormer B, Greenblatt M, Soussi T, Hovig E, Montesano R, et al. Somatic point mutation in the p53 gene of human tumors and cell lines: update compilation. *Nucleic Acids Res* 1996;24:141-6.

46. Hotchkiss JH. A review of current literature on N-nitroso compounds. *Adv Food Nutr Res* 1987;31:53-115.

47. Hotchkiss JH. Preformed N-nitroso compounds in foods and beverage. In: Forman D, Shuker D, editors. Nitrate, nitrite, and Nitroso compounds in human cancer. *Cancer Surv*, 1989;8:295-321.

48. Hu N, Dawsey SM, Wu M, Bonney GE, He LJ, Han XY, et al. Familial aggregation of oesophageal cancer in Yangcheng County, Shanxi Province, China. *Int J Epidemiol* 1992;21:877-82.

49. Huang Y, Meltzer SJ, Yin J, Tong Y, Chang EH, Srivastava S, et al. Altered messenger RNA and unique mutational profiles of p53 and Rh in human esophageal carcinomas. *Cancer Res* 1993;53:1889-94.

50. Huang MT, Xie JG, Wang ZY, Ho CT, Lou YR, Wang CX. Effects of tea, decaffeinated tea, and caffeine on UVB light-induced complete carcinogenesis in SKH-1 mice: demonstration of caffeine as a biologically important constituent of tea. *Cancer Res* 1997;57:2623-9.

51. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some n-nitroso compounds. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Chem Man* 1978;17:1-365.

52. IARC Working Group. Coffee, tea, mate, methylxanthines and methylglyoxal. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1991;51:291-390.

53. IARC Working Group. IARC monographs on the of carcinogenic risks to humans. Alcohol drinking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1988;44:112-351.

54. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *N Engl J Med* 1997;336:309-16.

55. Iscovich JM, Iscovich RB, Howe G, Shiboski S, Kaldor JM. A case-control study of diet and breast cancer in Argentina. *Int J Cancer* 1989;44:770-6.

56. Ivankovic S, Seibel J, Komitowski D, Spiegelhalder B, Preussmann R, Siddiqi M. Caffeine-derived N-nitroso compounds. V. Carcinogenicity of mononitrosocaffeidine in bd-ix rats. *Carcinogenesis* 1998;19:933-7.

57. Jensen OM, Wahrendorf J, Knudsen JB, Sorensen BL. The Copenhagen case-control study of bladder cancer. II. Effect of coffee and beverages. *Int J Cancer* 1986;37:651-7.

58. Kaplan HI, Sadock BJ. Transtornos mentais pelo uso de substâncias psicoativas. In: *Compêndio de psiquiatria clínica*. 6 ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1993. p. 335-7.

59. Kruehl CDP. Classificação citopatológica das lesões precursoras do carcinoma escamoso do esôfago: modelo experimental em camundongos [tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1992.
60. Kunze E, Rath G, Graewe T. Effect of phenacetin and caffeine on N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-initiated urothelial carcinogenesis in rats. *Urol Int* 1987;42:108-14.
61. Lamarine RJ. Selected health and behavioral effects related to the use of caffeine. *J Community Health* 1994;19:449-66.
62. Leaf CD, Wishnom JS, Tannenbaum SR. Mechanisms of endogenous nitrosation. *Cancer Surv* 1989;8:324-33.
63. Li JY, Ershow AG, Chen ZJ, Wacholder S, Li GY, Guo W, et al. A case-control study of cancer of the esophagus and gastric cardia in Linxian. *Int J Cancer* 1989;43:755-61.
64. Lijinsky W. Chemistry and biology of n-nitroso compounds. Cambridge: Cambridge University Press;1992. (Cambridge Monographs on Cancer Research)
65. Lu SH, Chui SX, Yang WX, Hu XN, Guo LP, Li FM. Relevance of N-nitrosamines to esophageal cancer in China. *IARC Sci Publ* 1991;105:11-7.
66. Luft S. Avaliação da utilidade do teste salivar da eliminação da cafeína como auxiliar na indicação de transplante hepático infantil [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1997.
67. Maesawa C, Tamura G, Suzuki Y, Ogasawara S, Ishida K, Saito K, et al. Aberrations of tumor suppressor genes (p53, apc, mee and Rb) in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1994;57:21-5.
68. Magee PN. The experimental basis for the role of nitroso compounds in human cancer. *Cancer Surv* 1989;8:205-29.
69. Malafaia O. Tumores do esôfago. In: Dani R, Paula Castro L, editores. *Gastroenterologia clínica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992. p.428-45.
70. Martin JB, Annegers JF, Curb JD, Heyden S, Howson C, Lee ES, et al. Mortality patterns among hypertensives by reported level of coffee consumption. *Prev Med* 1988;17:310-20.
71. Meltzer SK, Yin J, Huang Y, McDaniel TK, Newkirk C, Iseri O, et al. Reduction to homozygosity involving p53 in esophageal cancers demonstrated by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:4976-80.
72. Miller EC, Miller JA. Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer* 1981;47:1055-64.
73. Minton JP, Abou-Issa H, Foecking MK, Sriram MG. Caffeine and unsaturated fat diet significantly promotes DMBA-induced breast cancer in rats. *Cancer* 1983;51:1249-53.

74. Montesano R, Magee PN. Comparative metabolism in vitro of nitrosamines in various animal species including man. In: Montesano R, Tomatis editors. Chemical carcinogenesis essays. IARC Sci Publ 1974;10:39-56.
75. Montesano R, Hall J. Species and organ specificity in nitrosamine carcinogenesis. In: Likhachev A, Anisimov V, Montesano R, editors. Age-related factors in carcinogenesis. IARC Sci Publ 1985;58:173-81.
76. Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer* 1996;69: 1-11.
77. Morita M, Kuwano H, Ohno S, Sugimachi K, Seo Y, Tomoda H, et al. Multiple occurrence of carcinoma in the upper aero digestive tract associated with esophageal cancer: reference to smoking, drinking and family history. *Int J Cancer* 1994;58:207-10.
78. Mountain CF. Rationale in staging of cancer of the esophagus. In: Delarue NC, Eschapsse H, editors. International trends in general thoracic surgery. Saint Louis: Mosby; 1988. v.4, p. 73-9.
79. Nakanishi K, Fukushima S, Shibata M, Shirai T, Ogiso T, Ito N. Effect of phenacetin and caffeine on the urinary bladder of rats treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Gann* 1978;69:395-400.
80. Nakanishi K, Hirose M, Ogiso T, Hasegawa R, Arai M, Ito N. Effects of sodium saccharin and caffeine on the urinary bladder of rats treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Gann* 1980;71:490-500.
81. Nehlig A, Debry G. Potential genotoxic, mutagenic and antimutagenic effects of coffee: a review. *Mutat Res* 1994;317:145-62.
82. Neshat K, Sanchez CA, Galipeau PC, Blount PL, Levine DS, Joslyn G, et al. p53 mutations in Barrett's adenocarcinoma and high-grade dysplasia. *Gastroenterology* 1994;106:1589-95.
83. Nishikawa A, Furukawa F, Imazawa T, Ikezaki S, Hasegawa T, Takahashi M. Effects of caffeine on glandular stomach carcinogenesis induced in rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and sodium chloride. *Food Chem Toxicol* 1995;33:21-6.
84. Pessini RA. Modelo experimental de carcinogênese esofágica em frangos [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1997.
85. Pitot HC, Sirica AE. The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochem Biophys Acta* 1980;605:191-215.
86. Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer* 1993;72:962-70.
87. Prolla JC, Furtado JD, Barcelos LB. Alguns aspectos da epidemiologia do câncer de esôfago no Rio Grande do Sul, Brasil, 1970-1979. *Rev Amrigs* 1983;27:26-32.
88. Prolla JC. Mortalidade por neoplasias associadas ao tabagismo no Rio Grande do Sul, 1970-1989 [tese]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1992.

89. Prolla JC, Dietz J, Costa LA. Diferenças geográficas na mortalidade por câncer do esôfago no Rio Grande do Sul. *Rev Assoc Med Bras* 1993;39:217-20.
90. Rankin S. The role of computerized tomography in the staging of esophageal cancer. *Clin Radiol* 1990;42:152-3.
91. Reeders JW, Bartelsman JF. Radiologic diagnosis and preoperative staging of esophageal cancer. *Radiologe* 1993;33:323-34.
92. Richardson CL, Grant AD, Schulman GE. The interaction of caffeine and other xanthine analogs with DNA as measured by competitive fluorescence polarization (Abstract No. AC-5) *Environ Mutagen* 1981;3:343.
93. Roberts JJ. Mechanisms of potentiation by caffeine of genotoxic damage induced by physical and chemical agents: possible relevance to carcinogenesis. In: Dewa PB, editor. *Caffeine. Perspectives from recent research*. Berlin: Springer; 1984. p. 77-85.
94. Rosa ARP. Sobrevida e fatores prognósticos em pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago submetidos a esofagectomia [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.
95. Rubio CA. Experimental models. In: Pfeiffer CJ. *Cancer of the esophagus*. CRC Press; 1982. p. 139-68.
96. Rubio CA. Epitelial lesions antedating oesophageal carcinoma. Histologic study in mice. *Pathol Res Pract* 1983;176:269-75.
97. Rubio CA, Liu F, Chejfec G, Sveander M. The induction of esophageal tumors in mice: dose and time dependency. *In Vivo* 1987;1:35-8.
98. Rubio CA, Liu FC, Zhao HZ. Histological classification of intra epithelial neoplasias and microinvasive carcinoma of the esophagus. *Am J Surg Pathol* 1989;13:685-90.
99. Russo A, Franceschi S. The epidemiology of esophageal cancer. *Ann Ist Super Sanita* 1996;32:65-72.
100. Sadzuka Y, Mochizuki E, Takino Y. Mechanism of caffeine modulation of the antitumor activity of adriamycin. *Toxicol Lett* 1995;75:39-49.
101. Sallet JA. Carcinogênese esofágica experimental: contribuição ao estudo da histopatogênese do carcinoma epidermóide [dissertação]. Campinas: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Campinas; 1996.
102. Sarbia M, Bittinger F, Porschen R, Dutkowski P, Willers R, Gabbert HE. Prognostic value of histopathologic parameters of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1995;76:922-7.
103. Savary M, Monnier PH, Pasche R, Brossard E, Pasche P, Lang F. Multiple primary malignancies. *Adv Otorhinolaryngol* 1991;46:165-75.
104. Schairer C, Brinton LA, Hoover RN. Methylxanthines and breast cancer. *Int J Cancer* 1987;40:469-73.
105. Schirmer CC. Eficácia da tomografia axial computadorizada na avaliação do comprometimento da traquéia e brônquios principais em pacientes com carcinoma

epidermóide de esôfago [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1995.

106. Schirmer CC, Gurski R, Castro MAA, Madruga GSP, Pedroso FL, Krueel CDP, et al. Neoplasias associadas ao carcinoma epidermóide do esôfago. *Rev Assoc Med Bras* 1997;43:335-9.

107. Sen NP. Migration and formation of N-nitrosamines from food contact materials. In: Hotchkiss JH, editor. *Food and packaging interactions*, ACS Symp. 365, Washington: American Chemical Society; 1988. p. 146-58.

108. Singer GM, Chuian J, Roman J, Min-Hsin L, Lijinsky W. Nitrosamines and nitrosamine precursors in foods from Linxian, China, a high incidence area for esophageal cancer. *Carcinogenesis* 1986;7:733-6.

109. Spiegelhalder B, Preussmann R. Nitrosamines and rubber. In: Walker EA, Bogovski P, Gričič L, editors. *Environmental N-nitroso compounds: Analysis and formation*. IARC Sci Publ 1982;14:231-43.

110. Stalder R, Bexter A, Würzner HP, Luginbühl H. A carcinogenicity study of instant coffee in Swiss mice. *Food Chem Toxicol* 1990;28:829-37.

111. Stavric B. An update on research with coffee/caffeine (1989 -1990). *Food Chem Toxicol* 1992;30:533-55.

112. Strain EC, Griffiths RR. Caffeine dependence: fact or fiction? *J R Soc Med* 1995;88:437-40.

113. Suter PM, Vetter W. Kaffee und Koffein. *Schweiz Rundsch Med Prax* 1993;82:1122-8.

114. Tarka SM Jr. The toxicology of cocoa and dimethylxanthines: a review of the literature. *CRC Crit Rev Toxicol* 1982;9:275-312.

115. Tavani A, Pregnolato A, La Vecchia C, Favero A, Franceschi S. Coffee consumption and the risk of breast cancer. *Eur J Cancer Prev* 1998;7:77-82.

116. Theiss JC, Shimkin MB. Inhibiting effect of caffeine on spontaneous and urethane-induced lung tumors in strain A mice. *Cancer Res* 1983;38:1757-61.

117. Timson, J. Caffeine. *Mutation* 1977;47:1-52.

118. Tricker AR, Preussmann R. N-nitroso compounds and their precursors in the human environment. In: Hill MJ, editor. *Nitrosamines: toxicology and microbiology*. Chichester: Ellis Harwood; 1988. p. 88-116.

119. Tricker AR, Preussmann R. Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutat Res* 1991; 259:277-89.

120. Tsuchiya H, Tomita K, Yamamoto N, Mori Y, Asada N. Caffeine-potentiated chemotherapy and conservative surgery for high-grade soft-tissue sarcoma. *Anticancer Res* 1998;18:3651-6.

121. Tuyns AJ, Péquignot G, Abbatucci JS. Oesophageal cancer and alcohol consumption: importance of type of beverage. *Int J Cancer* 1979;23:443-47.

122. Tuyns AJ, Riboli E, Doornbos G, Péquignot G. Diet and esophageal cancer in Calvados. *Nutr Cancer* 1987;9:81-92.
123. Velho AV. A influência do chá preto sobre a gênese tumoral esofágica induzida pela dietilnitrosamina: modelo experimental em camundongos [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1988.
124. Victora C, Muñoz N, Day NE, Barcelos LB, Peccin DA, Braga NM. Hot beverages and oesophageal cancer in southern Brazil: a case-control study. *Int J Cancer* 1987;39:710-6.
125. Viscoli CM, Lachs MS, Horwits RI. Bladder cancer and coffee drinking: a summary of case control research. *Lancet* 1993;341:1432-37.
126. Warwick GP, Harington JS. Some aspects of the epidemiology and etiology of esophageal cancer with particular emphasis on the Transkei, South Africa. *IARC Adv Cancer Res* 1973;17:81-229.
127. Weisburger JH, Hara Y, Dolan L, Luo FQ, Pittman B, Zang E. Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens. *Mutat Res* 1996; 371:57-63.
128. Welsch CW, DeHoog JV, O'Connor DH. Influence of caffeine consumption on carcinomatous and normal mammary gland development in mice. *Cancer Res* 1988;48:2078-82.
129. Welsch CW, Scieszka KM, Senn ER, DeHoog JV. Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine), a temperated promotor of DMBA-induced rat mammary gland carcinogenesis. *Int J Cancer* 1983;32:479-84.
130. Williams RR, Horn JW. Association of cancer sites with tobacco and alcohol consumption and socioeconomic status of patients: interview study from the Third National Cancer Survey. *J Natl Cancer Inst* 1977;58:525-47.
131. Williams DHL. Nitrosation mechanisms. *Adv Phys Org Chem* 1983;19:381-428.
132. Wu YK, Huang GZ, Zhang YD, Lin XS. Progress in the study and surgical treatment of cancer of the esophagus in China, 1940-1980. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982;84:325-33.
133. Wynder EL, Gori GB. Contribution of the environment to cancer incidence: an epidemiological exercise. *J Natl Cancer Inst* 1977;58:825-32.
134. Yang CS, Tu YY, Hong J, Patten C. Metabolism of nitrosamines by cytochrome p-450 isozymes. *IARC Sci Publ* 1984;57:423-7.
135. Ziegler RG. Alcohol-nutrient interactions in cancer etiology. *Cancer* 1986;58:1942-8.
136. Zysset T, Wahlländer A, Preisig R. Evaluation of caffeine plasma levels by automated enzyme immunoassay (EMIT) in comparison with a high-performance liquid chromatographic method. *Ther Drug Monit* 1984;6:348-54.

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CAFEÍNA NA CARCINOGENESE ESOFÁGICA INDUZIDA PELA DIETILNITROSAMINA (DEN) EM CAMUNDONGOS.

RESUMO

Introdução: Não existe consenso quanto à relação da cafeína com as neoplasias. O carcinoma epidermóide do esôfago (CEE) é neoplasia de elevada incidência em nosso meio. Entre os fatores de risco conhecidos estão o tabagismo, o alcoolismo e bebidas ingeridas em temperaturas elevadas: chás, chimarrão, entre outras. Na literatura, não encontramos estudos sobre a cafeína e o câncer do esôfago.

Objetivos: Avaliar o efeito da cafeína no CEE, utilizando modelo experimental de carcinogênese esofágica induzido pela DEN em camundongos, e também o efeito da cafeína ingerida isoladamente sobre a mucosa do esôfago.

Material e métodos: Utilizaram-se 240 camundongos machos divididos em 5 grupos. Administrou-se DEN aos grupos G1, G2 e G3 por três dias na semana na dose de 0,04 mg/l, diluída na água dos bebedouros. Os grupos G2 e G3 receberam também cafeína nos quatro dias restantes da semana, nas dosagens de 6 e 3 mg/kg/dia, respectivamente. Os grupos G4 e G5 receberam somente cafeína diluída na água de beber todos os dias, nas dosagens de 6 e 3 mg/kg/dia respectivamente. Os animais foram alimentados com a mesma ração. Após 175 dias sacrificaram-se os camundongos aleatoriamente e ressecou-se o esôfago. O esôfago foi medido, corado e contou-se o número de tumores visíveis macroscopicamente por cm, obtendo-se o índice tumoral (IT). A seguir, realizou-se exame microscópico de cada esôfago corado com HE e fixado, avaliando-se a presença de alterações celulares desde esofagite até carcinoma avançado.

Resultados: Ao final do experimento, foram sacrificados nos respectivos grupos: G1=42, G2=39, G3=43, G4=42 e G5=43 camundongos. O IT no G1=67,13; G2=49,42 e G3=69,84 observando-se diferença significativa ($p<0.01$) entre o grupo G2 e os grupos G1 e G3, sugerindo um efeito protetor da cafeína ingerida em doses elevadas. Os grupos G4 e G5 não apresentaram tumores na macroscopia. O exame microscópico confirmou a ausência de neoplasias ou outras alterações da mucosa esofágica nos grupos G4 e G5. Na microscopia não houve diferença quanto à presença de carcinoma do esôfago nos animais dos grupos G1, G2 e G3.

Conclusão: A cafeína não apresentou qualquer efeito sobre a carcinogênese esofágica induzida pela DEN em camundongos.

Unitermos: Neoplasia do esôfago, carcinoma epidermóide do esôfago, carcinogênese esofágica, cafeína, nitrosaminas.

INTRODUÇÃO

O Carcinoma epidermóide do esôfago (CEE) é neoplasia com alta taxa de mortalidade e distribuição geográfica peculiar (43). A patogenia do CEE está comprovadamente ligada ao uso do tabaco e do álcool. Outros fatores etiológicos têm sido implicados e estudados: chás em temperaturas elevadas, ervas com carcinógenos e, principalmente, compostos N-nitrososos (44).

A partir do experimento de Duckrey et al. (46), que demonstrou o aparecimento de carcinoma esofágico em ratos que receberam N-metil-N-nitrosoaniline, as nitrosaminas foram reconhecidas como os carcinógenos mais importantes para indução de câncer do esôfago. Acredita-se que estes compostos nitrosos atuem na bioquímica e na genética celular, alterando o DNA de maneira a impedir a reparação e replicação corretas, originando lesões pré-malignas e, mais tarde, o carcinoma epidermóide (45).

A carcinogênese esofágica foi estudada por Rubio et al. (31), em experimento no qual induziu CEE em camundongos, após administrar dietilnitrosamina – DEN – diluída na água de beber dos animais. No estudo histológico do esôfago destes animais, observou alterações desde esofagite até carcinoma.

A associação entre a ingestão de café e aparecimento de neoplasia foi primeiramente descrita há mais de 20 anos, quando sugeriu-se uma correlação entre ingestão de altas doses de café e neoplasia do trato urinário (47).

Existe um grande impasse em relação à ação promotora ou protetora do café e da cafeína especificamente na carcinogênese de um modo geral. A ação desta substância parece ser dose dependente, e foram publicados vários trabalhos de expressão a respeito, porém com resultados divergentes (48, 24).

O café e a cafeína podem interagir com vários outros agentes mutágenos e seus efeitos são sinérgicos com os Raios-X, luz ultravioleta e alguns agentes químicos. Em

controvérsia, a cafeína pode inibir o efeito mutagênico, dependendo do momento da sua administração em relação ao agente químico estudado (22).

Vários trabalhos experimentais foram analisados pelo grupo de estudos do IARC (2), abordando estudos com a cafeína em animais de experimentação. O maior número destas experiências estudou o possível efeito protetor ou promotor desta substância quanto à carcinogênese do sistema urinário, pâncreas, fígado, mama e pulmões, associada ou não a conhecidos agentes carcinógenos. Não estão relatados trabalhos estudando especificamente a ação do café ou da cafeína sobre a mucosa esofágica.

A estimativa do consumo de cafeína por habitante nos diversos países demonstra uma variação importante, e o seu consumo está aumentando gradativamente (2).

No presente trabalho estudou-se o efeito da cafeína na carcinogênese esofágica, utilizando-se um modelo experimental conhecido de esofagocarcinogênese em camundongos. Avaliou-se qual o efeito da cafeína na carcinogênese esofágica induzida por dietilnitrosamina, e qual a ação da cafeína diluída na água de beber e ingerida isoladamente sobre a mucosa esofágica destes animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e ambiente de experimentação

Utilizaram-se 240 camundongos machos “mus musculus” da cepa CF1, com 3 meses de idade no início do experimento e peso médio, por animal, de 43,43g, fornecidos pela Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS - Divisão de Produção e Experimentação Animal, do estado do Rio Grande do Sul. Durante toda a pesquisa os animais foram mantidos no biotério do FEEPS. Este estudo experimental foi avaliado e aprovado pela comissão de bioética do GPPG-HCPA (Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação).

Os camundongos até os 21 dias de vida receberam aleitamento materno. Após este período, a alimentação passou para a ração Nuvilab CR1 da marca Nuvital (Anexo 5) sem restrição de quantidade, que era repostada a cada dois dias e trocada uma vez na semana. Os animais foram expostos a períodos de 12 horas de luz, sob fluxo contínuo de ar e sujeitos a variações de temperatura que oscilou de 5 a 34⁰C e umidade ambientes. Os 240 animais foram divididos em 5 grupos de 48 e separados em 12 caixas plásticas por grupo com 4 animais em cada uma. As respectivas caixas com grade metálica servindo de tampa e o fundo recoberto com serragem, foram higienizadas 3 vezes por semana. A hidratação oferecida aos animais variou conforme o grupo a que pertenciam, porém a água utilizada foi a que abastece a cidade, fornecida pelo Departamento Municipal de Água e Esgoto de Porto Alegre - DMAE -. Dividiram-se os cinco grupos conforme o fator em estudo e resumidos na tabela 1, da seguinte forma :

GRUPO 1 - ingestão de DEN (0,04 ml/ 1000 ml) na água de beber 3 dias por semana (segunda, terça e quarta-feira) + ração. De quinta-feira a domingo, ingestão de água + ração.

GRUPO 2 - ingestão de DEN (0,04 ml/ 1000 ml) na água de beber 3 dias por semana (segunda, terça e quarta-feira) + cafeína na dosagem de 6mg/kg/dia também dissolvida na água de beber + ração. De quinta-feira a domingo ingestão de cafeína 6mg/kg/dia dissolvida na água + ração.

GRUPO 3 - ingestão de DEN (0,04 ml/ 1000 ml) na água de beber 3 dias por semana (segunda, terça e quarta-feira) + cafeína na dosagem de 3mg/kg/dia dissolvida na água de beber + ração. De quinta-feira a domingo, ingestão de cafeína 3mg/kg/dia dissolvida na água + ração.

GRUPO 4 - ingestão de cafeína na dosagem de 6mg/kg/dia dissolvida na água de beber todos os dias + ração.

GRUPO 5 - ingestão de cafeína na dosagem de 3mg/kg/dia dissolvida na água de beber todos os dias + ração.

O estudo teve duração de 25 semanas. No final deste período os animais foram mortos. Não foi utilizado grupo-controle de camundongos ingerindo apenas água e ração.

TABELA 1. Soluções ingeridas pelos diferentes grupos durante a semana.

	Segunda a Quarta	Quinta a Domingo
Grupo 1	DEN	Água
Grupo 2	DEN + CAFEÍNA 6	CAFEÍNA 6
Grupo 3	DEN + CAFEÍNA 3	CAFEÍNA 3
Grupo 4	CAFEÍNA 6	CAFEÍNA 6
Grupo 5	CAFEÍNA 3	CAFEÍNA 3

Soluções

A DEN, dietilnitrosamina, produzida pelo laboratório Sigma Chemicals CO (St. Louis, USA) – 0756, frasco de 25 ml, densidade 0,95g/ml, peso molecular 102.1 e fórmula química $C_4H_{18}N_2$, foi dissolvida em água à temperatura ambiente na proporção de 0,04 ml por 1000 ml e armazenada em galões plásticos sob refrigeração, seguindo o modelo experimental desenvolvido por Kruel (1992). O consumo de água por gaiola foi de 25 - 30 ml em 24 h ou 5 a 6 ml por animal / 24 h (49). Como a concentração definida da DEN é de 0,04 ml / 1000 ml ou 0,00004 ml / ml; estava previsto que cada camundongo consumiria 0,0002 ml / 24 h. Esta solução foi colocada em recipientes de vidro com tampa especial própria para o consumo dos camundongos, e oferecida “à vontade” por período de 24 h ininterruptamente, conforme o proposto para cada grupo. Nunca permitiu-se o esvaziamento completo do vidro. Mediu-se o consumo por gaiola semanalmente (Anexo 1).

A cafeína anidra pura, 7-metilteobromina ou 1,3,7 trimetilxantina, é fabricada pelo laboratório Merck (Coffein Rein, Merck, Darmstadt, Alemanha) em forma de pó - frasco com 250 g - foi importada da Alemanha. A cafeína foi dissolvida em água à temperatura ambiente na proporção determinada para cada grupo. A quantidade de cafeína por solução foi definida com base no consumo médio de água por camundongo ao dia conforme idade e peso no início do experimento. Este cálculo foi baseado no consumo médio de água em 24 horas para cada 100 g de “camundongo” que foi igual a 15 ml (49). Visto que o peso médio de cada animal no início do experimento foi de 43,34 g com 4 animais por gaiola (Tabela 2), o consumo estimado de água foi de 26 ml / água / gaiola / 24 h. Confirmam-se estes valores calculando-se o consumo de água com base no consumo médio por animal com 3 meses de idade que foi igual a 5-6 ml por 24 h; logo, 4 animais por gaiola consumiriam aproximadamente 25 - 30ml/ 24 h.

A concentração de cafeína dissolvida na água de beber foi calculada conforme o estipulado para cada grupo: grupos G2 e G4 = 6mg cafeína / kg de camundongo / 24 h (6 mg / kg é igual a 0,006 mg / gr) e grupos G3 e G5 = 3mg cafeína / kg de camundongo / 24 h e armazenada em galões plásticos . A solubilidade da cafeína em água é de 1g / 46 ml à 20 graus Celsius. Fundamentado nos dados apresentados, o consumo diário por gaiola nos grupos G2 e G4 (6 mg) foi de aproximadamente 1,2 mg de cafeína / 30 ml de água ou 40 mg de cafeína / 1000 ml de água; nos grupos G3 e G5 (3 mg) a concentração da solução de cafeína foi a metade: 0.6 mg / 30 ml ou 20 mg / 1000 ml .

As soluções utilizadas no experimento foram as seguintes (Grade 1):

	ÁGUA (ml)	DEN (ml)	CAFEÍNA (mg)
G1	5.000	0,2	ZERO
G2	5.000	0,2	200
G3	5.000	0,2	100
G4	17.000	ZERO	680
G5	17.000	ZERO	340

Dados coletados

Os camundongos foram pesados 4 vezes durante o experimento e as médias e datas da pesagem e o desvio padrão constam na tabela 2. A média geral de peso por animal comparando o início (43,43 g) e o final do trabalho (44,33 g) permaneceu praticamente inalterada, apesar de ocorrerem variações entre os diferentes grupos no transcorrer do estudo .

TABELA 2 - Peso médio por camundongo em gramas e desvio padrão durante o experimento.

<i>Grupo/Temp</i>	<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>	<i>G5</i>
Dia 01	42,75 ± 0,88	43,48 ± 1,93	43,93 ± 1,46	44,15 ± 3,43	42,78 ± 2,77
Dia 60	44,83 ± 1,76	45,08 ± 3,38	46,10 ± 2,16	46,85 ± 3,47	45,50 ± 3,12
Dia 137	44,15 ± 1,64	44,38 ± 2,34	44,83 ± 0,99	46,98 ± 3,59	45,58 ± 2,36
Dia 175	43,95 ± 2,29	42,10 ± 1,75	41,95 ± 2,56	47,38 ± 2,94	47,30 ± 3,03

O consumo de água e das diferentes soluções oferecidas a cada grupo de animais foi medido, permitindo quantificar qual volume cada animal ingeriu nos diferentes grupos. Os anexos 3 e 4 apresentam os dados referentes ao volume de água e solução consumidos em cada grupo, por semana, em todo experimento.

Confirmou-se o consumo de cafeína pelos animais, através da medida das concentrações séricas de cafeína em 36 camundongos criados separadamente, reproduzindo exatamente os grupos G4 (18 animais) e G5 (18 animais) utilizados no experimento. A cafeína sérica destes animais foi medida através de "kit" especial fabricado pelo laboratório Syva-Merck (Califórnia, EEUU) EMIT – enzyme multiplied immunoassay technique - importado pelo pesquisador. O sangue foi colhido por punção cardíaca a céu aberto, imediatamente após o sacrifício do animal pela inalação de éter sulfúrico conforme descrito abaixo. Realizaram-se coletas sanguíneas no período diurno (9 - 10 h) em 9 animais de cada grupo (G4 e G5), e no período noturno (23 - 0 h) nos

animais restantes de cada grupo (G4 e G5), pois estes roedores têm hábitos noturnos. Após coletado, o sangue foi centrifugado e a cafeína medida no plasma dos camundongos. Observou-se diferença importante nos valores em relação ao momento da coleta e ao grupo do animal (Tabela 3).

TABELA 3 – Média da concentração de cafeína (microgramas/ml) e desvio padrão no plasma dos camundongos.

	GRUPO 4 (cafeína 6)	GRUPO 5 (cafeína 3)
DIA	0,32 ± 0,06	0,38 ± 0,05
NOITE	0,74 ± 0,18	0,71 ± 0,16

Estes dados confirmam a necessidade da coleta no período noturno pois, durante o dia, os animais não estão ativos e, portanto, não ingerem as soluções e a cafeína ingerida à noite foi parcialmente metabolizada e eliminada.

Perdas e sacrifício

No início do trabalho haviam 240 animais divididos em 5 grupos de 48 (12 caixas com 4 camundongos em cada uma). No final do experimento o número de animais por grupo foi o seguinte: G1 = 42, G2 = 39, G3 = 43, G4 = 42 e G5 = 43. Ocorreram 31 óbitos (12,92 %) sendo que 17 animais morreram nas últimas 4 semanas, e todos foram necropsiados. A necrópsia revelou a causa da morte em 15 animais. A agressão dos colegas de caixa foi responsável pela morte de 7 camundongos. Observou-se hemotórax em 2 e lesões tegumentares em 5 animais. Outros 8 apresentaram tumores esofágicos

visíveis na macroscopia, o que provavelmente causou disfagia e desnutrição. Nos dezesseis animais restantes não identificou-se o motivo do óbito.

Sacrificaram-se os 209 animais ao final das 25 semanas (175 a 180 dias) através da inalação de éter etílico em campânula de vidro fechada (42). O período de tempo entre a morte do animal e a retirada dos órgãos foi inferior a 5 minutos. A ordem de escolha dos animais para o sacrifício foi por sorteio. As necrópsias dos camundongos foram iniciadas por incisão mediana estendendo-se do mento ao púbis, com o animal fixado nas extremidades dos membros superiores e inferiores em prancha de isopor. Realizou-se laparotomia em plano único iniciando pela cavidade abdominal, progredindo no sentido cranial com abertura do hiato diafragmático e esternotomia sob visão direta das estruturas mediastinais e dissecação com tração distal do esôfago já identificado e preservado, como pode ser observado na Figura 1. No tórax este órgão foi cuidadosamente dissecado do mediastino posterior até a região cervical alta (hipofaringe) e seccionado. Distalmente foi seccionado 5 mm abaixo da junção “esôfago-gástrica”: no camundongo, a denominação correta é junção do esôfago com o pré-estômago. O esôfago foi então estendido e fixado em lâmina de cortiça com alfinetes e, a seguir, colocado com a face voltada para baixo em recipiente plástico identificado contendo solução de formalina tamponada a 10%. Foram retirados, também para futuros estudos e colocados em solução de formalina, os seguintes órgãos: fígado, rim, pâncreas, baço, bexiga e estômago.

Preparo e estudo do material

Macroscopia

O esôfago de cada animal, fixado em solução de formalina e estendido em lâmina de cortiça, foi aberto com incisão longitudinal com tesoura e pinça de microcirurgia e medido o comprimento total do órgão. A seguir, procedeu-se a coloração do esôfago por

imersão durante 30 segundos em azul de toluidina (Figura 2) e, utilizando-se microscópio estereoscópico, realizou-se a contagem do número de lesões presentes na mucosa esofágica e nitidamente visíveis para dois observadores distintos. As lesões muitas vezes são visíveis a olho nu, principalmente as polipóides (Figura 3). Estes dados foram registrados em fichas individuais (Anexo 6) e calculado o índice tumoral de Rubio (número de tumores / cm de esôfago), conforme modelo experimental descrito por Kruehl, em 1992.

Microscopia

O esôfago de cada camundongo fixado em formalina foi enrolado sobre si mesmo a partir de uma das extremidades (tipo “rocambole”), com a finalidade de proporcionar cortes histológicos que permitissem um perfil longitudinal da víscera e preparado em blocos de parafina. A seguir confeccionaram-se lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE) para exame em microscópio ótico comum 32, 100 e 250x (Figura 4). As lâminas foram examinadas por patologista que desconhecia o grupo ao qual pertencia o esôfago do animal. Estudou-se neste material a presença ou não de neoplasia e o tipo histológico, assim como o grau de penetração na parede do órgão: mucosa (Figura 5), muscular da mucosa, submucosa (Figura 6) e muscular própria. Na presença de mais de uma lesão no mesmo esôfago, a classificação baseou-se no tumor mais agressivo. Outras alterações microscópicas da mucosa esofágica como hiperplasia, esofagite, papiloma e displasia de baixo ou alto grau, também foram pesquisadas. O autor acompanhou pessoalmente o exame de cada lâmina e anotou os dados no protocolo (Anexo 7).

Análise Estatística

Na macroscopia, estudou-se o índice tumoral de Rubio e empregou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e nível de significância de 1% no cálculo da diferença entre



as medianas dos grupos G1, G2 e G3. Nos grupos G4 e G5 o índice tumoral foi igual a zero (ausência de tumores).

Na microscopia utilizou-se a análise da variância e o teste do qui-quadrado de Pearson, com nível de significância de 5%.

O programa estatístico utilizado foi o SPSS (Statistical Package for Social Science) versão 6.0.

RESULTADOS

Observações Gerais

Iniciou-se o estudo com 240 camundongos e, no decorrer dos 175 dias, ocorreram 31 óbitos (12,92%). Foram submetidos a exame macro e microscópico o esôfago de 209 animais.

Os camundongos que ingeriram cafeína apresentaram comportamento mais dinâmico, porém sem alterações quanto à agressividade.

Em relação ao peso dos animais no início e no final do experimento não observou-se diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Os grupos G4 e G5, que não ingeriram DEN, apresentaram aumento ponderal mínimo em relação ao início do estudo, enquanto os animais dos grupos G1, G2 e G3, que ingeriram o carcinógeno (DEN), mantiveram o mesmo peso ou acusaram discreta perda (Tabela 2).

Ingestão de Soluções

Registrou-se detalhadamente o consumo da solução oferecida aos animais em cada grupo. Dividimos a semana em duas partes, pois as soluções ingeridas no período de 2ª a 4ª feira foram diferentes das soluções consumidas de 5ª a domingo, e calculou-se o volume médio (ml) consumido por cada animal diariamente nos diversos grupos (Anexos 3 e 4).

Os dados obtidos demonstraram que nos grupos G1, G2 e G3, no período inicial da semana (2ª-4ª feira), quando estava presente na solução ingerida a DEN associada ou não à cafeína, o volume consumido foi menor comparado ao consumo dos grupos G4 e

G5 que ingeriram soluções com cafeína apenas. No período de 5ª a domingo, quando nenhum animal ingeriu solução com DEN, o consumo foi maior e semelhante em todos os grupos (Tabela 4).

Macroscopia (Índice Tumoral – IT)

A medida do comprimento do esôfago dos camundongos nos diversos grupos variou de 32 a 43 mm, e não observou-se diferença entre os grupos.

No exame macroscópico do esôfago dos animais dos grupos G4 e G5 que beberam soluções apenas com cafeína, não observou-se nenhum tumor (IT=zero).

No esôfago dos animais dos grupos G1, G2 e G3 calculou-se o IT (número de tumores/cm de esôfago) utilizando-se a mediana (Kruskall-Wallis): G1= 67,13 , G2= 49,42 e G3= 69,84. Observou-se diferença significativa para $p < 0,01$ entre o grupo G2 e os grupos G1 e G3.

TABELA 4 – Média do volume (ml) de solução ingerida por camundongo e desvio padrão, conforme o período semanal, durante as 25 semanas do experimento.

	segunda – quarta	Quinta - domingo
G1	23,68 ± 1,93	41,22 ± 5,38
G2	28,74 ± 2,87	43,86 ± 10,12
G3	28,02 ± 2,90	45,08 ± 8,02
G4	33,84 ± 2,73	51,98 ± 8,67
G5	33,85 ± 2,76	51,95 ± 8,80

Microscopia

O exame microscópico do esôfago dos animais dos grupos G4 e G5 não evidenciou alterações histológicas, confirmando os achados macroscópicos.

A avaliação microscópica dos esôfagos dos animais dos grupos G1, G2 e G3 apresentou resultados semelhantes nestes grupos, com grande número de tumores. Foram analisados com o teste do qui-quadrado de Pearson as diversas alterações histológicas e classificadas como normais ou não-neoplásicas: hiperplasia, esofagite e papiloma. Foram consideradas como alteradas ou neoplasia: displasia (baixo ou alto grau) e carcinoma invasor (Tabela 5).

TABELA 5 – Resultados do exame microscópico do esôfago dos animais dos grupos: G1, G2 e G3 em relação à presença de neoplasia.

<i>Grupos</i>	<i>Neoplasia</i>	<i>Ñ Neoplasia</i>	<i>TOTAL</i>	<i>Valor p*</i>
G1	36 (85,7%)	06 (14,3%)	42	
G2	33 (84,6%)	06 (15,4%)	39	0,87
G3	38 (88,4%)	05 (11,6%)	43	

*Qui-quadrado $p < 0,05$

Não houve diferença significativa entre os achados microscópicos nos grupos G1, G2 e G3 ($p=0,87$) em relação à presença de carcinoma esofágico.

Foram avaliados os mesmos dados, porém considerando-se a displasia de baixo grau como lesão não neoplásica. O resultado também não demonstrou diferença entre os grupos G1, G2 e G3.

Observou-se, portanto, que a diferença macroscópica entre o índice tumoral dos grupos G1 e G3 em relação ao grupo G2, não foi confirmada no estudo microscópico. Este fato demonstra que a neoplasia estava presente igualmente nos grupos G1, G2 e G3, porém não foi visível ao exame macroscópico por encontrar-se em estágio inicial.

Os resultados de todas as alterações encontradas no exame microscópico de cada um dos cinco grupos estão registrados na tabela 6.

TABELA 6 - Resultados do exame microscópico do esôfago em cada grupo

	G1	G2	G3	G4	G5
NORMAL	5 (11,9%)	3 (7,7%)	4 (9,3%)	41 (97,6%)	41 (95,3%)
HIPERPLASIA	0	1 (2,6%)	0	0	0
ESOFAGITE	1 (2,4%)	2 (5,1%)	1 (2,3%)	1 (2,4%)	2 (4,7%)
PAPILOMA	0	0	0	0	0
DISPLASIA BAIXO GRAU	4 (9,5%)	1 (2,6%)	4 (9,3%)	0	0
DISPLASIA ALTO GRAU	5 (11,9%)	1 (2,6%)	1 (2,3%)	0	0
CA INVASOR MUCOSA	7 (16,7%)	11 (28,3%)	7 (16,3%)	0	0
CA INVASOR MUSC. MUCOSA	12 (28,6%)	14 (35,9%)	19 (44,2%)	0	0
CA INVASOR SUBMUCOSA	6 (14,3%)	4 (10,3%)	5 (11,6%)	0	0
CA INVASOR MUSC. PRÓPRIA	2 (4,8%)	2 (5,1%)	2 (4,7%)	0	0
TOTAL	42	39	43	42	43

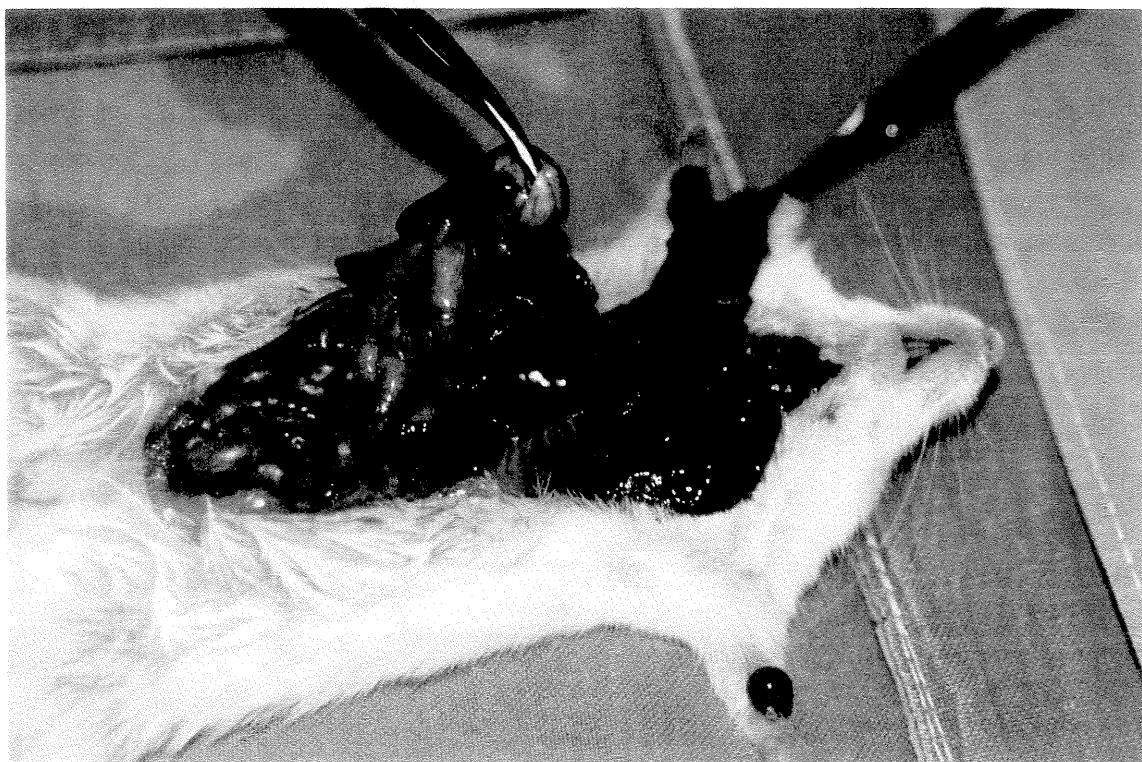


Figura 1 – Fotografia da dissecação do esôfago do camundongo.

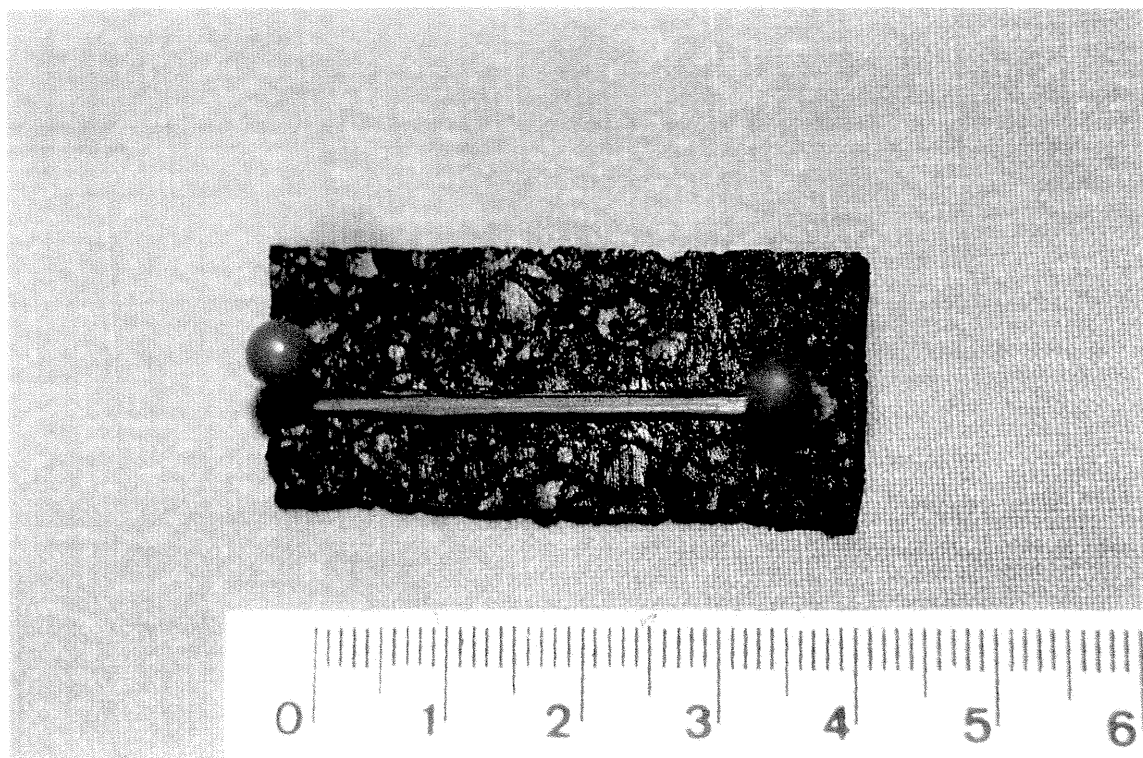


Figura 2 – Macrofotografia do esôfago normal do camundongo.

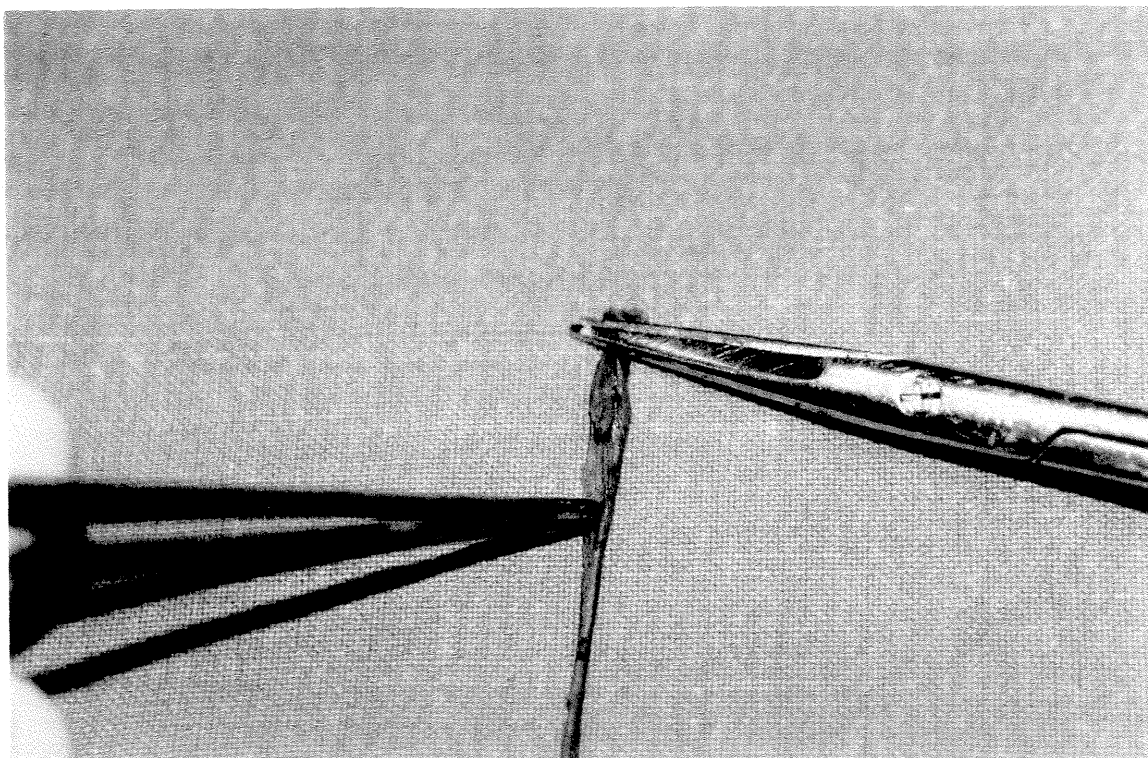


Figura 3 – Macrofotografia do esôfago de animal do grupo G2. Observa-se lesão vegetante parcialmente corada com azul de toluidina.

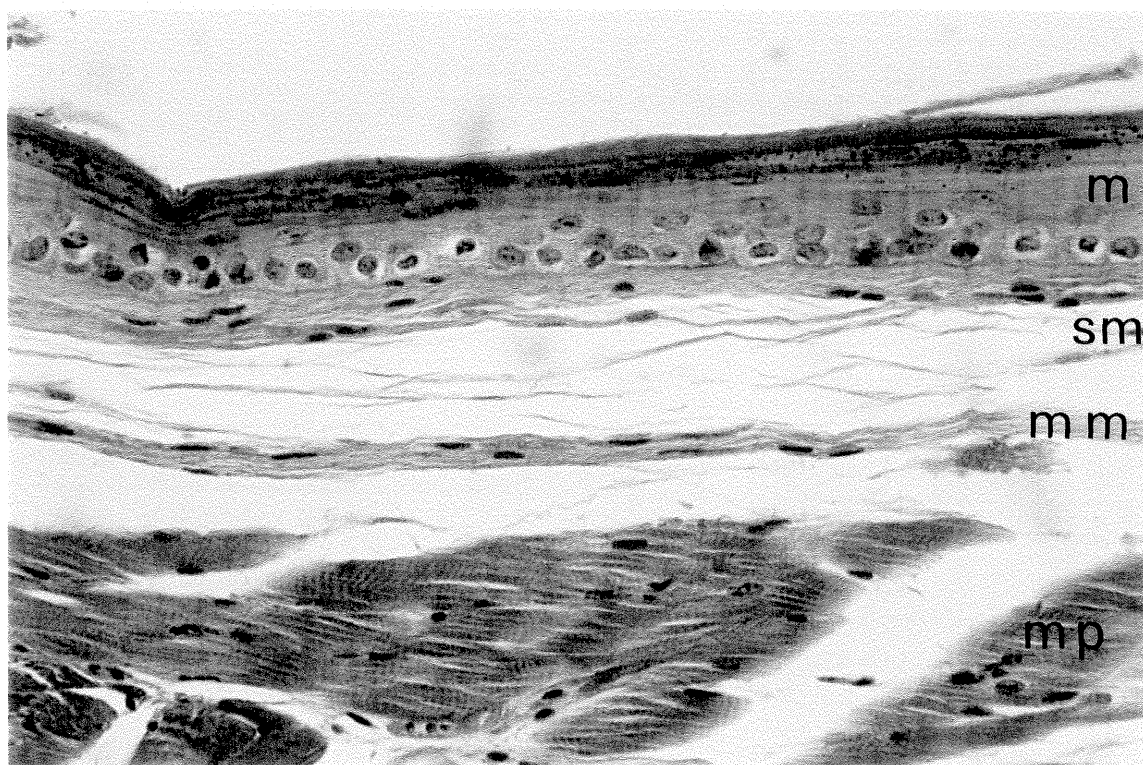


Figura 4 – Microfotografia da parede esofágica normal de animal do grupo G5. Observam-se as camadas: mucosa (m), submucosa (sm), muscular da mucosa (mm) e muscular própria (mp). HE 250x

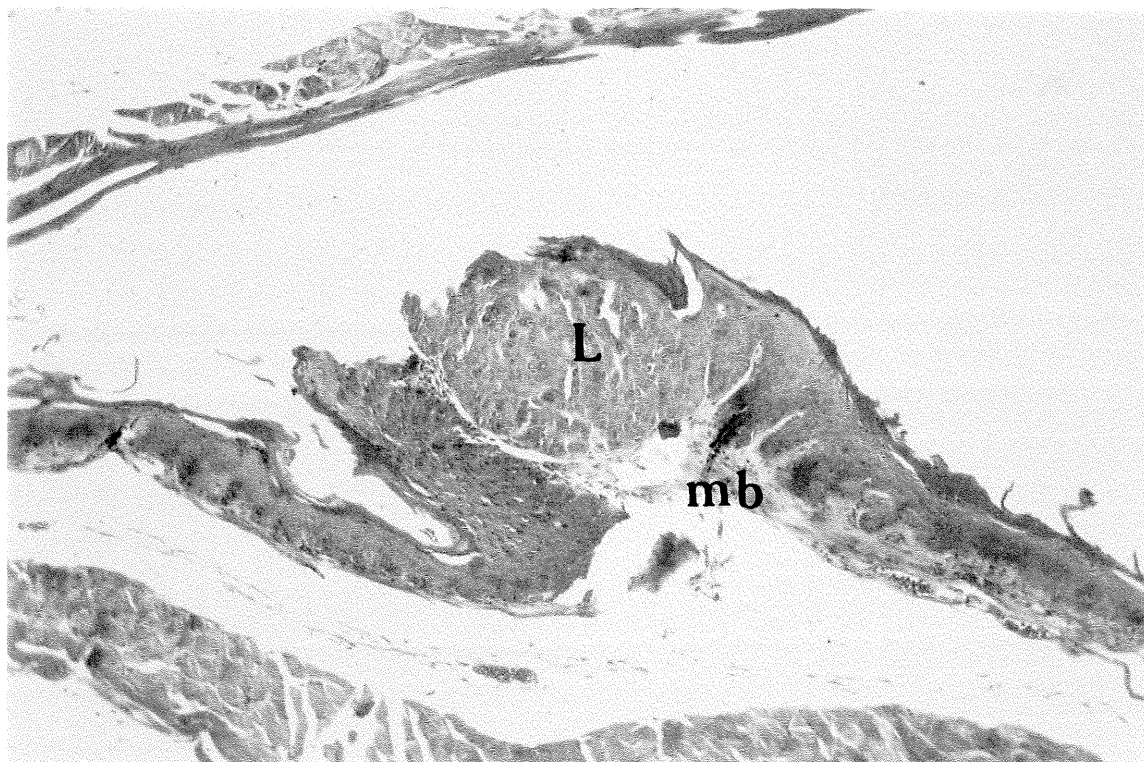


Figura 5 – Microfotografia de esôfago de animal do grupo G2. Observa-se lesão intraepitelial escamosa (L) abaulando a membrana basal (mb). HE 100x

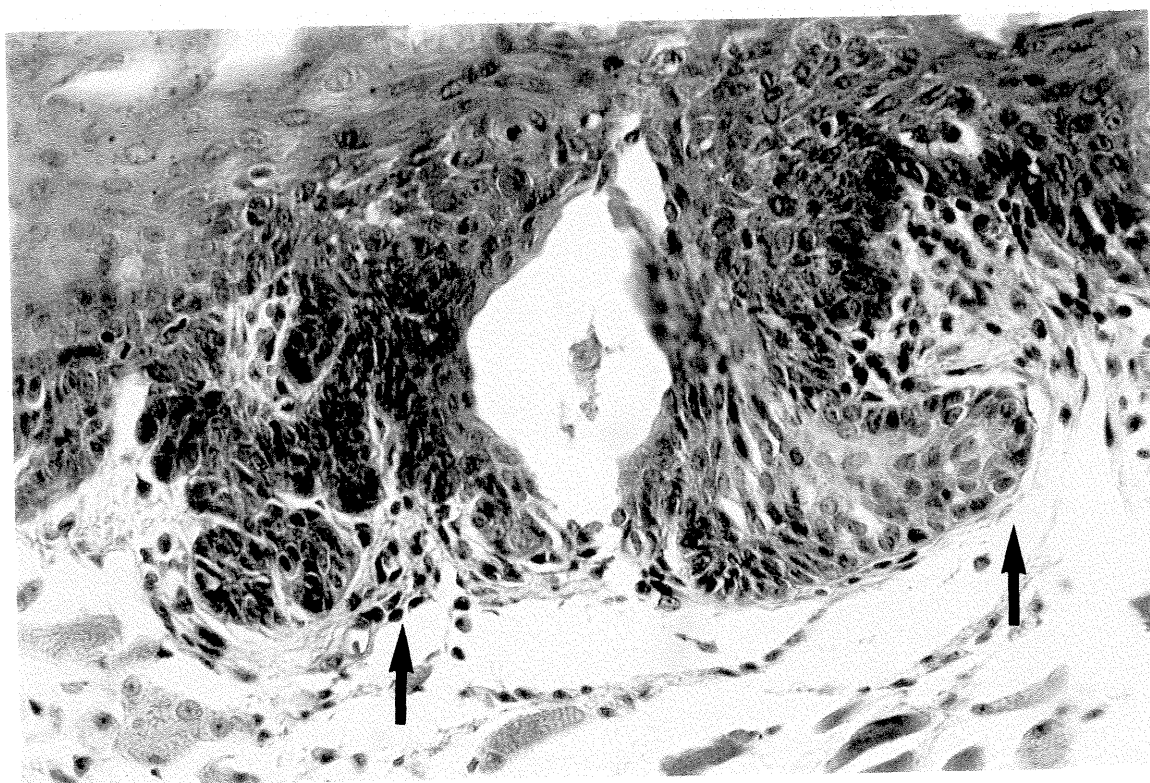


Figura 6- Microfotografia de esôfago de animal do grupo G3. Observa-se invasão neoplásica de células escamosas atípicas na submucosa (setas). HE 250x

DISCUSSÃO

A cafeína tem sido utilizada em vários experimentos com a finalidade de modificar a atividade de conhecidos carcinógenos (1). Apenas alguns estudos experimentais pesquisaram o possível efeito carcinogênico da cafeína, e uma porcentagem importante destes foi inadequada por vários motivos, entre eles: curto tempo de exposição à cafeína e avaliação histopatológica deficiente. A cafeína foi testada como carcinogênico por via oral em cinco trabalhos com ratos. Em dois deles, não houve diferença significativa em relação à presença de tumores nos órgãos estudados comparados com os controles, e os outros três estudos foram inadequados para avaliação. A administração de cafeína em associação com carcinógenos conhecidos apresentou resultados distintos. Ocorreu diminuição dos tumores de pulmão em camundongos tratados com uretane, e nos tumores de mama em ratas tratadas com dietilbestrol. A cafeína não influenciou a incidência de tumores de bexiga induzidos por compostos N-nitrosos ou de tumores pancreáticos induzidos por N-butilamine em ratos (2).

Aproximadamente 80-90% da cafeína extraída dos grãos verdes do café é utilizada na indústria de bebidas e o restante, somado à cafeína obtida sinteticamente, é empregado na indústria farmacêutica (2). Gilbert et al. (3) estimou em 35 mg/dia o consumo "per capita" de cafeína nos EUA somente com a ingestão de refrigerantes e similares. O consumo de café neste país excede 100 bilhões de xícaras ao ano, correspondendo a 125 mg de cafeína "per capita" por dia, o que a coloca como a droga mais comumente usada nos EUA (4).

A associação entre café e câncer foi levantada por dois estudos caso-controle, um deles sugerindo relação com neoplasia de bexiga (5) e o outro com carcinoma

de pâncreas (6). Estes estudos apresentavam alguns vieses importantes e não foram considerados como conclusivos. Vários outros estudos clínicos foram realizados, publicados (7, 8, 9,10,11) e apresentaram resultados diferentes, pois não demonstraram associação entre café e câncer de pâncreas.

Estudo prospectivo, realizado por Vatten et al. (12) com 14.593 mulheres norueguesas, sugere que o consumo de café reduz o risco de câncer de mama em mulheres magras e apresenta efeito oposto em mulheres obesas. Esta redução do risco para câncer de mama pode estar associada à redução do nível sérico dos estrogênios, nas mulheres consumidoras pesadas de cafeína (> 6 xícaras de café / dia) (14). A possível interferência do nível sérico de estrogênio com a ação e ou o metabolismo da cafeína, orientou-nos a utilizar camundongos machos. Thompson et al. (4) conclui que os melhores e maiores estudos por ele revisados inocentam o café e a cafeína como fatores de risco para câncer. Suter et al. (20) relata que muitos aspectos biomédicos da cafeína não foram ainda explicados, porém medicamente parece não existir objeções ao consumo moderado, com uma exceção: o “coffee break”, usado como pretexto para fumar.

Extensa revisão sobre as pesquisas realizadas com o café e a cafeína foi publicada por Stavric et al. (13). Em relação à cafeína e à gênese do câncer este autor refere associação possível entre a cafeína e o risco aumentado de neoplasia de bexiga em humanos, assim como uma redução do risco de câncer do cólon em consumidores pesados de café. Relata também que não há explicação teórica para estes fenômenos e que o café e a cafeína em altas doses apesar de diminuírem o risco de neoplasia, aumentam a mortalidade por doença coronariana.

A cafeína foi incluída num grande grupo de fatores de risco para câncer, podendo agir como um potencial carcinógeno ou um co-carcinógeno (15, 16). A cafeína é considerada um agente mutagênico para bactérias e fungos, porém não o

é para humanos em doses "normais" (17). Este autor postula várias razões contra o efeito mutagênico da cafeína em humanos: metabolização rápida e, notável efeito anti-mitótico, diminuindo as possibilidades que uma célula afetada reproduza-se com sucesso. Além destes fatores, está a longo tempo em contato com os seres humanos o que pode levar ao desenvolvimento de tolerância aos possíveis efeitos mutagênicos (17).

Este efeito anti-mitótico da cafeína pode explicar porque em nosso experimento ocorreu diferença significativa na avaliação macroscópica (índice tumoral) entre os grupos G2, que ingeriu DEN + cafeína 6mg e apresentou menor índice tumoral sugerindo efeito protetor da cafeína quando ingerida em altas doses e o grupo G3 que ingeriu DEN + cafeína 3mg e apresentou maior índice tumoral. Na microscopia não observou-se diferença significativa entre os grupos G2 e G3. O tempo decorrido entre o aparecimento da neoplasia e o sacrifício dos animais pode ter colaborado para que o efeito anti-mitótico da cafeína não fosse observado. Segundo o trabalho de Kruel (18), que estudou modelo semelhante de carcinogênese esofágica induzida por DEN em camundongos, as displasias moderadas, as graves e o carcinoma "in situ" começam a surgir no dia 90 do experimento. Como sacrificamos os animais com 175 dias a neoplasia foi facilmente diagnosticada à microscopia nos grupos G1, G2 e G3, porém ainda não estava visível à macroscopia em alguns animais do grupo G2.

A cafeína também apresenta efeitos antimutagênicos que ocorrem em nível de síntese de proteínas (21). O mecanismo de ação proposto é a estabilização de proteínas extremamente frágeis, através da inibição de fosfodiesterases do AMP cíclico ou ligações à estrutura da metilxantina ainda não bem determinadas (22). Os estudos experimentais com animais não demonstraram efeito carcinogênico da cafeína, porém alertam que esta substância poderia atuar sinergicamente com

A cafeína é metabolizada no sistema microsomal hepático dos camundongos através da reação de demetilação. Esta reação é idade dependente declinando com envelhecimento do animal, o que proporciona um aumento da meia-vida da cafeína em camundongos adultos (25). Indutores do P450 como 3-metilcolantrene aumentam o "clearance" da cafeína, diminuindo sua meia-vida (26). A cafeína aumenta a diurese através da inibição da liberação do hormônio anti-diurético (2), o que explica o aumento do consumo de líquido observado nos grupos que bebiam soluções com cafeína, principalmente nos grupos G4 e G5 que ingeriram solução com cafeína durante todos os dias do experimento. Em humanos, uma pequena porcentagem (0,5-4%) da dose ingerida é excretada inalterada na urina (27). Também é excretada na bile (27) e é encontrada na saliva em concentrações que correspondem de 65-85% do valor do plasma (28).

A descoberta de que as nitrosaminas apresentam um organotropismo definido permitiu o desenvolvimento de modelos de estudo de carcinogênese em vários órgãos, entre eles o esôfago. Vários autores: Baker et al. (29), Reuber et al. (30) e Rubio et al. (31, 32) utilizaram a dietilnitrosamina para induzir carcinogênese esofágica. As doses utilizadas inicialmente apresentavam elevada hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. Rubio et al. (33) utilizou doses menores diminuindo a mortalidade dos animais, porém mantendo a eficácia do modelo de carcinogênese esofágica. No presente estudo utilizou-se o modelo de Rubio et al. (33) e Kruel (18), administrando DEN aos camundongos, o que demonstrou factibilidade com baixo custo. As N-nitrosaminas e seus compostos são estáveis em pH fisiológico, e necessitam de ativação metabólica através de reação de hidroxilação do carbono adjacente do grupo N-nitroso, que é dependente do sistema citocromo P450. O resultado final deste processo químico é o íon diazonium que pode reagir com os sítios nucleofílicos dos constituintes celulares. A alquilação do DNA é considerada o alvo

celular final dos carcinógenos, para o início do câncer (40). Os estudos "in vitro" de Montesano et al. (41) sugerem que os compostos N-nitrosos exibem atividade biológica similar em tecidos animais e humanos. Somados a estes dados a existência prévia de modelos experimentais consagrados de esofagocarcinogênese com a DEN e a facilidade da via de administração, orientou-me na escolha deste carcinógeno.

O período de exposição de 175 dias foi decidido com base no trabalho de Rubio et al. (33) e Kruehl (18) que demonstraram presença de lesões tipo displasia grave e carcinoma "in situ" a partir de noventa dias, porém é com 180 dias que existe maior número de lesões. Experimentos com períodos maiores de exposição apresentam um aumento na mortalidade.

A diluição do carcinógeno (DEN) foi a mesma proposta por Rubio et al. (33) de 40 mg/l. A associação da cafeína com a DEN na mesma solução foi testada quimicamente e não demonstrou qualquer reação que impedisse a associação (37, 38). A dosagem da cafeína no plasma dos camundongos confirmou a validade deste modelo experimental, evitando possíveis questionamentos quanto aos níveis séricos da droga (Tabela 3). A dose de cafeína de 3 e 6 mg/kg/dia foi escolhida fundamentada nos trabalhos de Bonati et al. (23), Aldridge et al. (26) e Latini et al. (39) que estudaram a absorção, distribuição, metabolismo e excreção desta droga em ratos e camundongos. O limite da capacidade de absorção e metabolização da cafeína em camundongos é aproximadamente 10-12 mg/kg/dia. Com base nestes dados e devido à associação da cafeína com um carcinógeno potente como a DEN por um período de 6 meses, optamos por dosagens intermediárias não tóxicas, facilmente absorvidas e que casualmente são as mesmas consumidas "per capita" por dia pela população dos EUA (3mg/kg/dia) e da Inglaterra (6mg/kg/dia) estimada por Gilbert et al. (3), para um adulto de 70 kg.

Na revisão da literatura não encontramos estudos que associem a cafeína com mutações no gen p53. As mutações do gen p53 localizado no cromossoma 17p, parecem ser os passos iniciais da carcinogênese esofágica em humanos (35, 36). A proteína p53 tem um papel fundamental na homeostase da mucosa esofágica normal, que está extremamente exposta aos fatores de risco ambientais. No CEE as mutações no p53 apresentam uma forte relação com o tabaco e o álcool. Apenas 20% dos pacientes não-fumantes com CEE têm mutações no p53, em contraste com 80% dos pacientes que fumam. Esta relação não é tão clara quanto ao álcool: 32% para não bebedores e 58% para bebedores pesados. Estes dados fazem do tabaco e do álcool os principais fatores de risco para o CEE (34). A cafeína, isoladamente, não apresentou qualquer alteração macro ou microscópica na mucosa esofágica dos animais (Grupos G4 e G5) e, portanto, pode ser descartada como fator de risco para neoplasia esofágica.

A cafeína associada a compostos N-nitrosos mais especificamente a DEN, que é um carcinógeno esofágico comprovado, não apresentou, neste modelo experimental, efeito promotor ou protetor que alterasse a carcinogênese induzida pela DEN. Os resultados da avaliação microscópica expostos na tabela 6 demonstram de maneira inequívoca que a cafeína não apresentou qualquer efeito que alterasse o aparecimento ou a evolução do carcinoma induzido pela DEN.

Ficou evidente a importância do estudo microscópico do esôfago, o que corrigiu e esclareceu os resultados preliminares encontrados na macroscopia. Muitos trabalhos na literatura (2) apresentaram resultados baseados apenas na observação macroscópica, o que levou à conclusões errôneas.

CONCLUSÕES

Deste modo, neste modelo experimental em camundongos machos concluímos que:

- a cafeína não apresentou qualquer efeito sobre a carcinogênese esofágica induzida pela DEN.

- o exame microscópico é conclusivo e descarta o possível efeito protetor da cafeína, demonstrando que a carcinogênese esofágica induzida pela DEN nos animais não foi alterada pela cafeína ingerida nas dosagens de 3 e 6 mg/kg/dia.

- a cafeína não alterou a evolução das lesões precursoras do carcinoma epidermóide do esôfago induzido pela DEN nos camundongos.

- a cafeína ingerida isoladamente nas dosagens de 3 e 6 mg/kg/dia não apresentou nenhum efeito sobre a mucosa esofágica dos camundongos, na avaliação macro e microscópica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Macklin AW, Szot RJ. Eighteen month oral study of aspirin, phenacetin and caffeine in C57B1/6 mice. *Drug Chem Toxicol* 1980;3:135-63.
2. IARC Working Group. Coffee, tea, mate, methylxanthines and methylglyoxal. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1991;51:291-390.
3. Gilbert RM. Caffeine consumption. In: Spiller GA, editor. *The methylxantine beverage and foods: chemistry, consumption and health effects*. New York: Alan Liss; 1984. p. 185-213.
4. Thompson WG. Coffee: brew or bane? *Am J Med Sci* 1994;308:49-57.
5. Cole P. Coffee-drinking and cancer of the lower urinary tract. *Lancet* 1971;1:1335-7.
6. MacMahon B, Yen S, Trichopoulos D, Warren K, Nardi G. Coffee and cancer of the pancreas. *N Engl J Med* 1981;304:630-3.
7. Whitthamore AS, Paffenbarger RS Jr, Anderson K, Halpern J. Early precursors of pancreatic cancer in college men. *J Chronic Dis* 1983;36:251-6.
8. Nomura A, Heilbrun LK, Stemmermann GN. Coffee and pancreatic cancer. *Lancet* 1984;1:917.
9. Snowdon DA, Phillips RL. Coffee consumption and risk of fatal cancers. *Am J Public Health* 1984;74:820-3.

10. Mills PK, Beeson WL, Abbey DE, Fraser GE, Phillips RL. Dietary habits and past medical history as related to fatal pancreas cancer risk among Adventists. *Cancer* 1988;61:2578-85.
11. Jacobsen BK, Bjelke E, Kvale G, Heuch I. Coffee drinking, mortality, and cancer incidence: Results from a Norwegian prospective study. *J Natl Cancer Inst* 1986;76:823-31.
12. Vatten LJ, Solvoll K, Loken EB. Coffee consumption and the risk of breast cancer. A prospective study of 14.593 Norwegian women. *Br J Cancer* 1990;62:267-70.
13. Stavric B. An update on research with coffee/caffeine (1989-1990). *Food Chem Toxicol* 1992;30:533-5.
14. Barone JJ, Grice HC. Seventh International Caffeine Workshop, Santorini, Greece 13 – 17 June 1993. *Food Chem Toxicol* 1994;32:65-77.
15. Armstrong B, Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer* 1975;15:617-31.
16. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981;66:1192-308.
17. Timson J. Caffeine. *Mutation* 1977;47:1-52.
18. Kruel CDP. Classificação citopatológica das lesões precursoras do carcinoma escamoso do esôfago: modelo experimental em camundongos [tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1992.

19. Lamarine RJ. Selected Health and behavioral effects related to the use of caffeine. *J Community Health* 1994;19:449-66.
20. Suter PM, Vetter W. Kaffee und Koffein. *Schweiz Rundsch Med Prax* 1993;82:1122-8.
21. Schlegel R, Croy RG, Pardee AB. Exposure to caffeine and supression of DNA replication combine to stabilize the proteins and RNA required for premature mitotic events. *J Cell Physiol* 1987;131:85-91.
22. Nehlig A, Debry G. Potential genotoxic, mutagenic and antimutagenic effects of coffe: A review. *Mutat Res* 1994;317:145-62.
23. Bonati M, Garattini S. Interspecies comparison of caffeine disposition. In: Dews PB, editor. *Caffeine. Perspectives from recent research*. Berlin: Springer; 1984. p. 48-56.
24. Stalder R, Bexter A, Würzner HP, Luginbühl H. A carcinogenecity study of instant coffe in swiss mice. *Food Chem Toxicol* 1990;28:829-37.
25. Latini R, Bonati M, Marzi E, Tacconi MT, Sadurska B, Bizzi A. Caffeine disposition and effects in young and one-year old rats. *J Pharmacol* 1980;32:596-9.
26. Aldridge A, Parsons WD, Neims AH. Stimulation of caffeine metabolism in the rat by 3-methylcholanthrene. *Life Sci* 1977;21:967-74.
27. Arnaud MJ. The pharmacology of caffeine. *Progr Drug Res* 1987;31:273-313.

28. Khanna NN, Bada HS, Somani SM. Use of salivary concentration in the prediction of serum caffeine and Theophylline concentrations in premature infants. *J Pediatr* 1980;96:494-9.
29. Baker J. Induction of tumors of the stomach and esophagus in inbred chinese hamsters by anal diethylnitrosamine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974;146:291-8.
30. Reuber MD. Carcinoma of the esophagus in rats by diethylnitrosamine. *Eur J Cancer* 1975;11:97-9.
31. Rubio CA. Experimental models. In: Pfeiffer CJ. *Cancer of the esophagus*. USA:CRC Press; 1982. v. 3, p. 139-68.
32. Rubio CA. Epithelial lesions antedating esophageal carcinoma. Histologic study in mice. *Pathol Res Pract* 1983;176:269-75.
33. Rubio CA, Liu F, Chejfec G, Sveander M. The induction of esophageal tumors in mice: dose and time dependency. *In Vivo* 1987;1:35-8.
34. Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer* 1996;69:1-11.
35. Huang Y, Meltzer SJ, Yin J, Tong Y, Chang EH, Srivastava S, et al. Altered messenger RNA and unique mutational profiles of p53 and Rh in human esophageal carcinomas. *Cancer Res* 1993;53:1889-94.

36. Maesawa C, Tamura G, Suzuki Y, Ogasawara S, Ishida K, Saito K, et al. Aberrations of tumor-suppressor genes (p53, apc, mcc and Rb) in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1994;57:21-5.
37. Leaf CD, Wishnom JS, Tannenbaum SR. Mechanisms of endogenous nitrosation. *Cancer Surv* 1989;8:324-33.
38. Magee PN. The experimental basis for the role of nitroso compounds in human cancer. *Cancer Surv* 1989;8:205-29.
39. Latini R, Bonati M, Castelli D, Garattini S. Dose-dependent kinetics of caffeine in rats. *Toxicol Lett* 1978;2:267-70.
40. Tricker AR, Preussmann R. Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutat Res* 1991;259:277-89.
41. Montesano R, Magee PN. Comparative metabolism in vitro of nitrosamines in various animal species including man. In: Montesano R, Tomatis editors. *Chemical carcinogenesis essays*. IARC Sci Publ 1974;10:39-56.
42. Goldim JR. *Pesquisa em saúde e direito dos animais*. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre; 1995.
43. Barros SGC. *Detecção de lesões precursoras em indivíduos sob risco para o carcinoma epidermóide do esôfago: experiência com a histopatologia e a citopatologia da mucosa esofágica através de biópsias endoscópicas e do esfregaço pelo balão citológico chinês [tese]*. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1992.

44. Victora C, Muñoz N, Day NE, Barcelos LB, Peccin DA, Braga NM. Hot beverages and oesophageal cancer in southern Brazil: a case-control study. *Int J Cancer* 1987;39:710-6.
45. Montesano R, Hall J. Species and organ specificity in nitrosamine carcinogenesis. In: Likhachev A, Anisimov V, Montesano R, editors. Age-related factors in carcinogenesis. IARC Sci Publ 1985;58:173-81.
46. Druckrey H, Preussmann R, Ivankovic S, Schmähl D. Organotrope carcinogene Wirkung bei 65 verschiedenen N-nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. *Z Krebsforsch* 1967;69:103-201.
47. Viscoli CM, Lachs MS, Horwitz RI. Bladder cancer and coffee drinking: a summary of case control research. *Lancet* 1993;341:1432-37.
48. Folsom AR, McKenzie DR, Bisgard KM, Kushi LH, Sellers TA. No association between caffeine intake and postmenopausal breast cancer incidence in the Iowa Women's Health Study. *Am J Epidemiol* 1993;138:280-3.
49. Harkness JE, Wagner JE. Biologia e Manejo. In: Biologia e clínica de coelhos e roedores. 3. ed. Capítulo 2. São Paulo: Roca; 1993. p. 40-8.
50. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *N Engl J Med* 1997;336:309-16.

Effect of caffeine on diethylnitrosamine-induced esophageal carcinogenesis in mice.

Abstract

Introduction: There are still controversies on the relationship between caffeine neoplasms. The squamous cell carcinoma (SCC) of the esophagus has a high incidence rate in our region. Tobacco smoking, alcohol drinking and hot drinks such as tea, and "mate" are among the best known risk factors. There is no study in literature on the relationship between caffeine and esophageal cancer.

Aims of the study: To evaluate the effect of caffeine on SCC of the esophagus by an experimental model of esophageal carcinogenesis induced by diethylnitrosamine (DEN) in mice. Moreover, the effect of caffeine ingestion alone on the esophageal mucosa was also examined.

Material and methods: 240 male mice were allocated to five experimental groups: G1, G2 and G3 received DEN (0,04mg/l) dissolved in drinking water, three days/week. Groups G2 and G3 were also given caffeine during the remaining four days of the week at doses of 3 and 6 mg/kg/day, respectively. Groups G4 and G5 received caffeine alone dissolved in drinking water daily, at doses of 6 and 3 mg/kg/day, respectively. All animals received the same diet. After 175 days, animals were killed and their esophagus dissected. The length of each esophagus was measured, and the tumour index (TI) was calculated from the number of tumours by cm macroscopically visible. Subsequently, a microscopic examination of each specimen formalin-fixed and HE-stained was performed to detect cellular alterations from esophagitis to advanced carcinoma.

Results: By the end of the experimental period, 42, 39, 42 and 43 animals were killed in groups G1, G2, G3, G4 and G5, respectively. The calculated TI were: G1=67,13;; G2=49,42; G3=69,84. There was a macroscopically significant difference when compared group G2 and G1 with G3 ($p < 0,05$), that suggests a protective effect of caffeine when ingested in high doses. Groups G4 and G5 did not show macroscopic tumours. Microscopic examination confirmed the absence of neoplasms or other alterations on the esophageal mucosa in groups G4 and G5. Microscopic examination did not detect differences between groups G1, G2 and G3 regarding the presence of esophageal carcinoma.

Conclusion: Caffeine did not show any effect on esophageal carcinogenesis induced by DEN in the mice

Key words: Esophageal neoplasm, squamous cell carcinoma of the esophagus, esophageal carcinogenesis, caffeine, nitrosamines, experimental model.

INTRODUCTION

The squamous cell carcinoma of esophagus (SCCE) has high mortality rates and a peculiar regional distribution (43). SCCE etiology is clearly related to tobacco smoking and alcohol drinking. Other etiology factors have been identified: hot teas, herbs containing carcinogens and mainly N-nitroso-compounds (44).

Nitrosamines have been known as the most important carcinogens to induce esophageal cancer since Duckery et al (46) demonstrated the development of esophageal carcinoma in rats that received N-metil-N-nitrosoaniline. It is considered that the nitrosus compounds exert their effect acting on the cell biochemistry and genetics, leading to DNA alterations which impair repair and replication events and give rise to pre-malignant lesions and later the squamous cell carcinoma (45).

Esophagous carcinogenesis was studied by Rubio et al. (31) in an experiment where the author induced SCCE in mice by the administration of diethylnitrosamine (DEN) diluted in their drinking water. Histological findings showed that the esophagous of these animals present from esophagitis to carcinome.

A relationship between the ingestion of coffee and the development of neoplasias was first described more than 20 years ago, when an association between coffe consumption and urinary bladder cancer was suggested (47).

There is controversy on the role that coffee and particularly caffeine have as a protective or promoting factor for carcinogenesis. The action of this compound seems to be dose-dependent, though divreging results have been published by several groups(48, 24).

Coffe and caffeine may interact with several other mutagenics and their effects are synergistic with X-Rays, UV-light and some chemical compounds. On the other hand, caffeine may inhibit the mutagenic effect depending on the moment it is administered in relation to the chemical compound being used (22).

Several studies involving caffeine effects on experimental animals were critically analised by the IARC (2). The great majority of these experiments assessed the putative promoting or protecting effect of caffeine on urinary bladder, pancreas, liver, breast and lungs associated or not to well known carcinogens. There is no report on studies which analised specifically the action of caffeine on the esophageal mucosa.

The estimation of caffeine consumption per inhabitant shows an important variatiability among different countries, but despite this, its intake is gradually increasing world-wide (2).

In the present study, the effect of caffeine on esophageal carcinogenesis using a well known experimental model for carcinogenesis in mice was tested. Also, the effect of caffeine on the carcinogenesis induced by DENs was analysed, and its action alone on the esophageal mucosa was assessed.

MATERIAL AND METHODS

The sample

Two hundred and forty male mice (*Mus musculus*) CF1 were obtained from the Production and Health Research State Foundation -FEEP- Animal and production Unit of Rio Grande do Sul. All animals were 3 month old and weighted, in average, 43,43g at the beginning of the experiments. During the whole experimental period animals were housed at the FEEP's animal facilities.

Mice were weaned when they were 21-days old. After weaning the animals were given Nuvilab CR1 chow (Appendix 5) "ad libidum". Chow was topped twice daily and changed once/week. A 12h light /dark cycle was maintained throughout the experiment, with continuous air flow, environmental relative humidity and temperatures ranging from 5 to 34°C. The 240 males were allocated to five experimental groups of 48 animals, which were housed in 12 plastic cages, each containing 4 mice. Cages were closed with a metal grid, their bottom was covered with bedding and they were cleaned three times/week. Animals were given tap-water from the City of Porto Alegre Water and Swage Department -DMAE. The volume of liquid that the animals received varied according to the experimental group they were allocated. The five experimental groups are described below and summarized in table 1:

Group 1: Consumption of DEN in drinking water (0,04ml/1000ml) from Monday to Wednesday (3days/week) + diet. From Thursday to Sunday consumption of water+diet.

Group 2: Consumption of DEN (0,04 ml/1000ml) from Monday to Wednesday (3days/week) + caffeine at the dose of 6mg/kg/day also dissolved in drinking water +diet. From Thursday to Sunday consumption of caffeine at the same dose and dissolved in water as before + diet.

Group 3: Consumption of DEN (0,04ml/1000ml) dissolved in drinking water from Monday to Wednesday (3days/week) + caffeine at the dose of 3mg/kg/day dissolved in

drinking water + diet. From Thursday to Sunday consumption of caffeine at the dose of 3mg/kg/day dissolved in drinking water + diet.

Group 4: Consumption of caffeine at the dose of 6mg/kg/day dissolved in drinking water daily + diet.

Group 5: Consumption of caffeine at the dose of 3mg/kg/day dissolved in drinking water daily + diet.

The study lasted for six weeks, starting from 10th, June 1997. By the end of this period all animals were killed. There was no control group of mice receiving water and diet alone, because this was considered unnecessary and unethical by the postgraduation committee that approved the present experimental project.

TABELA 1. Drinking solutions by group week schedule.

	weekdays	
	mon – wed	thu - sun
Group 1	DEN	WATER
Group 2	DEN + CAFFEINE 6	CAFFEINE 6
Group 3	DEN + CAFFEINE 3	CAFFEINE 3
Group 4	CAFFEINE 6	CAFFEINE 6
Group 5	CAFFEINE 3	CAFFEINE 3

Solutions:

DEN, diethylnitrosamine (Sigma Chemicals Co, St. Louis, USA; C₄H₁₈N₂, cat. no: 0756, 25ml, d: 0,95g/ml, FW: 102.1) was dissolved at the ratio of 0,04 ml in 1000ml, in water at room temperature. The final solution was stored in plastic bottles under refrigeration as described by Kruehl (18). Water consumption/cage was 25-30

0,04ml/1000ml or 0,00004ml/ml, one can consider that each animal ingested 0,0002ml/24hs. This final solution was poured in plastic bottles fitted with lids suitable for animals consumption and given "*ad libidum*" for 24 hs continuously, as described for each group. The bottles were never left totally empty of its contents. Consumption per cage was measured weekly (Appendix 1).

Pure powder of anidrous caffeine, 7-methyltheobromine or 1,3,7 trimethylxantine is made by Merck laboratories (Coffein Rein, Merck, Darmstadt, Germany) -250g bottle- and was imported from Germany. Caffeine was dissolved in water at room temperature at the concentration described for each experimental group. The amount of caffeine for each solution was defined based on the average water consumption per mouse daily, taking into account their weight and age at the beginning of the experiments. The calculation was based in the average water intake in 24 hs for each 100g of mouse body weight, which equals to 15ml (49). Considering that the average weight of each animal by the beginning of the experiments was 43,34g and there were 4 animals in each cage (Table 2) the approximate water intake was 26 ml/ cage/ 24 hs. These values were checked by calculating water consumption based on the average intake per animal at 3 month old which is 5-6 ml/ 24 hs; thus, 4 animals in each cage consume approximately 25-30 ml/ 24hs.

Caffeine concentration dissolved in drinking water was calculated according to the values determined for each group: groups G2 and G4 = 6 mg caffeine / kg mouse / 24 hs (6 mg/ Kg equals 0,006 mg / gr) and groups G3 and G5 = 3 mg caffeine / kg mouse / 24 hs. These solutions were kept and stored in plastic containers. Caffeine solubility in water is 1g/46 ml at 20 degrees Celsius. Based on the data presented, the daily caffeine consumption per cage in groups G2 and G4 (6 mg) is 1,2 mg caffeine / 30 ml water or 40 mg caffeine / 1000 ml water; in groups G3 and G5 (3 mg) caffeine concentration in the final solution is half of that value: 0,6 mg / 30 ml or 20 mg / 1000 ml.

The standard solutions used in the experiment were as follows:

	WATER (ml)	DEN (ml)	CAFFEÍNE (mg)
G1	5.000	0,2	ZERO
G2	5.000	0,2	200
G3	5.000	0,2	100
G4	17.000	ZERO	680
G5	17.000	ZERO	340

Data Collection

Mice were weighted four times during the experimental period. Dates and average weights are shown in table 2. Overall weight average per animal at the beginning (43,43 g) through to the end (44,33 g) of the experimental period remained basically unaltered, despite variations that occurred among the different groups along the study.

TABLE 2 - Average weight per mouse along the experimental period.

roup/Temp	G1	G2	G3	G4	G5
Day 01	42,75 \pm 0,88	43,48 \pm 1,93	43,93 \pm 1,46	44,15 \pm 3,43	42,78 \pm 2,77
Day 60	44,83 \pm 1,76	45,08 \pm 3,38	46,10 \pm 2,16	46,85 \pm 3,47	45,50 \pm 3,12
Day 137	44,15 \pm 1,64	44,38 \pm 2,34	44,83 \pm 0,99	46,98 \pm 3,59	45,58 \pm 2,36
Day 175	43,95 \pm 2,29	42,10 \pm 1,75	41,95 \pm 2,56	47,38 \pm 2,94	47,30 \pm 3,03

* weight in grams

The water intake and of all other solutions offered to the animals in the different experimental groups was measured making it possible to calculate the ingested volume per animal in each group. Appendices 3 and 4 show data on the volumes of water and solutions consumed in each group per week throughout the experimental period.

The caffeine absorption by the animals was further checked by seric assessment of caffeine concentrations in a group of 36 animals bred isolated, mimicking exactly groups G4 (18 animals) and G5 (18 animals) used in the experiments. Seric caffeine values of these animals were assessed by a special kit made by Syva-Merck laboratories (California, USA), EMIT- enzyme multiplied immunoassay technique. Blood samples were collected by poen heart-puncture, immediately after sacrifice of the animal by ether inhalation as described bellow. Blood samples were performed during daytime (9-10 a.m.) in 9 animals of each group (G4 and G5) and at night (11-12 p.m.) in the others animals of this groups (G4 and G5) beacuse of the nocturnal habits of these rodents. After sampling, blood was centrifuged and plasma caffeine measured . Marked differences in values were observed related to the period of the day when blood was collected and the experimental group.

TABLE 3 - Average caffeine concentration in plasma of experimental mice.

	<i>GROUP 4 (caffeine 6)</i>	<i>GROUP 5 (caffeine 3)</i>
Day	0,32 ± 0,06	0,38 ± 0,05
Night	0,74 ± 0,18	0,71 ± 0,16

(microgram/ml)

These results confirmed the need of nocturnal blood samplings, as during daytime animals are not active and do not ingest the solutions and the caffeine drunk during the night has already been partially metabolised and excreted.

Dropouts and sacrifice

At the beginning of the study there were 240 animals allocated in to five experimental groups of 48 mice each (12 cages containing four mice each). By the end of the experiment, the number of animals in each group was as follows: G1=42; G2=39; G3=43; G4=42; G5=43. There 31deaths (12,92%) of which, 17 animals died in the last 4 weeks of the study.

By the end of 25th week of the experiment, 209 animals were killed by ethylic ether inhalation in a closed glass chamber (42). The period of time between the animal's death and the removal of organs was less than five minutes. Selection of which animals should be killed was determined randomly by cages. Then, dead animals were fixed up a polystyrene board and necropsy was carried by a mediam incision from the submandible region to the pubic bone. Laparotomy was performed in a single field starting from the abdomen towards the head with hiatus diaphragm opening and sternotomy under straight visualisation of the mediastin structures with dissection and distal traction of the esophagous already identified and preserved (Figure 1). Inside the thorax, the esophagous was carefully dissected from the posterior mediastinum up to the upper cervical region (hipopharynx) and cut. Distaly, it was sectioned 5 mm below the esophago-gastric junction, which, in the mouse is called pre-esophago-gastric juntion. The esophagous was then, spread out and fixed in a thin cork with needles and placed with its inner-side down in a labelled plastic container containing 10% buffered formaline solution. The following organs were also removed, placed in the formalin and stored for future studies: liver, kidney, spleen, pancreas, urinary bladder and stomach.

Preparation and assessment of the material

Macroscopic examinations

The esophagous of each animal was fixed in formaline solution and stretched on the cork board. It was measured and opened longitudinally with with a pair of

microsurgery scissors and pliers. Subsequently the esophagus was stained by immersion in toluidine blue for 30 seconds (Figure 2) and the number of unstained lesions at the esophageal mucosa was counted under stereoscope-dissecting microscope by two independent observers. Lesions were usually seen without the use of a stereoscope, mainly the polypoid ones (Figure 3). These results were recorded on individual sheets (Appendix 6) and Rubio's tumor index was calculated (number of tumors / cm esophagus), as previously described by Kruel (1992).

Microscopic examination:

The formalin-fixed esophagus of each mouse was rolled over itself from its distal end to produce longitudinal sections that exhibited the longitudinal profile of the organ and embedded in paraffin. Later, slides were prepared and stained with haematoxylin and eosin (HE) for microscopic examinations under light microscope (Figure 4). A pathologist, who was unaware of which group the samples belonged to, has examined the slides. This material was assessed for the presence or absence of neoplasms and its histological characterization. Moreover, the carcinoma was classified according to degree of wall invasion as mucosa (Figure 5), muscularis mucosae, submucosa (Figure 6) and muscularis propria. When more than one lesion was present in the same esophagus, classification was based on the most invasive tumor. Additional changes in the esophageal mucosa such as hyperplasia, papilloma and low or high-degree dysplasia were also assessed. The author personally carried out the examination of each slide and recorded the observations in a proper form.

Statistics

The macroscopic examinations where Rubio's tumor index was studied, the non-parametric test of Kruskal-Wallis and significance level of 1% for the calculation of the differences among the medians of groups G1, G2 and G3 were employed. In groups G4 and G5 the tumor index was zero (total absence of tumors).

For the microscopic examinations, the ANOVA and Pearson's Chi-square test were used with a significance level of 5%. The statistical programme used was Statistical Package for Social Science (SPSS) version 6.0.

RESULTS

General Observations:

Of a total of 240 animals, macro and microscopic examinations were performed on the esophagus of 209 animals, since 31 (12,92%) of them died along the 175-day experimental period.

The mice that ingested caffeine showed a more dynamic behaviour. Body-weight did not show any significant difference among the different experimental groups at the beginning and by the end of the study ($p > 0,05$). Groups G4 and G5 that were not given DEN, showed a slight body weight gain compared to their initial values, whereas animals from groups G1, G2 and G3 that ingested the carcinogen (DEN) maintained the same weight or showed a slight loss. (Table 2).

Solutions Intake:

Results showed that in groups G1, G2 and G3, in the first part of the week (mon-wed) when DEN was present in the drinking solution associated or not to caffeine, the volume consumed was smaller, than the consumption observed for groups G4 and G5 where animals received only the caffeine solution (table 4).

Macroscopy (Tumor Index-TI)

The average esophagus length of the mice varied between 32 and 43 mm and it did not show any significative difference among the groups.

Macroscopic examination of the esophagus of animals from groups G4 and G5, did not detect the presence of any tumor (TI= zero).

Tumor Index was calculated from the esophagous of animals from groups G1, G2 and G3 was 67,13; 49,42; and 69,84; respectively. There was a significant difference (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$) between group G2 and groups G1 and G3.

Table 4 - Average volume (ml) of solutions ingested per mouse, according to the period of the week, along the 25 experimental weeks.

	mon – wed	thu – sun
G1	23,68 ± 1,93	41,22 ± 5,38
G2	28,74 ± 2,87	43,86 ± 10,12
G3	28,02 ± 2,90	45,08 ± 8,02
G4	33,84 ± 2,73	51,98 ± 8,67
G5	33,85 ± 2,76	51,95 ± 8,80

Microscopy

The microscopic examination of the esophagous of animals from groups G4 and G5 did not show any histological alterations, confirming the macroscopic findings. On the other hand, microscopic examination of the esophagous of animals from groups G1, G2 and G3 showed a large number of tumors. Similar results were obtained in all three groups. The several histological alterations were analyzed by Pearson's qui-square test and they were classified as normal or non-neoplastic: hyperplasia, esophagitis and papilloma.

Table 5 - Results from microscopic examination of the esophagus from animals from groups G1, G2 and G3, regarding the presence of neoplams

<i>Groups</i>	<i>Neoplasia</i>	<i>Ñ Neoplasia</i>	<i>TOTAL</i>	<i>Valor p*</i>
G1	36 (85,7%)	06 (14,3%)	42	
G2	33 (84,6%)	06 (15,4%)	39	0,87
G3	38 (88,4%)	05 (11,6%)	43	

*p<0,05

No significant difference was observed among the microscopic findings, regarding the presence of esophageal carcinoma, from groups G1, G2 and G3 (p= 0,87) .

When the same data was analyzed considering low degree dysplasia as a non-neoplastic lesion, results also show no statistical difference among the experimental groups G1, G2 and G3.

Consequently, macroscopic differences in the tumoral index observed between groups G1 and G3 in relation to G2, were not confirmed by the microscopic examinations. This observation demonstrates that the neoplams was equally present in groups G1, G2 and G3, however it was not visible to the naked eye because it was in its initial stages of development.

The results from all alterations observed in the microscopic examinations of each of the five experimental groups are recorded in Table 6.

Table 6- Results of the microscopic examination of the esophagus in each group.

	G1	G2	G3	G4	G5
NORMAL	5 (11,9%)	3 (7,7%)	4 (9,3%)	41 (97,6%)	41 (95,3%)
HIPERPLASIA	0	1 (2,6%)	0	0	0
ESOPHAGITIS	1 (2,4%)	2 (5,1%)	1 (2,3%)	1 (2,4%)	2 (4,7%)
PAPILOMA	0	0	0	0	0
DISPLASIA	4 (9,5%)	1 (2,6%)	4 (9,3%)	0	0
LOW GRADE					
DISPLASIA	5 (11,9%)	1 (2,6%)	1 (2,3%)	0	0
HIGH GRADE					
INVASOR CA	7 (16,7%)	11 (28,3%)	7 (16,3%)	0	0
MUCOSA					
INVASOR CA	12 (28,6%)	14 (35,9%)	19 (44,2%)	0	0
MUSC. MUC.					
INVASOR CA	6 (14,3%)	4 (10,3%)	5 (11,6%)	0	0
SUBMUCOSA					
INVASOR CA	2 (4,8%)	2 (5,1%)	2 (4,7%)	0	0
MUSC. PROP.					
TOTAL	42	39	43	42	43

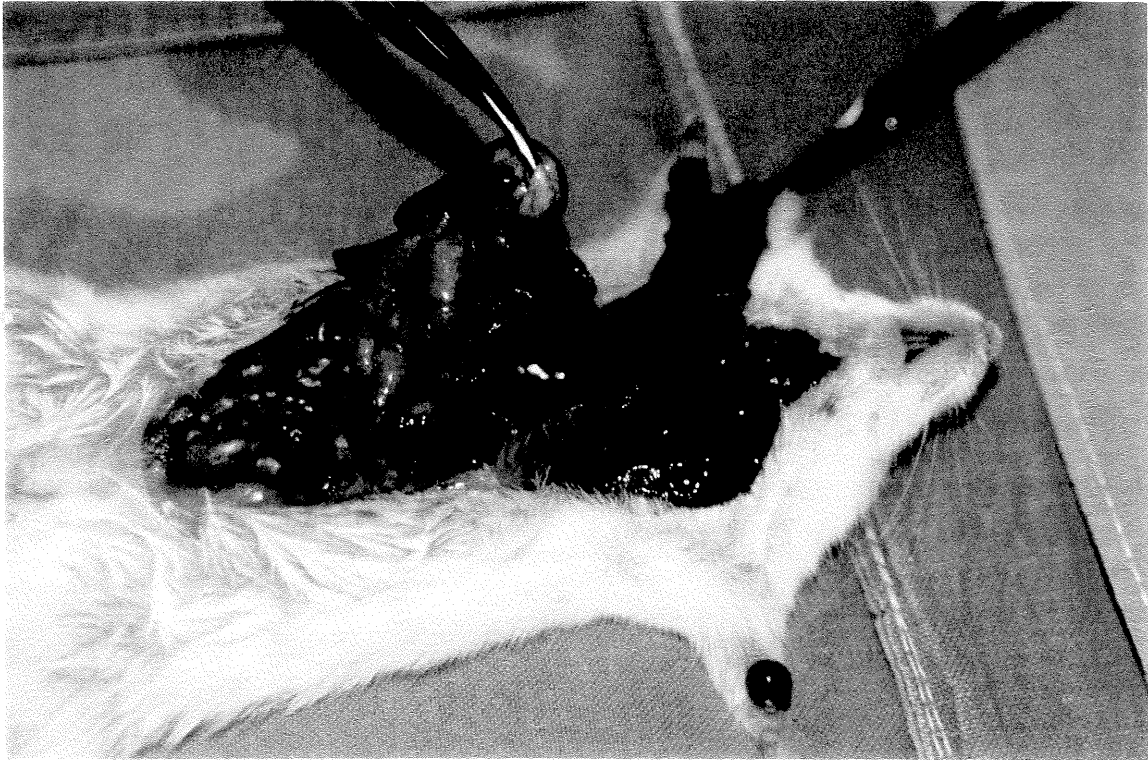


Figure 1 – Photograph of esophageal dissection in mice.

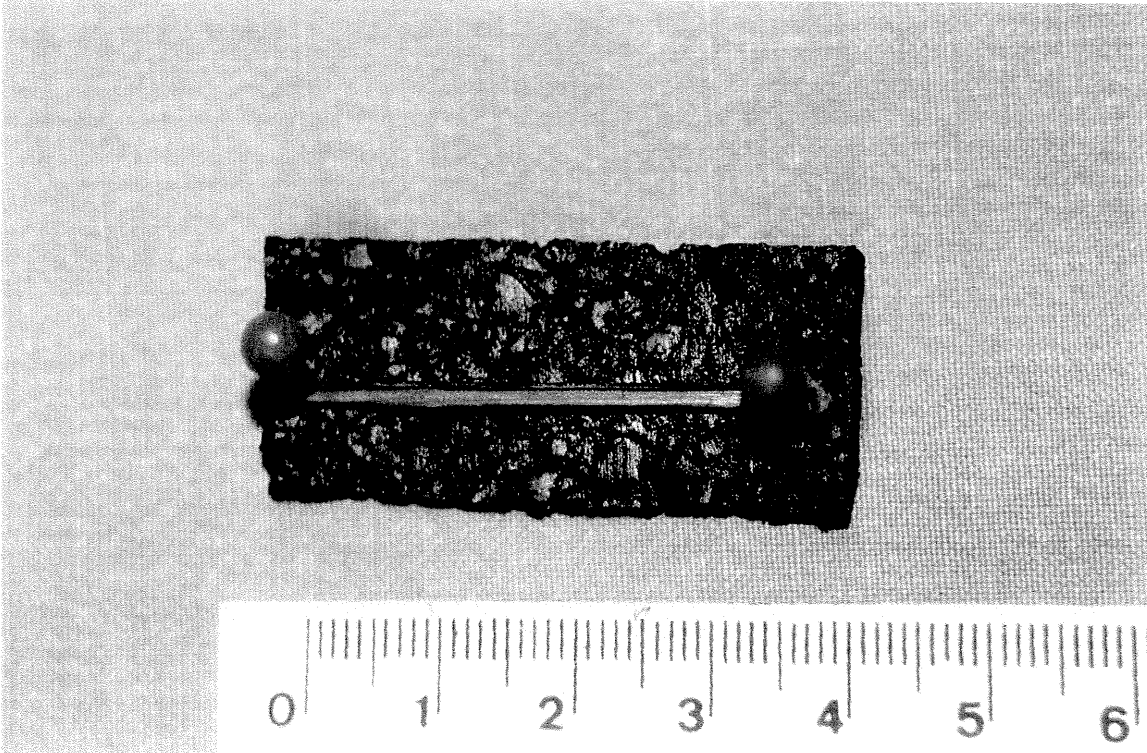


Figure 2 – Gross anatomy of normal esophagus in mice

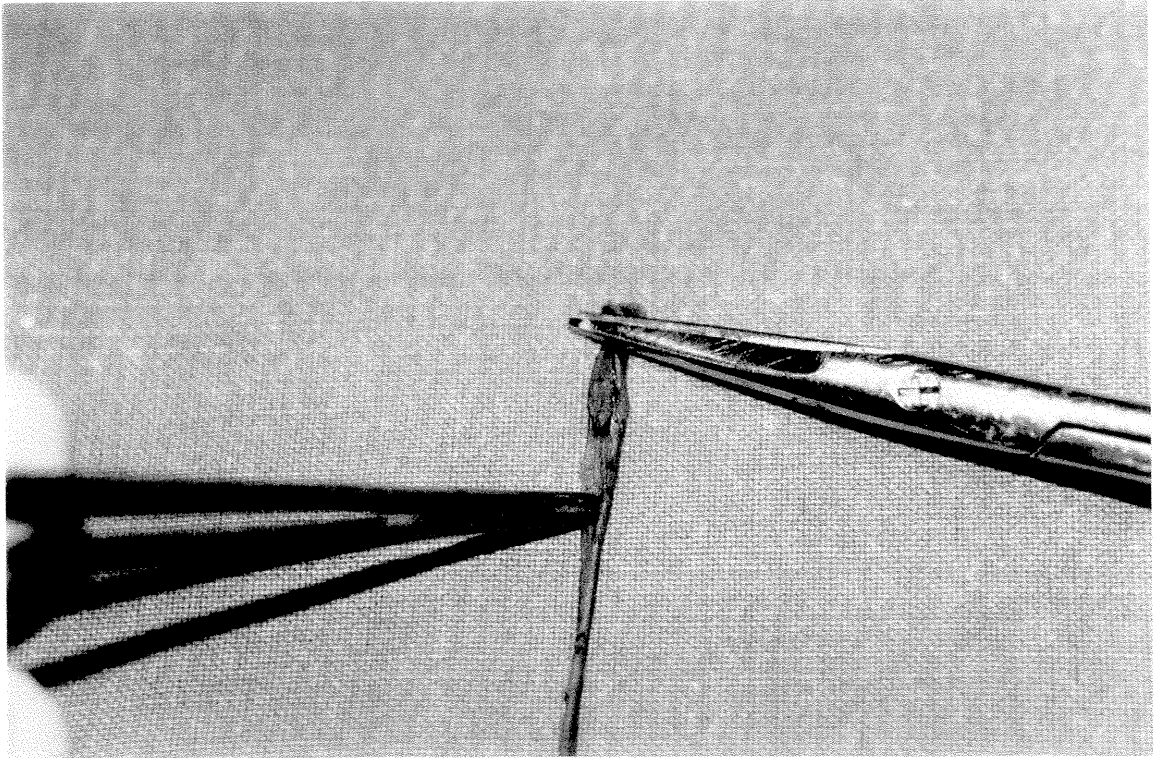


Figure 3 – Gross anatomy of the esophagus of a sample animal from group G2. A vegetating lesion can be observed.



Figure 4 – Microphotograph of the normal esophageal wall in an animal from group G5. Mucosa (m), submucosa (sm), muscularis mucosae (mm) e muscularis propria (mp), can be observed. HE 250x

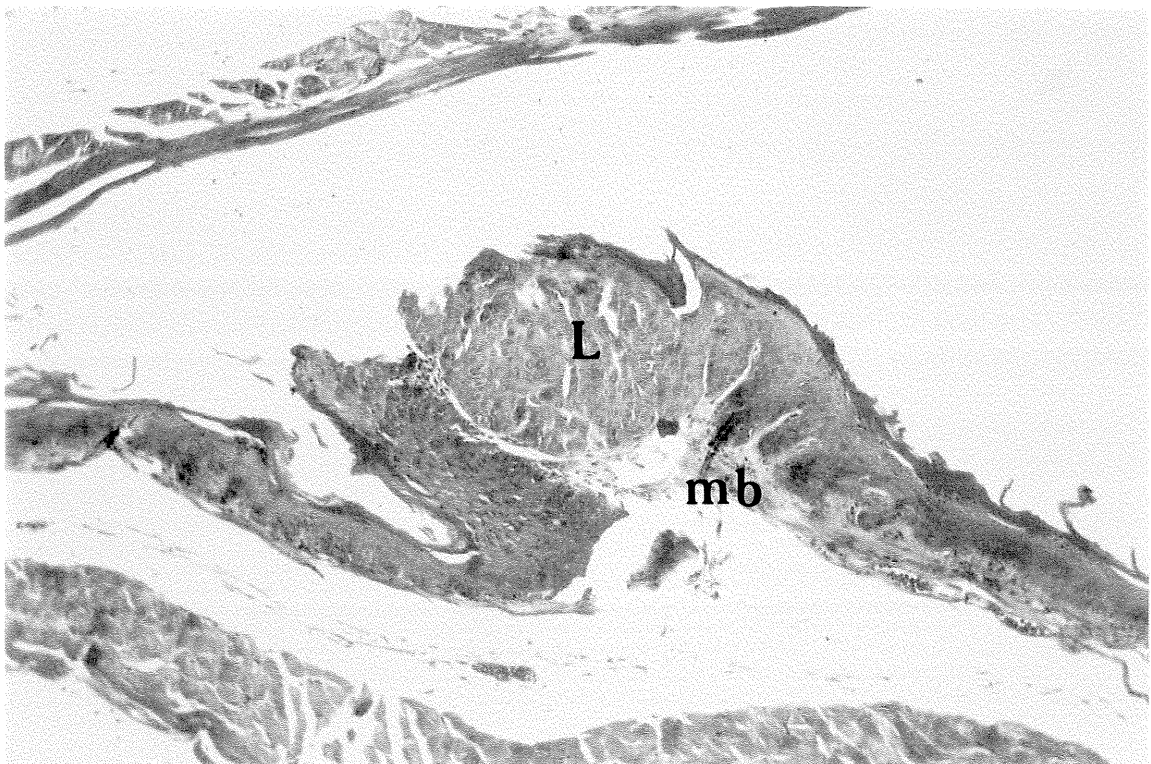


Figure 5 – Microphotograph of the esophagus of an animal from group G2. An intraepithelial squamous lesion (L) can be observed. HE 100x

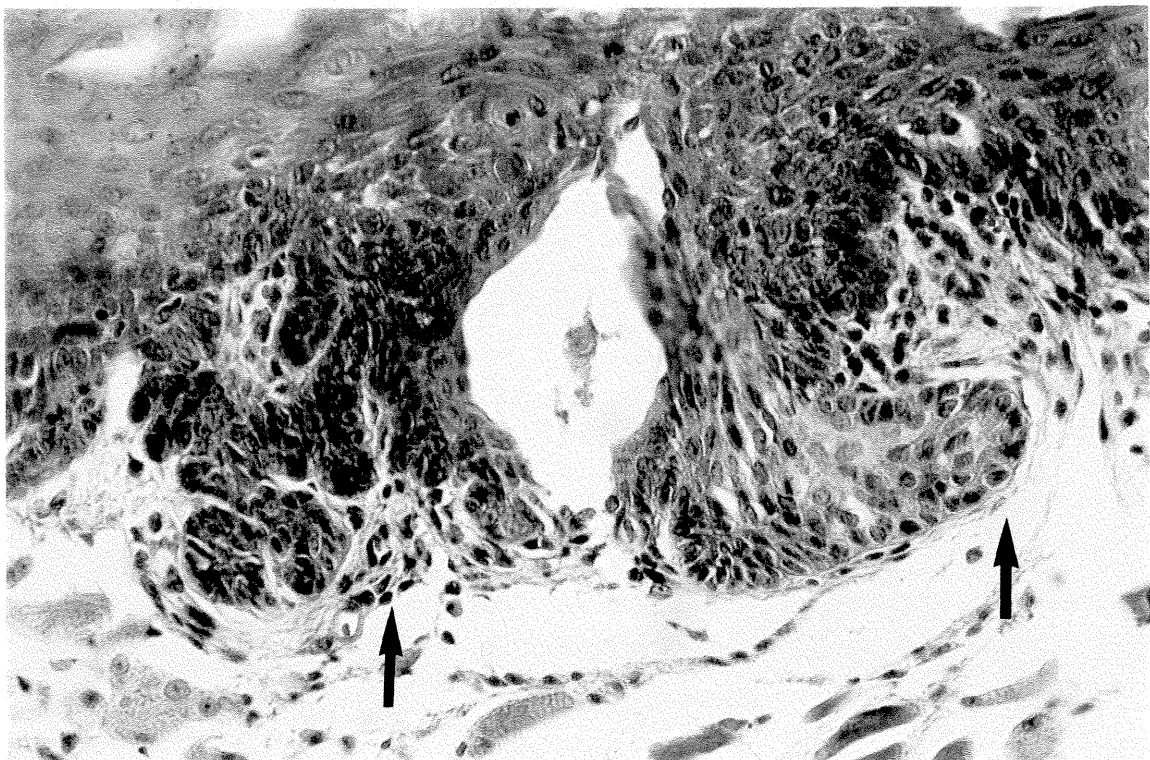


Figure 6- Microphotograph of the esophagus of a sample from group G3. Neoplastic invasion by squamous cells can be observed in the submucosa (arrows). HE 250x

DISCUSSION

Caffeine has been used in several experiments aiming to modify the activity of well known carcinogens (1). Only a few experimental studies analyzed the possible carcinogenic effect of caffeine itself and an important proportion of these experiments were inadequate for several reasons, among them: short period of time of exposure to caffeine and deficient histopathological evaluation. Caffeine was tested as a carcinogen by oral ingestion in five studies in rats. In two of them, there was no significant difference in relation to the presence of tumors in the organs examined in comparison with controls, and the other three were inadequate for analysis. The administration of caffeine in association with well known carcinogens presented different results. There was a decrease in lung tumors in mice treated with urethane and in breast tumors in rats treated with diethylestilbestrol. Caffeine did not affect the incidence of urinary bladder tumors induced by N-nitrosous compounds or pancreatic tumors induced by N-butylamine in rats (2).

Approximately 80-90% of the caffeine extracted from the coffee green beans is used in the soft drinks industry and the remaining together with synthetic caffeine is used by the pharmaceutical industry (2). In the U.S. caffeine consumption per inhabitant was estimated to be 35 mg / day only the ingestion of soft drinks and similar drinks (3). Coffee consumption in that country exceeds 100 billion cups of coffee per year, corresponding to 125 mg of caffeine per consumer/ day, which puts caffeine as the most commonly used drug in America (4).

The association between coffee and cancer was first brought up by two case-controls studies, one of them suggesting the relationship with urinary bladder neoplasms (5) and the other one with pancreas carcinoma (6). These studies had some weak points which did not allow their results to be presented as conclusive. Several other clinical studies were performed and published (7, 8, 9, 10, 11) showing controversial results on the association between coffee and pancreatic cancer.

A prospective study developed by Vatten et al. (12) on 14.593 Norwegian women, suggests that coffee consumption reduces the risks of breast cancer in slim women, having an opposite effect in obese women. The decrease in the risk for breast cancer may be associated to a reduction in the seric levels of estrogens in heavy caffeine consumers (>6 cups of coffe / day) (14). The putative interference of the estrogen seric levels with the action of effects of caffeine, led us to use only male mice for our experiments. Thompson et al. (4) concluded that the best and largest studies reviewed by him showed that coffee and caffeine are harmless as risk factor for the development of cancer. Suter et al. (20) reports that several biomedical aspects of caffeine were still not clarified, however it seems that clinically there are no restrictions to its moderate consumption, with one exception : "the coffee braek" being used as an excuse for smoking.

An extensive review on the research works done on coffee and caffeine was published by Stavric et al. (13). The author reports a possible association between caffeine and and the increased risk of urinary bladder cancer in humans, as well as a decreased risk for colon cancer among heavy consumers of coffee. Further, the same review points out that there is no theoretical explanation for these phenomena and that, despite the fact that high doses of coffee and caffeine may decrease the risk of neoplams, it increases mortality by coronary diseases.

Caffeine was included in a large group of risk factors for cancer, it may act as a potential carcinogen or as a co-carcinogen (15, 16). Caffeine is considered a carcinogeneic agent for bacteria and fungi, but not for humans when taken in regular doses (17). The last author lists several reasons against the mutagenic effect of caffeine in humans: it is rapidly metabolized, it shows a remarkable anti-mitotic action decreasing the chances that an affected cell divides successfully, and it is for such a long time in contact with human beings that deffence mechanisms should already have been built up to counteract its possible mutagenic effects (17).

The anti-mitotic action of caffeine may explain why in our experiment there was a significant difference in the macroscopic examinations (tumoral index) between

groups G2, that ingested DEN + caffeine 6mg and showed lower tumoral index suggesting a protective effect of caffeine in higher doses; and group G3, that ingested DEN + caffeine 3mg and showed higher tumoral index. In the microscopic examinations no significant difference was obtained between groups G2 and G3. The time between the beginning of the neoplasm and the sacrifice of the animals may have added to the non-detection of the anti-mitotic effect of caffeine. According to the work reported by Krueel (18) who studied a similar model of esophageal carcinogenesis induced by DEN in mice, moderate and high grade dysplasias and "in situ" carcinoma started appearing after the 90^o experimental day. As we killed our animals at the 175^o experimental day, the neoplasm was easily identified during microscopic examination in groups G1, G2 and G3. However, it was still not visible at the macroscopic examination in some animals of group G2.

The caffeine also has antimutagenic effects that occur at the level of protein synthesis (21). The proposed mechanism how it acts is through the stabilization of extremely fragile proteins by inhibition of the cyclic AMP phosphodiesterases or by linkages to the methylxanthine structure still not well defined (22). Experimental studies on animals did not show a carcinogenic effect of caffeine, they point out however that this compound may act synergistically together with some chemical carcinogens, increasing their carcinogenicity (19). A large number of experiments on animals (rodents) where caffeine was given by oral administration associated with well known carcinogens such as N-nitrosus, benzopyrene, uretane, 2-acetil aminofluoreno, diethylestilbestrol among several others were reviewed and listed by IARC (2). The majority of these experiments studied target organs such as: pancreas, mammary glands, urinary bladder, lungs, liver, skin and stomach. Most of the results showed a decrease or no effect of caffeine in relation to the number of tumors observed, however in more than 80% of the experiments, the observations were macroscopic only. There is no other report describing the effects of caffeine, associated or not to a carcinogen, on esophageal neoplasm.

The caffeine is easily and completely absorbed from the gastrointestinal tract, it is distributed to all body fluids and is present in all tissues in 5 minutes. The proportion of caffeine bound to plasma proteins is 10-30%. Its half-life in mouse and rats is 0,7-1,0 hour (23). These data were confirmed in our experiment, since we observed a higher seric concentration of caffeine during nocturnal period, when animals are more active and ingest more of the solution (Table 2). The number of animals per cage was reduced to four in the present study in order to diminish the aggressions among mice in the same cage, which become more often when caffeine is given to the animals, a potent stimulant of the central nervous system. This attitude avoid several losses along the experiment. Physical and metabolic activity is stimulated by the ingestion of the drug, which results in a higher energy loss by the animals (24). The last author did not observe any carcinogenic effect of caffeine and coffee in mice, despite the high doses that they were given.

The caffeine is metabolized in the hepatic microsomal system of mice by a demethylation reaction. This reaction is age-related, decreasing as the animal gets older, allowing so an increase in the half life of caffeine in adult mice (25). P450 inductors such as 3-methylcolantrene, increase caffeine clearance, decreasing its half life (26). Caffeine increases diuresis by inhibiting the release of anti-diuretic hormone (2), which explains the higher fluid consumption in the groups that received solutions containing caffeine, mainly groups G4 and G5 that ingested the caffeine containing solutions every day of the experimental period. In humans, a small percentage (0,5-4%) of the ingested dose of caffeine is excreted unaltered in the urine (27). It is also excreted in the bile (27) and it is found in the saliva in concentrations that correspond to 65-85% of the value found in the plasma (28).

The finding that nitrosamines present a defined organotropism allowed the development of carcinogenesis study models in several organs, among which the esophagous. Many authors: Baker et al. (29), Reuber et al. (30) and Rubio et al. (31, 32) used diethylnitrosamines to induce esophageal carcinogenesis. The doses initially employed had a high hepatotoxicity and nephrotoxicity. Rubio et al. (33) used lower doses

decreasing the animals mortality, keeping however the efficiency of the esophageal carcinogenesis model. The present study employed the models developed by Rubio et al. (33) and Krueel (18), giving DEN to mice at low costs and easy feasibility. The N-nitrosamines and their compounds are stable at physiologic pH and they need metabolic activation by the hydroxylasation reaction of the carbon next to the N-nitrous group, which is dependent on the P450 cytochrom system. The end result of this chemical process is the diazonium ion that can react with the nucleofilic sites of the cell constituents. DNA alchilation is considered the cellular end target of all carcinogens to start the cancerous process. (40). The "in vitro" studies developed by Montesano et al. (41) suggest that the N-nitrous compounds have a similar biological activity in animal and human tissues. Together with these results, the previous availability of well know experimental models for esophageal carcinogenesis using DEN and the easiness to administer it to the animals led us to chose this carcinogen in the present study.

The period of time that animals were exposed to the drug, 175 days, was decided based on the studies published by Rubio et al. (33) and Krueel (18) where the authors demonstrated the presence of lesions type high grade dysplasia and "in situ" carcinoma after 90 days of starting the treatment. However, it is after 180 days after starting the treatment that the highest number of lesions are observed. Experiments with longer duration of treatment show high rates of mortality.

The dilution of the carcinogen was the same as suggested by Rubio et al. (33), namely 40 mg /ml. The association of caffeinne and DEN in the same solution was tested chemically and did not show any reactions that would prevent it being used together (37, 38). The concentration of caffeinne in the plasma of the mice confirmed the feasibility of this experimental model, avoiding possible doubts on the seric levels of the drug (Table 3). The caffeinne doses of 3 and 6 mg/ kg/ day were chosen based on the work developed by Bonati et al. (23), Aldridge et al. (26) and Latini et al. (39). These authors studied the absorption, distribution, metabolism and excretion of this drug in rats and mice. The limit of the metabolization and absorption capacity in the mice is approximately 10-12 mg/ kg/ day. Based on these data and due to the

association of caffeine with a potent carcinogen such as DEN for a period of six months, we decided to use non-toxic, intermediate dosages of caffeine, which are easily absorbed. Coincidentally, these dosages of caffeine are the same as those estimated by Gilbert et al. (3), consumed by Americans (3mg/kg/day) and British (6mg/kg/day) for an adult weighing about 70 kg.

In the review of the pertinent literature we did not find any study which associated caffeine with mutations in gene p53. Mutations of gene p53 localized on chromosome 17p, seem to be the first stages of esophageal carcinogenesis in human (35, 36). The protein p53 has a fundamental role in the homeostasis of the normal esophageal mucosa, being extremely exposed to environmental risk factors. In SCCE mutations of p53 show a strong correlation with tobacco and alcohol. Only 20% of non-smoking patients with SCCE have mutations on p53 in contrast with 80% of the smoking patients. This relationship is not so clear when regarding alcohol consumption: 32% for abstinent and 58% for heavy drinkers. These data make tobacco and alcohol the two main risk factors for SCCE (34). Caffeine on itself did not cause any alteration at the macro or microscopic level on the esophageal mucosa of the animals (Groups G4 and G5) and consequently can not be considered a risk factor for the esophageal neoplasm.

The caffeine associated to N-nitrosus compounds, namely to DEN, which is a proven esophageal carcinogen, did not show at the present study, a promoting or protecting effect which would have altered the carcinogenesis induced by DEN. The results obtained from the microscopic examinations shown in Table 6, demonstrate unequivocally that caffeine did not have any effect in the development of a carcinoma induced by DEN.

The relevance of the microscopic evaluation of the esophagus became obvious as it clarified preliminary ambiguous results obtained from the macroscopic examinations. Several studies in the literature (2) show results based only on macroscopic findings, which led the authors to wrong conclusion.

CONCLUSIONS

The final evaluation of the results obtained in the present study allow us to conclude:

-The caffeine did not show any effect on the esophageal carcinogenesis induced by DEN in mice.

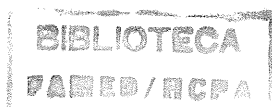
-The microscopic examination is conclusive and refutes the putative protective role of caffeine. It demonstrates that the esophageal carcinogenesis induced by DEN in the animals is not affected by the caffeine consumed in the given dosages of 3 and 6 mg/ kg / day.

-The caffeine did not altered the evolution of the precursor lesions for the epidermoid esophagous carcinome induced by DEN in the mice.

-The caffeine ingested alone at the doses of 3 and 6 mg/kg/day did not show any effect on the esophagous mucosa of the mice, both in macro and microscopic examinations.

REFERENCES

1. Macklin AW, Szot RJ. Eighteen month oral study of aspirin, phenacetin and caffeine in C57B1/6 mice. *Drug Chem Toxicol* 1980;3:135-63.
2. IARC Working Group. Coffee, tea, mate, methylxanthines and methylglyoxal. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1991;51:291-390.
3. Gilbert RM. Caffeine consumption. In: Spiller GA, editor. *The methylxantine beverage and foods: chemistry, consumption and health effects*. New York: Alan Liss; 1984. p. 185-213.
4. Thompson WG. Coffee: brew or bane? *Am J Med Sci* 1994;308:49-57.
5. Cole P. Coffee-drinking and cancer of the lower urinary tract. *Lancet* 1971;1:1335-7.
6. MacMahon B, Yen S, Trichopoulos D, Warren K, Nardi G. Coffee and cancer of the pancreas. *N Engl J Med* 1981;304:630-3.
7. Whitthamore AS, Paffenbarger RS Jr, Anderson K, Halpern J. Early precursors of pancreatic cancer in college men. *J Chronic Dis* 1983;36:251-6.
8. Nomura A, Heilbrun LK, Stemmermann GN. Coffee and pancreatic cancer. *Lancet* 1984;1:917.
9. Snowdon DA, Phillips RL. Coffee consumption and risk of fatal cancers. *Am J Public Health* 1984;74:820-3.



10. Mills PK, Beeson WL, Abbey DE, Fraser GE, Phillips RL. Dietary habits and past medical history as related to fatal pancreas cancer risk among Adventists. *Cancer* 1988;61:2578-85.
11. Jacobsen BK, Bjelke E, Kvale G, Heuch I. Coffee drinking, mortality, and cancer incidence: Results from a Norwegian prospective study. *J Natl Cancer Inst* 1986;76:823-31.
12. Vatten LJ, Solvoll K, Loken EB. Coffee consumption and the risk of breast cancer. A prospective study of 14.593 Norwegian women. *Br J Cancer* 1990;62:267-70.
13. Stavric B. An update on research with coffee/caffeine (1989-1990). *Food Chem Toxicol* 1992;30:533-5.
14. Barone JJ, Grice HC. Seventh International Caffeine Workshop, Santorini, Greece 13 – 17 June 1993. *Food Chem Toxicol* 1994;32:65-77.
15. Armstrong B, Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer* 1975;15:617-31.
16. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981;66:1192-308.
17. Timson J. Caffeine. *Mutation* 1977;47:1-52.
18. Krueel CDP. Classificação citopatológica das lesões precursoras do carcinoma escamoso do esôfago: modelo experimental em camundongos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, 1999.

19. Lamarine RJ. Selected Health and behavioral effects related to the use of caffeine. *J Community Health* 1994;19:449-66.
20. Suter PM, Vetter W. Kaffee und Koffein. *Schweiz Rundsch Med Prax* 1993;82:1122-8.
21. Schlegel R, Croy RG, Pardee AB. Exposure to caffeine and supression of DNA replication combine to stabilize the proteins and RNA required for premature mitotic events. *J Cell Physiol* 1987;131:85-91.
22. Nehlig A, Debry G. Potential genotoxic, mutagenic and antimutagenic effects of coffe: A review. *Mutat Res* 1994;317:145-62.
23. Bonati M, Garattini S. Interspecies comparison of caffeine disposition. In: Dews PB, editor. *Caffeine. Perspectives from recent research*. Berlin: Springer; 1984. p. 48-56.
24. Stalder R, Bexter A, Würzner HP, Luginbühl H. A carcinogenecity study of instant coffe in swiss mice. *Food Chem Toxicol* 1990;28:829-37.
25. Latini R, Bonati M, Marzi E, Tacconi MT, Sadurska B, Bizzi A. Caffeine disposition and effects in young and one-year old rats. *J Pharmacol* 1980;32:596-9.
26. Aldridge A, Parsons WD, Neims AH. Stimulation of caffeine metabolism in the rat by 3-methylcholanthrene. *Life Sci* 1977;21:967-74.
27. Arnaud MJ. The pharmacology of caffeine. *Progr Drug Res* 1987;31:273-313.

28. Khanna NN, Bada HS, Somani SM. Use of salivary concentration in the prediction of serum caffeine and Theophylline concentrations in premature infants. *J Pediatr* 1980;96: 494-9.

29. Baker J. Induction of tumors of the stomach and esophagus in inbred chinese hamsters by anal diethylnitrosamine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974;146:291-8.

30. Reuber MD. Carcinoma of the esophagus in rats by diethylnitrosamine. *Eur J Cancer* 1975;11:97-9.

31. Rubio CA. Experimental models. In: Pfeiffer CJ. *Cancer of the esophagus*. USA:CRC Press; 1982. v. 3, p. 139-68.

32. Rubio CA. Epithelial lesions antedating esophageal carcinoma. Histologic study in mice. *Pathol Res Pract* 1983;176:269-75.

33. Rubio CA, Liu F, Chejfec G, Sveander M. The induction of esophageal tumors in mice: dose and time dependency. *In Vivo* 1987;1:35-8.

34. Montesano R, Hollstein M, Hainaut P. Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis: a review. *Int J Cancer* 1996;69:1-11.

35. Huang Y, Meltzer SJ, Yin J, Tong Y, Chang EH, Srivastava S, et al. Altered messenger RNA and unique mutational profiles of p53 and Rb in human esophageal carcinomas. *Cancer Res* 1993;53:1889-94.

36. Maesawa C, Tamura G, Suzuki Y, Ogasawara S, Ishida K, Saito K, et al. Aberrations of tumor-suppressor genes (p53, apc, mcc and Rb) in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1994;57:21-5.

37. Leaf CD, Wishnom JS, Tannenbaum SR. Mechanisms of endogenous nitrosation. *Cancer Surv* 1989;8:324-33.
38. Magee PN. The experimental basis for the role of nitroso compounds in human cancer. *Cancer Surv* 1989;8:205-29.
39. Latini R, Bonati M, Castelli D, Garattini S. Dose-dependent kinetics of caffeine in rats. *Toxicol Lett* 1978;2:267-70.
40. Tricker AR, Preussmann R. Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutat Res* 1991;259:277-89.
41. Montesano R, Magee PN. Comparative metabolism in vitro of nitrosamines in various animal species including man. In: Montesano R, Tomatis editors. *Chemical carcinogenesis essays*. IARC Sci Publ 1974;10:39-56.
42. Goldim JR. *Pesquisa em saúde e direito dos animais*. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre; 1995.
43. Barros SGC. *Detecção de lesões precursoras em indivíduos sob risco para o carcinoma epidermóide do esôfago: experiência com a histopatologia e a citopatologia da mucosa esofágica através de biópsias endoscópicas e do esfregaço pelo balão citológico chinês [tese]*. Porto Alegre: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1992.
44. Victora C, Muñoz N, Day NE, Barcelos LB, Peccin DA, Braga NM. Hot beverages and oesophageal cancer in southern Brazil: a case-control study. *Int J Cancer* 1987;39:710-6.

45. Montesano R, Hall J. Species and organ specificity in nitrosamine carcinogenesis. In: Likhachev A, Anisimov V, Montesano R, editors. Age-related factors in carcinogenesis. IARC Sci Publ 1985;58:173-81.
46. Druckrey H, Preussmann R, Ivankovic S, Schmähl D. Organotrope carcinogene Wirkung bei 65 verschiedenen N-nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. Z Krebsforsch 1967;69:103-201.
47. Viscoli CM, Lachs MS, Horwitz RI. Bladder cancer and coffee drinking: a summary of case control research. Lancet 1993;341:1432-37.
48. Folsom AR, McKenzie Dr, Bisgard KM, Kushi LH, Sellers TA. No association between caffeine intake and postmenopausal breast cancer incidence in the Iowa Women's Health Study. Am J Epidemiol 1993;138:280-3.
49. Harkness JE, Wagner JE. Biologia e Manejo. In: Biologia e clínica de coelhos e roedores. 3. ed. Capítulo 2. São Paulo: Roca; 1993. p. 40-8.
50. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. N Engl J Med 1997;336:309-16.

ANEXO 1

PROTOCOLO PARA COLETA DE DADOS DO VOLUME DAS SOLUÇÕES
CONSUMIDAS POR SEMANA

GRUPOS	SEGUNDA – QUARTA	QUINTA - DOMINGO
	8:00 h	8:00 h
G1	ÁGUA + DEN = 1800 ml RESTARAM = ml	ÁGUA = 3000 ml RESTARAM = ml
G2	DEN + CAFEÍNA 6 = 1800 ml RESTARAM = ml	CAFEÍNA 6 = 3000 ml RESTARAM = ml
G3	DEN + CAFEÍNA 3 = 1800 ml RESTARAM = ml	CAFEÍNA 3 = 3000 ml RESTARAM = ml
G4	CAFEÍNA 6 = 1800 ml RESTARAM = ml	CAFEÍNA 6 = 3000 ml RESTARAM = ml
G5	CAFEÍNA 3 = 1800 ml RESTARAM = ml	CAFEÍNA 3 = 3000 ml RESTARAM = ml

SEMANA NÚMERO =

OBS: ÓBITOS - ACIDENTES - IMPREVISTOS - ETC (ANOTAR)

ANEXO 2**PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DO PESO MÉDIO (GRAMAS) DOS ANIMAIS EM CADA CAIXA DURANTE O EXPERIMENTO****DATA****GRUPOS****CAIXAS (4 animais)****1** A= B= C= D= E= F= G= H= I= J= K= L=**2** A= B= C= D= E= F= G= H= I= J= K= L=**3** A= B= C= D= E= F= G= H= I= J= K= L=**4** A= B= C= D= E= F= G= H= I= J= K= L=**5** A= B= C= D= E= F= G= H= I= J= K= L=

ANEXO 3

Volume (ml) das soluções ingeridas de 2ª a 4ª feira, nas 25 semanas do experimento.

G1= DEN G2= DEN + CAFE6 G3= DEN + CAFE3 G4= CAFE6 G5= CAFE3

	1 10/jun	2 17/jun	3 24/jun	4 04/jul	5 11/jul	6 18/jul	7 25/jul	8 01/ago	9 08/ago	10 15/ago	11 22/ago	12 30/ago	13 06/set
A	1250	1200	1180	1275	1050	1175	1300	1180	1100	1125	1190	1060	1085
B	26,04	25,00	24,58	26,56	21,86	24,48	27,08	24,58	22,92	23,44	24,79	22,08	22,6
G2	1425	1355	1390	1410	1230	1250	1365	1430	1290	1475	1375	1170	1190
	29,69	28,23	28,95	29,38	25,63	26,04	28,44	29,79	26,88	26,56	28,65	24,38	24,79
G3	1405	1380	1365	1400	1175	1210	1340	1300	1240	1225	1240	1100	1090
	29,27	28,75	28,48	29,17	24,48	25,21	27,92	27,08	25,83	25,52	25,83	22,92	22,71
G4	1470	1535	1495	1425	1375	1790	1575	1600	1490	1575	1585	1580	1575
	30,63	31,98	31,14	29,69	28,65	37,29	32,80	33,33	31,04	32,81	33,72 1*	33,62	33,51
G5	1475	1500	1485	1450	1435	1725	1550	1575	1440	1525	1580	1500	1495
	30,73	31,25	30,94	30,21	29,90	35,93	32,29	32,80	30,00	31,77	32,92	31,25	31,15

	14 13/set	15 20/set	16 27/set	17 04/out	18 11/out	19 18/out	20 25/out	21 01/nov	22 08/nov	23 15/nov	24 22/nov	25 29/nov
G1	1120	1115	1100	1050	1040	970	980	1035	1150	1145	1150	1200
	23,33	23,23	22,92	21,88	21,67	20,20	20,42	21,56	23,96	24,36 1*	25,00 2*	27,27 6*
G2	1300	1310	1350	1400	1320	1300	1320	1370	1520	1525	1570	1180
	27,08	27,87 1*	28,72	29,79	28,09	27,66	28,08	29,78 2*	33,77 3*	33,88 6*	37,38	28,78 9*
G3	1310	1305	1370	1380	1300	1290	1280	1345	1490	1480	1500	1480
	27,29	27,19	28,54	30,10	27,66 1*	28,04 2*	27,83	29,24	32,39	32,17	32,61	34,42 5*
G4	1500	1490	1600	1650	1520	1540	1545	1590	1690	1680	1680	1610
	31,91 2*	32,39	34,78	35,87	33,78 3*	34,22	34,33	35,33	38,41 4*	38,18	38,18	38,33 6*
G5	1625	1615	1650	1600	1635	1645	1655	1630	1650	1665	1660	1675
	33,85	35,11 2*	35,87	34,78	35,54	36,55 3*	36,77	36,22	36,66	37,84 4*	37,33	38,07 5*

A = Volume (ml) consumido por gaiola B = Vol.(ml)/ animal / 3 dias * Número de óbitos

ANEXO 4

Volume (ml) das soluções ingeridas de 5ª a dom, nas 25 semanas do experimento.

G1 = Água G2 = CAFE6 G3 = CAFE3 G4 = CAFE6 G5 = CAFE3

	1 10/jun	2 17/jun	3 24/jun	4 04/jul	5 11/jul	6 18/jul	7 25/jul	8 01/ago	9 08/ago	10 15/ago	11 22/ago	12 29/ago	13 06/set
A	1850	1900	1870	200	1100	1985	1850	1850	1925	2350	1910	1730	1925
	38,54	39,58	38,95	41,67	22,92	41,35	38,54	38,54	40,11	48,96	39,79	36,04	40,10
G2	1900	1760	1820	1780	1795	2425	1900	1980	1950	2050	2050	1950	2050
	39,58	36,67	37,92	37,08	37,40	50,52	39,58	41,25	40,63	42,71	42,71	40,63	42,71
G3	2015	1950	1910	1790	1850	2335	1800	1850	1850	2020	2000	2450	2085
	41,98	40,63	39,79	37,29	38,54	48,64	37,50	38,54	38,54	42,08	41,67	51,04	43,44
G4	2025	2045	2015	2050	2000	2700	2290	2770	2500	2370	2180	2035	2245
	42,19	42,60	41,98	42,71	41,67	56,25	47,70	57,71	52,08	49,38	46,38	43,30	47,77
G5	2015	2055	2085	2075	2015	2675	2270	2625	2450	2040	2085	2075	2300
	41,99	42,81	43,44	43,23	41,98	55,73	47,29	54,69	51,04	42,50	43,44	43,23	47,92

	14 13/set	15 20/set	16 27/set	17 04/out	18 11/out	19 18/out	20 25/out	21 01/nov	22 08/nov	23 15/nov	24 22/nov	25 29/nov
G1	2490	1905	1910	1920	2000	1950	2010	2250	2300	2200	2000	1990
	51,87	39,69	39,79	40,00	41,67	40,63	41,88	46,88	47,91	46,81	43,48	45,28
G2	2600	1590	1610	1650	1600	1610	1680	2650	2680	2660	2680	2690
	54,17	33,83	34,26	35,11	34,04	34,26	35,74	57,61	59,56	59,11	63,81	65,61
G3	1980	1950	1945	2000	1930	1920	1960	2700	2690	2710	2705	2710
	41,25	40,63	40,52	41,66	41,06	41,74	42,61	58,70	58,48	58,91	58,80	63,02
G4	1510	2605	2595	2590	2597	2550	2648	2725	2730	2730	2750	2750
	32,13	56,63	56,41	56,30	57,71	56,67	58,84	60,56	62,05	62,05	62,50	65,48
G5	1710	2670	2680	2690	2675	2685	2685	2760	2750	2760	2800	2810
	35,62	58,04	58,26	58,48	58,15	59,67	59,67	61,34	61,11	62,73	63,64	63,86

A = Vol. (ml) consumido por gaiola

B = Vol.(ml) /animal / 4 dias

ANEXO 5

RAÇÃO NUVILAB CR1

Nuvital Nutrientes Ltda. Indústria Brasileira. Marca registrada. S.I.F. 4453

Composição Básica do Produto: carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico, aminoácidos.

Níveis de Garantia

Umidade	(máx.)	12,50%
Proteína bruta	(mín.)	22,00%
Extrato etéreo	(mín.)	4,00%
Matéria mineral	(máx.)	10,00%
Matéria fibrosa	(máx.)	8,00%
Cálcio	(máx.)	1,40%
Fósforo	(mín.)	0,80%

Suplementação por quilo não menos que:

VITAMINAS: vitamina A 12.000 UI; vitamina D3 1.800 UI; vitamina E 30 mg; vitamina K3 3 mg; vitamina B1 5 mg; vitamina B2 6 mg; vitamina B6 7 mg; vitamina B12 20 mcg; niacina 60 mg; ácido pantotênico 20 mg; ácido fólico 1 mg; biotina 0,05 mg; colina 600 mg.

MICROELEMENTOS MINERAIS: ferro 50 mg; zinco 60 mg; cobre 10 mg; iodo 2 mg; manganês 60 mg; selênio 0,05; cobalto 1,50 mg.

AMINOÁCIDOS: DL-metionina 300 mg; lisina 100 mg.

ADITIVOS: Antioxidante 100 mg.

INDICAÇÃO: Alimento equilibrado para camundongos e ratos de laboratório, baseado em recomendações do National Research Council e National Institute of Health – U.S.A.

MODO DE USAR: Administração à vontade através de comedouros suspensos.

CONSERVAÇÃO: Conservar o produto em ambiente seco e arejado evitando-se luz e calor excessivos.

VALIDADE: 3 meses após a data de fabricação

Rótulo registrado no Ministério da Agricultura e Reforma Agrária – PR 4453-00103

ANEXO 6

Protocolo de coleta de dados da avaliação macroscópica do esôfago do camundongo (Ficha individual).

Identificação: _____ Data: _____

Grupo: (1) (2) (3) (4) (5)

Caixa: (A) (B) (C) (D) (E) (F) (G) (H) (I) (J) (K) (L)

Animal: (1) (2) (3) (4)

Comprimento do esôfago: _____mm

Número de tumores: _____

Índice Tumoral (IT): _____

ANEXO 7

Protocolo de coleta de dados do exame microscópico do esôfago do camundongo (Ficha individual).

ESÔFAGO Identificação: _____

Exame Microscópico:

- 0 = normal
- 1 = hiperplasia
- 2 = esofagite
- 3 = papiloma
- 4 = displasia baixo grau
- 5 = displasia alto grau
- 6 = carcinoma invasor da mucosa
- 7 = carcinoma invasor da musc. da mucosa
- 8 = carcinoma invasor da submucosa
- 9 = carcinoma invasor da musc. própria

() Carcinoma epidermóide

() Adenocarcinoma

