

**ANDRÉ DEL NEGRO**

**MODELO EXPERIMENTAL DE SIMULAÇÃO  
DE TABAGISMO E REFLUXOS FARINGOLARÍNGEO,  
GASTRO-ESOFÁGICO E CARCINOGENESE  
EM RATOS WISTAR**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2011**





---

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**MODELO EXPERIMENTAL DE SIMULAÇÃO  
DE TABAGISMO E REFLUXOS FARINGOLARÍNGEO,  
GASTRO-ESOFÁGICO E CARCINOGENESE  
EM RATOS WISTAR**

**ANDRÉ DEL NEGRO**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção de título de Doutor em Ciências, área de concentração em Fisiopatologia Cirúrgica. Sob orientação do Prof. Dr. Nelson Adami Andreollo e co-orientação do Prof. Dr. Antônio Santos Martins

**CAMPINAS, 2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652 - BIBLIOTECA DA FACULDADE  
DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

D382a Del Negro, André, 1976  
Modelo experimental de simulação de tabagismo e refluxos faringolaríngeo, gastro-esofágico e carcinogênese em ratos Wistar. / André Del Negro. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Nelson Adami Andreollo  
Coorientador: Antônio Santos Martins  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ácido clorídrico. 2. Neoplasias gastrointestinais. 3. Neoplasias de cabeça e pescoço. 4. Carcinoma espinocelular. 5. Pepsina. I. Andreollo, Nelson Adami. II. Martins, Antônio Santos. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Experimental model of smoking, gastroesophageal and pharyngolaryngeal reflux and carcinogenesis in Wistar rats.

**Palavra-chave em inglês:**

Hydrochloric Acid  
Gastrointestinal Neoplasms  
Head and Neck Neoplasms  
Carcinoma, Squamous Cell  
Pepsin

**Área de concentração:** Fisiopatologia Cirúrgica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

Nelson Adami Andreollo [Orientador]  
Antônio Santos Martins [Coorientador]  
Alfio José Tincani  
Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin  
Cláudio Roberto Cernéa  
Flávio Carneiro Hojaij

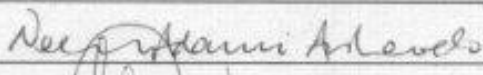


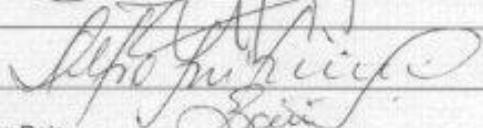
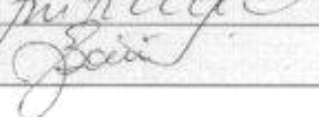
**Data da defesa:** 20-07-2011

**Programa de Pós-Graduação:** Faculdade de Ciências Médicas

Banca Examinadora da Defesa de Doutorado  
ANDRÉ DEL NEGRO

Orientador: Prof. Dr. Nelson Adami Andreollo

Membros:

1. Prof. Dr. Nelson Adami Andreollo - 
2. Prof. Dr. Cláudio Roberto Cernea - 
3. Prof. Dr. Flávio Carneiro Hojaij - 
- 4 2. Prof. Dr. Alfio José Tincani - 
- 5 3. Profa. Dra. Ilka De Fátima Santana Ferreira Boin - 

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20/07/2011



## **DEDICATÓRIA**

*À minha família que me fez quem sou.*

*À minha mãe Doralice pelo carinho e amor que sempre me deu.  
Ao meu pai Paulo por me mostrar com imparcialidade o caminho certo, sempre. Ao meu irmão Maurício por ser meu mais forte concorrente e meu mais antigo amigo.*

*À minha avó Illione pelo coração aberto e amor incondicional; pelo português correto que me ensinou desde que comecei a andar.*

*Ao meu saudoso avô Gildo (**in memorian**), grande professor e médico, fonte de toda a inspiração acadêmica que me contagia desde menino.*

*Ao meu amor, Maíra Soliani, por ter acreditado no recomeço mesmo quando eu duvidei.*

*Ao meu amigo José Geraldo Castro que me fez compreender o sentido da palavra equipe.*





## AGRADECIMENTOS

---

Ao Prof. Dr. Nelson Adami Andreollo pela ajuda, compreensão, ensinamentos e paciência; por me recolocar no caminho quando me faltou coragem.

À Pós-Graduação pela oportunidade de realizar mais esse passo na minha jornada acadêmica.

À Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Departamento de Cirurgia em nome de seu chefe e meu co-orientador, Prof. Dr. Antônio Santos Martins. Muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesare Biselli pelas inestimáveis orientações, mesmo a distância, pelo acesso aos modelos e gráficos.

Ao Prof. Dr. Milton Martins pela oportunidade de ceder o Laboratório de Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; pelas críticas que iniciaram o projeto.

Ao Prof. Dr. Alfio José Tincani pelas pertinentes críticas e caríssimos conselhos. Muito obrigado.

Aos acadêmicos José Hélio Zen Jr. e José Alexandre Colli Neto sem cujo auxílio, dedicação e empenho esse trabalho certamente não seria possível.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Bueno Garcia por abrir as portas do Laboratório de Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; pelo incentivo e entusiasmo pelo projeto; pela forma cativante com que me acolheu na sua atarefada agenda. Sou muito grato.

À Marina Rachel Araújo, bióloga do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, companheira de manhãs e tardes, frias e quentes; por tolerar minha insegurança com os ratos sempre com seu grande sorriso e incomensurável bom humor.

Aos ratos, meus objetos de estudo em nome da ciência. Meu obrigado póstumo.



Às Profas. Dras. Albina Messias Milani Altemani e Luciana Meirelles pelo auxílio com as lâminas e avaliações histopatológicas.

Aos meus amigos que me ensinaram que sozinhos vamos longe, juntos vamos muito além.

À Maria Estela Bernardete da Rocha, secretária do Departamento de Cirurgia pelo auxílio em todas horas.

À Paula Léa Flausino da Costa Ferreira, secretária da Pós-Graduação por me receber de braços abertos nos momentos em que precisei da sua prestimoniosa ajuda.



*“Para uma expedição de caráter científico e geográfico, dêem-me Wilson; para uma rápida incursão ao pólo e nada mais, Amundsen; mas se eu estiver em um buraco daqueles e quiser sair dele, dêem-me Shackleton todas as vezes.”*

**Apsley Cherry-Garrard.**

*“De todos os espartanos e théspios que combateram com bravura, a maior prova de coragem foi dada pelo espartano Dienes. Dizem que antes da batalha um nativo da Trácia lhe disse que os arqueiros persas eram tão numerosos que, quando disparavam seus arcos, a massa de flechas bloqueava o sol. Dienes, no entanto, completamente impassível diante da força do exército persa, simplesmente comentou: ‘Ótimo. Combateremos, então, à sombra.’”*

**Heródoto. História (apud).**



## RESUMO





Tabagismo e etilismo são os dois fatores mais importantes na gênese do carcinoma espinocelular do trato aero-digestivo superior (TADS). Outros fatores de risco podem estar envolvidos, como o refluxo faringolaríngeo (RFL). O objetivo desta pesquisa foi testar modelos experimentais de simulação do refluxo faringolaríngeo e gastro-esofágico e modelo de exposição à fumaça do cigarro em câmara fechada utilizando ratos Wistar, avaliando a injúria tecidual causada nas mucosas faringolaríngea e esofágica dos animais. Na Fase I, foram empregados cinquenta ratos Wistar divididos em 5 grupos submetidos à simulação do RFL, exposição à fumaça do cigarro, simulação do refluxo gastro-esofágico e simulação combinada do RFL e exposição tabágica, durante 6 meses. Na Fase II, oitenta e dois ratos Wistar foram divididos em 7 grupos e submetidos à simulação do RFL com “aplicações bi e tri-semanais” de ácido clorídrico, pepsina e nitrato de sódio durante 6 meses. Ambas as fases possuíam grupo controle expostos à apenas água. Não se observou displasia ou neoplasia. Alterações inflamatórias em graus variados foram observadas, com infiltrado linfocitário e mastocitário, além de hiperplasia epitelial. Os modelos experimentais desenvolvidos mostraram-se eficientes, reprodutíveis e de baixo custo para a simulação do tabagismo e do refluxo em animais de pequeno porte.

**Descritores:** refluxo esofágico, ácido clorídrico, neoplasias gastrointestinais, neoplasias de cabeça e pescoço, carcinoma espinocelular, pepsina, tabagismo.



# **ABSTRACT**



Smoking and drinking are the two main causes of squamous cell carcinoma in upper aerodigestive tract (UADT) mucosa. Other risk factors can be involved, as laryngopharyngeal reflux (LPR). The objective of this study was to test experimental models that simulate laryngopharyngeal and gastroesophageal refluxes and a tobacco exposition chamber, analyzing the tissue injury caused to the pharyngolaryngeal and esophageal mucosa using Wistar rats. In Fase I fifty Wistar rats were divided in five groups submitted to LPR, smoke exposition, gastroesophageal reflux and combined reflux and smoke exposition, during 6 months. In Fase II eighty-two Wistar rats were divided in seven groups and submitted to 2 or 3 weekly applications of hydrochloric acid, pepsin and sodium nitrate during 6 months. Both fases had control groups exposed to water alone. Neither dysplasia nor neoplasia were detected. Inflammatory changes were observed in varying degrees with lymphocytes and mast cells, and focal epithelial hyperplasia was observed. The data of the current study could not corroborate the hypothesis that gastroesophageal and pharyngolaryngeal refluxes are carcinogenic factors to UADT mucosa. The experimental model developed, had a low cost, was efficient and reproducible for smoking simulation in small animals.

**Key words:** Gastroesophageal Reflux. Hydrochloric Acid. Nitrates. Carcinoma. Squamous Cell. Rats. Tobacco. Smoking.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>CEC</b>	Carcinoma Espinocelular
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás Carbônico
<b>CO</b>	Monóxido de Carbono
<b>cm</b>	centímetros
<b>DMBA</b>	Dimetil-Benzantraceno
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>DPOC</b>	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
<b>DRGE</b>	Doença do Refluxo Gastro-esofágico
<b>EEI</b>	Esfíncter esofageano inferior
<b>EES</b>	Esfíncter esofageano superior
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HbO<sub>2</sub></b>	Oxiemoglobina
<b>HbCO</b>	Carboxiemoglobina
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>MetHb</b>	Metaemoglobina
<b>mmHg</b>	milímetros de mercúrio
<b>N</b>	Normal





<b>O2</b>	Oxigênio
<b>RFL</b>	Refluxo Faringolaríngeo
<b>RGE</b>	Refluxo Gastro-esofágico
<b>ROFA</b>	Residual Oil Fly Ash – resíduo de óleo diesel
<b>TADS</b>	Trato Aerodigestivo Superior
<b>TEG</b>	Transição esôfago-gástrica
<b>VIP</b>	Peptídeo vasoativo intestinal



## LISTA DE TABELAS

---

	PÁG.
<b>Tabela 1-</b> Mostra as dosagem de Hb, HbO <sub>2</sub> , HbCO, MetHb e O <sub>2</sub> total nos ratos expostos à fumaça de cigarro.....	81
<b>Tabela 2-</b> Análise comparativa do grau de ulceração. Teste de Fisher: p=0,582.....	86
<b>Tabela 3-</b> Análise comparativa da presença de linfócitos nos grupos. Teste de Fisher: p=0,007.....	87
<b>Tabela 4-</b> Análise comparativa da presença de mastócitos nos grupos. Teste de Fisher: p=0,006.....	88
<b>Tabela 5-</b> Análise comparativa da presença de linfócitos nos grupos. Teste de Fisher: p=0,019.....	90



## LISTA DE FIGURAS

---

	PÁG.
<b>Figura 1-</b> Visão geral do sistema, respectivamente: tanque de ar comprimido; conduto A; câmara com cigarro; conduto B; câmara de exposição dos animais.....	66
<b>Figura 2-</b> Detalhe da câmara pressurizada e câmara de exposição. A: mangueira de ar comprimido. B: mangueira com fumaça do cigarro.....	67
<b>Figura 3-</b> Visão do sistema em funcionamento com queima do cigarro e saída de fumaça pela mangueira B.....	67
<b>Figura 4-</b> Mostra a remoção da mucosa da laringe, faringe e esôfago cervical exposta à fumaça do cigarro para estudo, no rato sacrificado.....	70
<b>Figura 5-</b> Mostra detalhe do espécime removido com as áreas de risco (faringe, laringe e esôfago) expostas à fumaça do cigarro do rato para estudo anátomo-patológico.....	71
<b>Figura 6-</b> Mostra preparação da aplicação da água filtrada no grupo controle.....	75
<b>Figura 7-</b> Mostra a aplicação da solução de ácido clorídrico 0,1N na mucosa de risco do rato.....	75
<b>Figura 8-</b> Mostra a laringe removida do rato 5 da caixa 11, do grupo do estudo do refluxo.....	76
<b>Figura 9-</b> Seta mostra detalhe histopatológico de hiperplasia camada basal do esôfago (HEx100).....	83
<b>Figura 10-</b> Seta mostra detalhe histopatológico com hiperplasia epitelial focal da TEG (HEx100).....	83



<b>Figura 11-</b>	Seta mostra o aspecto histopatológico da laringe com infiltrado inflamatório leve de animal do Grupo I (HE-100x).....	85
<b>Figura 12-</b>	Seta mostra detalhe histopatológico da lâmina própria da laringe com infiltrado inflamatório intenso de animal do Grupo I (HE-400x).....	86
<b>Figura 13-</b>	Mostra detalhe histopatológico da faringe com infiltrado inflamatório moderado em animal do Grupo V (HE-400x).....	88
<b>Figura 14-</b>	Mostra detalhe histopatológico da faringe com infiltrado inflamatório leve em animal do Grupo VI (HE-400x).....	89





## LISTA DE GRÁFICO

---

	PÁG.
<b>Gráfico 1-</b> Evolução do peso dos animais.....	84



## LISTA DE ESQUEMAS

---

	PÁG.
<b>Esquema 1-</b> Câmara de exposição dos camundongos proposta por Shapiro <sup>26</sup> e modificada por Biselli <i>et al.</i> <sup>27</sup> .....	47
<b>Esquema 2-</b> Fluxograma Fase I que demonstra divisão dos 50 ratos em 5 grupos de 10 animais e substâncias aplicadas no estudo.....	64
<b>Esquema 3-</b> Câmara de Exposição de Biselli <i>et al.</i> <sup>27</sup> e efeito Venturi.....	68
<b>Esquema 4-</b> Fluxograma Fase II que demonstra divisão dos 82 ratos em 7 grupos de 10 e 12 animais e substâncias aplicadas no estudo.....	73



	PÁG.
<b>RESUMO.....</b>	<i>xv</i>
<b>ABSTRACT.....</b>	<i>xix</i>
<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	43
<b>1.1- Modelos experimentais de tabagismo.....</b>	46
<b>1.2- Doença do Refluxo gastro-esofágico e faringolaríngeo.....</b>	47
1.2.1- Anatomia do esôfago e estômago.....	47
1.2.2- Fisiologia da deglutição.....	49
1.2.3- Mecanismos de refluxo gastroesofágico e faringolaríngeo.....	49
1.2.4- Sintomatologia dos refluxos gastroesofágico e faringolaríngeo....	50
1.2.5- Dano secundário ao RFL.....	51
1.2.6- Exames secundários para diagnóstico do RFL.....	52
1.2.6.1- Laringoscopia indireta.....	52
1.2.6.2- Endoscopia Digestiva Alta.....	52
1.2.6.3- Manometria.....	52
1.2.6.4- Monitorização do pH.....	53
1.2.7- Tratamento da DRGE.....	54
1.2.7.1- Mudança de hábitos de vida.....	54
1.2.7.2- Tratamento Clínico.....	54
1.2.7.3- Tratamento Cirúrgico.....	54
<b>1.3- Modelos experimentais de refluxo.....</b>	55
<b>2- OBJETIVOS.....</b>	57



<b>3- MÉTODOS.....</b>	<b>61</b>
<b>3.1- Animais.....</b>	<b>63</b>
<b>3.2- Fases de Estudo.....</b>	<b>63</b>
3.2.1- Fase I - Simulação do tabagismo.....	63
3.2.1.1- Grupos de animais.....	63
3.2.1.2- Composição do cigarro.....	65
3.2.1.3- Câmara de simulação do tabagismo.....	65
3.2.1.4- Soluções utilizadas.....	68
3.2.1.5- Oximetria.....	68
3.2.1.6- Sacrifício dos animais e remoção de órgãos.....	69
3.2.1.7- Estudos histopatológicos.....	71
3.2.1.8- Análise estatística.....	71
3.2.2- Fase II – Refluxo Faringolaríngeo.....	72
3.2.2.1- Grupos de animais.....	72
3.2.2.2- Soluções utilizadas.....	74
3.2.2.3- Aplicação das soluções e tempo de estudo.....	74
3.2.2.4- Sacrifício dos animais e remoção dos órgãos.....	76
3.2.2.5- Estudos histopatológicos.....	77
3.2.2.6- Análise estatística.....	77
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>79</b>
<b>4.1- Fase I – Simulação do tabagismo.....</b>	<b>81</b>
4.1.1- Evolução do peso dos animais.....	81
4.1.2- Hemo-oximetria.....	81





4.1.3- Concentração de CO <sub>2</sub> .....	82
4.1.4- Análise histopatológica das peças obtidas.....	82
<b>4.2- Fase II - Refluxo Faringolaríngeo.....</b>	<b>84</b>
4.2.1- Evolução do peso dos animais.....	84
4.2.2- Análise histopatológica das peças obtidas.....	84
4.2.2.1- Laringe.....	84
4.2.2.2- Faringe.....	87
4.2.2.3- Esôfago.....	89
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>91</b>
5.1- Tabagismo e Carcinoma Epidermóide.....	93
5.2- Doença do Refluxo e Carcinoma.....	94
5.3- Modelos Experimentais.....	97
5.4- Considerações Finais.....	100
<b>6- CONCLUSÕES.....</b>	<b>101</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>105</b>
<b>8- ANEXOS.....</b>	<b>115</b>
<b>9- APÊNDICES.....</b>	<b>133</b>



## **1- INTRODUÇÃO**



A associação de tabagismo e etilismo com as neoplasias malignas do trato aerodigestivo superior (TADS) é bem conhecida há muitos anos<sup>1-3</sup>. Os sítios mais frequentes de acometimento tumoral são a cavidade oral, laringe e faringe. A laringe é acometida em 25% dos casos de neoplasmas malignos da região de cabeça e pescoço, sendo a glote o subsítio mais comumente envolvido. As taxas de incidência variam de acordo com a população estudada, embora as estatísticas sejam unânimes em apontar a população masculina como mais frequentemente acometida que a feminina<sup>4</sup>.

Aproximadamente 90% dos tumores da região são do tipo carcinoma epidermóide (CEC) e sua etiologia é associada à exposição aos carcinógenos presentes no tabaco com a ação sinérgica do álcool<sup>4</sup>.

Tabagistas têm risco sete vezes maior de desenvolver câncer da cavidade oral; etilistas inveterados têm risco cinco vezes maior e aqueles que fumam e bebem em excesso têm um risco aumentado em 30 vezes. Outros fatores de risco envolvidos são: mascar tabaco, má higiene oral, dentição em mau estado e próteses dentárias mal adaptadas<sup>4</sup>.

A exposição crônica aos carcinógenos do tabaco resulta no efeito conhecido como cancerização de campo ou “field cancerization” como proposto por Slaughter *et al.*<sup>5</sup> em 1953, e existe um risco aumentado de desenvolver tumores em toda a mucosa do trato aerodigestivo superior: faringe, laringe e esôfago. As células da mucosa cronicamente exposta tendem a desenvolver anormalidades genéticas, ativando proto oncogenes e inativando genes supressores. O ciclo celular torna-se anormal e as células da mucosa desenvolvem instabilidade genética com ciclo celular acelerado e incapacidade de reparo e apoptose, evoluindo para clones celulares pré-malignos e malignos<sup>5</sup>.

Entretanto, aproximadamente 5% dos portadores de CEC do TADS não são tabagistas ou etilistas e por isso outros fatores de risco têm despertado crescente interesse no estudo da etiopatogenia do carcinoma epidermóide desta região, principalmente os refluxos gastroesofágico (RGE) e faringolaríngeo (RFL), os quais têm como agente irritante da mucosa o ácido clorídrico<sup>6-21</sup>.

O nitrato, presente na secreção salivar, quando em contato com o pH ácido do estômago, pode ser convertido em nitrosaminas, que possuem ação co-promotora na carcinogênese esofágica, podendo também estar relacionado aos tumores do TADS<sup>22,23</sup>.

Dieta rica em gorduras e pobre em carotenóides (alimentos ricos em antioxidantes, que bloqueiam a síntese de nitrosaminas) pode estar associada com maior índice de neoplasias faringolaríngeas, principalmente em tabagistas<sup>4</sup>.

O papiloma-vírus humano, em especial os sorotipos 16 e 18, tem sido descrito como fator etiológico do câncer de boca, laringe e faringe<sup>4</sup>.

Má higiene oral e dentes em mau estado de conservação, embora em menor grau, também participam da gênese dos tumores desta região<sup>4</sup>.

Portanto, devido à presença inequívoca do carcinoma epidermóide em pacientes não etilistas e não tabagistas<sup>24</sup> torna-se evidente que o estudo de outros fatores causais da doença pode contribuir para o entendimento da patogênese e o avanço no seu tratamento.

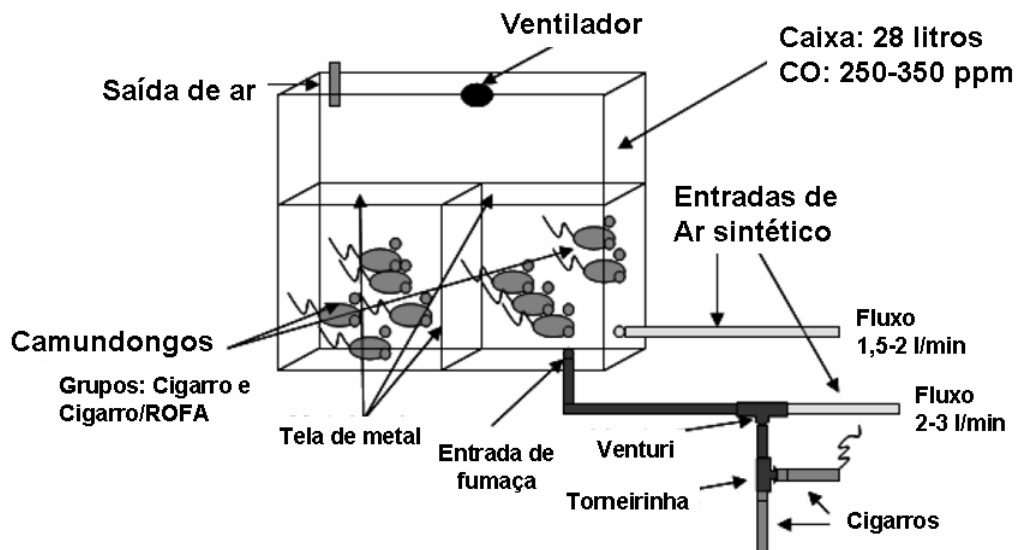
### **1.1- Modelos experimentais de tabagismo**

Existem diversos modelos experimentais de exposição à fumaça do cigarro, embora a maior parte deles tenha sido desenvolvida para camundongos. Ratos Wistar e Sprague-Dawley, coelhos, cães e cobaias já foram utilizados em diferentes câmaras de exposição e sob diferentes protocolos, embora um modelo ideal ainda não exista.

D'Agostini *et al.*<sup>25</sup> estudaram o efeito quimioprotetor da N-acetil-cisteína em ratos Sprague-Dawley expostos à fumaça do cigarro em máquina de exposição TE-10 (Teague Enterprises, Davis, CA).

Shapiro<sup>26</sup> propôs uma câmara vedada com alta exposição ao conteúdo tabágico para estudo da doença pulmonar obstrutiva crônica em camundongos. Seu modelo foi utilizado e modificado por Biselli *et al.*<sup>27</sup>, que estudaram o efeito da exposição da fumaça do cigarro e resíduo de óleo diesel em pulmões de camundongos.

O modelo empregado neste estudo foi a câmara utilizada por Biselli *et al.*<sup>27</sup>, modificada para maior produção de fumaça obtida da queima do cigarro (conforme Esquema 1 a seguir).



**Esquema 1-** Câmara de exposição dos camundongos proposta por Shapiro<sup>26</sup> e modificada por Biselli *et al.*<sup>27</sup>.

## 1.2- Doença do Refluxo gastro-esofágico e faringolaríngeo

### 1.2.1- Anatomia do esôfago e estômago

Diversas estruturas anatômicas da junção esôfago-gástrica são importantes na função de barreira anti-refluxo. A musculatura do esôfago distal em conjunto com as fibras musculares proximais do fundo gástrico constitui o mecanismo intrínseco do esfíncter esofágico inferior (EEI), sendo a crura diafragmática o mecanismo extrínseco do EEI e o ligamento freno-esofágico ancora o esôfago distal à crura diafragmática<sup>28,29</sup>.

O EEI tem 2 cm a 4 cm de comprimento e representa uma zona de alta pressão, que variam entre 10 mmHg e 40 mmHg. As fibras musculares do fundo gástrico, localizadas inferiormente ao EEI, também contribuem para barreira anti-refluxo em um

mecanismo valvular pelo qual a pressão na região contribui na contração das fibras do EEI. O ângulo esôfago-gástrico ou ângulo de His é o ângulo formado entre o esôfago terminal e a grande curvatura gástrica, e normalmente forma um ângulo agudo, funcionando também como uma válvula que auxilia impedindo o RGE<sup>30</sup>.

As contrações da crura diafragmática também estão relacionadas às mudanças de pressão na transição esôfago-gástrica (TEG). Em condições normais, estas contrações estão relacionadas com os movimentos respiratórios. Cada inspiração aumenta a pressão na TEG entre 10 mmHg e 20 mmHg, chegando até 150 mmHg na inspiração profunda e a crura diafragmática também contribui para o aumento da pressão na TEG durante a compressão abdominal, a tosse e durante a manobra de Valsalva<sup>31</sup>.

O peristaltismo do esôfago e o relaxamento do EEI são induzidos pela deglutição e resultam de reflexo neural que se inicia nos receptores da faringe através do nervo vago. As fibras eferentes vagais comunicam-se com neurônios do plexo mioentérico esofágico que promovem seu relaxamento. Os transmissores pós-ganglionares são óxido nítrico e peptídeo vasoativo intestinal (VIP) e o controle neural é regulado por nervos autonômicos inibitórios e excitatórios. Neurotransmissores alfa-adrenérgicos e bloqueadores beta-adrenérgicos atuam no aumento da pressão do EEI, enquanto os bloqueadores alfa-adrenérgicos e neurotransmissores beta-adrenérgicos o diminuem. Mecanismos colinérgicos também mostram controle do EEI, promovendo diminuição na sua pressão. Alimentos ricos em proteína e antiácidos também aumentam a pressão do EEI, enquanto alimentos gordurosos, chocolate, etanol, tabaco e cafeína promovem diminuição da pressão no EEI<sup>32-34</sup>.

O músculo cricofaríngeo originado na região pósterio-lateral da cartilagem cricóide e formado de musculatura estriada, compõe o esfíncter esofageano superior (EES), que permanece em constante estado de contração. Sua alta pressão de repouso é importante, pois a pressão do esôfago torácico, por se tratar de estrutura intra-torácica, é negativa: -5mmHg. O relaxamento coordenado do EES permite a deglutição normal, possibilitando a passagem do bolo alimentar da faringe para o esôfago superior. Quando o corpo do esôfago é exposto à queda do pH ou se ocorre sua distensão volumétrica, a pressão do EES aumenta significativamente, impedindo regurgitação e aspiração<sup>30,35</sup>.



### 1.2.2- Fisiologia da deglutição

A deglutição normal é uma sucessão altamente coordenada de eventos fisiológicos comandada pelo centro da deglutição, requerendo ação dos pares cranianos trigêmeo, glossofaríngeo, vago, e hipoglosso. Outros fatores que auxiliam na deglutição são a gravidade e a pressão negativa no esôfago inferior<sup>31</sup>.

A função do esôfago é de condução dos alimentos da boca ao estômago durante a fase esofageana da deglutição. Quando o músculo constritor da faringe se contrai, o esfíncter esofageano superior (EES) relaxa, possibilitando a passagem do bolo alimentar ao esôfago e iniciando uma onda peristáltica. A onda peristáltica iniciada é conhecida como peristalse primária, e a contração esofágica prossegue inferiormente ao longo do esôfago a uma velocidade de 5 a 10 cm por segundo. A peristalse secundária, onda que se origina logo após a peristalse primária, tem como função limpar os eventuais restos alimentares, e é iniciada através de distensão do esôfago ou através de reflexo gastresofágiano. Contrações terciárias são não-peristálticas e podem acontecer espontaneamente ou depois da deglutição<sup>31-34</sup>.

Durante a deglutição, o EEI relaxa e permite que o material ingerido alcance o estômago. A incompetência do EEI pode levar ao refluxo gastroesofágico e suas complicações, e por outro lado, se o EEI não relaxa corretamente, pode ocorrer disfagia e dismotilidade<sup>36</sup>.

### 1.2.3- Mecanismos de refluxo gastroesofágico e faringolaríngeo

O refluxo gastroesofágico (RGE) pode ser definido como a passagem involuntária de conteúdos gástricos ao esôfago, sendo um processo fisiológico normal que acomete crianças e adultos saudáveis. O conteúdo refluído inclui alimentos e bebidas digeridas, saliva, suco gástrico ou pancreático, e secreções biliares. Os episódios de refluxo em geral acometem o esôfago distal, sendo breves e assintomáticos. Embora o RGE ocorra de maneira fisiológica em pacientes de qualquer faixa etária, quando surgem sinais e sintomas significantes caracteriza-se a doença do refluxo gastro-esofágico (DRGE)<sup>30,37</sup>.

Portanto, o RGE é uma doença decorrente da falha anatômica ou funcional dos mecanismos de contenção do conteúdo gástrico no estômago geralmente devido a mecanismo defeituoso do EEI. A condição primordial associada ao RGE é o relaxamento fugaz do EEI e o da crura diafragmática, durando por 10 a 60 segundos, com diminuição da pressão esfínteriana abaixo da pressão intra-gástrica, embora a atonia do EEI em condições normais não induza ao refluxo se a pressão da crura diafragmática se mantém<sup>30-33,36,37</sup>.

Distensão gástrica e constrição da faringe são mecanismos que iniciam o relaxamento fugaz do EEI, podendo ser potencializado por medicações e alimentos com alto teor de gordura. O clareamento esofágico está na dependência de três fatores: ondas peristálticas esofágicas, gravidade e fluxo salivar. Alterações em qualquer destes fatores podem prejudicar o mecanismo de barreira anti-refluxo. As ondas peristálticas primárias são o mecanismo mais efetivo para clareamento do ácido. Durante sono, a frequência de deglutições em resposta a episódios de refluxo é mais baixo que durante a vigília; consequentemente os mecanismos protetores contra o RGE são menos efetivos<sup>30-37</sup>.

Refluxo faringolaríngeo (RFL) compreende o refluxo gastro-esofágico que não se limita à porção inferior do esôfago, alcançando o esfíncter esofageano superior (EES), podendo causar inúmeros distúrbios na faringe e laringe, como laringite crônica, nódulo e úlcera de prega vocal, laringoespasma, edema de Reinke, granuloma de contato, globus faríngeo, entre outros. A ocorrência de sintomas relacionados ao RFL na prática clínica é estimada em 4 a 10%, e a prevalência de RFL em pacientes com alterações vocais e doenças laríngeas varia entre 50 e 75%<sup>38</sup>.

#### 1.2.4- Sintomatologia dos refluxos gastroesofágico e faringolaríngeo

Os sintomas dos RGE e RFL diferem entre si. Pacientes com DRGE clássico apresentam pirose ou dispepsia como o sintoma primário, enquanto menos de 50% dos portadores de RFL queixam-se deste sintoma, desenvolvendo manifestações atípicas de refluxo, como desconforto na garganta, sensação de globus faríngeo, rouquidão e tosse<sup>38</sup>.

Os episódios de RFL ocorrem com maior frequência durante o dia, mesmo com o doente em posição ortostática, diferentemente dos pacientes portadores do RGE, em que os episódios são mais frequentes durante a noite em posição supina<sup>38</sup>.

As alterações esofágicas dependem da intensidade do RGE, podendo ocorrer esofagites leves até esofagites severas acompanhadas de estenoses e desenvolvimento de neoplasias malignas. O grau de lesão da mucosa esofágica pode ser medido utilizando-se as classificações de esofagite, sendo que a mais utilizada atualmente é a de Los Angeles. Além disso, outra classificação também já muito utilizada no passado é a de Savary-Miller: grau I: eritema; grau 2: ulceração linear; grau 3: ulcerações convergentes; grau 4: estenose.

A alteração mais significativa da mucosa pelo refluxo crônico e contínuo é o esôfago de Barrett, evidentemente com as alterações metaplásicas e displásica que podem evoluir para a malignidade<sup>37,39</sup>.

A laringe e a faringe são mais susceptíveis ao trauma químico devido suas mucosas serem mais delgadas e frágeis, sendo especialmente sensíveis à injúria por ácido e pepsina ativada. Quando não tratado, o RFL pode cursar com manifestações mais graves da laringite crônica, com ulceração do epitélio laríngeo e a conseqüente formação de granulomas. A persistência da injúria à laringe pode acarretar lesões mais severas como estenose subglótica ou glótica posterior<sup>40-44</sup>.

#### 1.2.5- Dano secundário ao RFL

As lesões da laringe e faringe são provocadas pela pepsina, enzima proteolítica contida no refluxo gástrico, ativada em pH inferior a 4. O conteúdo refluído superiormente ao EES entra em contato com a porção posterior da laringe, razão pela qual é nessa topografia que se notam os primeiros sinais de laringite. A laringite posterior cursa com eritema e edema das aritenóides, além de hiperplasia da comissura posterior. Outros achados do RFL, embora menos frequentes, são edema difuso da laringe, granuloma de processo vocal, estenose subglótica e carcinoma de laringe<sup>40-46</sup>.

No CEC da laringe, alguns autores já demonstraram a relação existente entre a DRGE e o desenvolvimento desta neoplasia e a pequena proporção de pacientes não tabagistas que desenvolvem este carcinoma dificulta a comprovação dessa hipótese<sup>45,46</sup>.

#### 1.2.6- Exames secundários para diagnóstico do RFL

##### 1.2.6.1- Laringoscopia indireta

A laringoscopia indireta em pacientes com sintomas relacionados à DRGE pode mostrar eritema da laringe, pólipos em pregas vocais, úlceras em faringe e nódulos de pregas vocais, embora não sejam sinais específicos de RFL. Outros achados mais prevalentes no RFL são: estenose de subglote ou comissura posterior, obliteração ventricular, edema difuso da laringe, granuloma de prega vocal e eritema na porção medial das aritenóides<sup>47</sup>.

##### 1.2.6.2- Endoscopia Digestiva Alta

A endoscopia digestiva avalia a presença de complicações da doença, tais como a intensidade da esofagite, a presença de úlceras esofágicas, o esôfago de Barrett, e de outras afecções como doença péptica gastroduodenal e neoplasias do esôfago e estômago. Porém é um exame que tem suas limitações dentro do contexto da DRGE, pois, não avalia a intensidade do refluxo, nem a composição do seu conteúdo<sup>37</sup>.

##### 1.2.6.3- Manometria

A manometria esofágica é o exame complementar que indica a pressão nos esfíncteres superior e inferior e a atividade motora do corpo esofágico. Contribui para o diagnóstico de distúrbios motores específicos do esôfago, tais como acalásia, megaesôfago, esclerodermia, assim como distúrbios motores inespecíficos ou dor torácica não cardíaca.

É utilizada como teste padrão da atividade motora no pré-operatório de cirurgia anti-refluxo, para medidas do tônus do esfíncter inferior e também contribui para o esclarecimento da disfagia pós-correção cirúrgica da DRGE.

Os equipamentos utilizados na atualidade são computadorizados, com cateteres de oito canais de registro simultâneos, e com bomba de infusão contínua. A impedanciometria é outro recurso diagnóstico recentemente introduzido para avaliação destes doentes, ainda em fase de análise mais pormenorizada para definir sua real contribuição<sup>48</sup>.

#### 1.2.6.4- Monitorização do pH

A pHmetria de 24 horas avalia a presença e a intensidade do refluxo ácido gastroesofágico, o padrão de refluxo e a eventual relação da queixa clínica com a presença do refluxo ácido durante o tempo em que o exame é realizado. É indicada para confirmar ou afastar refluxo ácido em doentes com quadro clínico compatível com DRGE, porém sem esofagite, para caracterizar o padrão de refluxo, na recidiva de sintomas no pós-operatório da correção cirúrgica da DRGE, no esôfago de Barrett e na avaliação do resultado do tratamento clínico.

O exame registra o número total de episódios de refluxo, o episódio de refluxo mais longo, o número de episódios de refluxo com duração maior que cinco minutos, grau de refluxo na posição ortostática, e grau de refluxo na posição supina. O escore geral é obtido mediante pesos para cada item, de acordo com sua capacidade de causar lesão esofágica, conhecido como escore de DeMeester<sup>49</sup>, devendo ser inferior a 14,7, para ser considerado dentro da normalidade. Vale ressaltar que Nasi *et al.*<sup>48</sup> concluíram que apenas 75% dos doentes portadores de RGE tem variações do pH intraesofágico.

Na atualidade pode ser realizado com um ou com dois eletrodos, sendo também importante no diagnóstico e confirmação de sintomas extra-esofágicos da DRGE.

Além dos exames supracitados, o exame radiológico contrastado do esôfago, estômago e duodeno e a cintilografia empregando o Tecnécio 99, também contribuem para demonstrar a intensidade do RGE<sup>37,39</sup>.

### 1.2.7- Tratamento da DRGE

#### 1.2.7.1- Mudança de hábitos de vida

Abolir o tabagismo e o etilismo, perda de peso, exercícios físicos diários, orientação alimentar adequada, evitando achocolatados, alimentos gordurosos e condimentados, diminuir o consumo de café, bebidas alcoólicas e refrigerantes, evitar grandes refeições antes de se deitar, elevar a cabeceira da cama e evitar o uso de roupas apertadas<sup>37,39,48</sup>.

#### 1.2.7.2- Tratamento Clínico

O tratamento clínico da DRGE é baseado no emprego dos inibidores de bomba de prótons, tais como omeprazol (20 mg e 40 mg), lansoprazol (30 mg) e pantoprazol (20 mg e 40 mg), em uma ou duas tomadas diárias, conforme a intensidade dos sintomas. Quando o doente refere refluxo de conteúdo gástrico para o esôfago de maneira acentuada, atingindo a região cervical, está indicado o emprego concomitante de pró-cinéticos, como bromoprida (10 mg) e domperidona (5 mg e 10 mg), ingeridas de 20 a 30 minutos antes das principais refeições<sup>30,37,48</sup>.

#### 1.2.7.3- Tratamento Cirúrgico

Os doentes com dependência do tratamento medicamentoso prolongado para controle de seus sintomas, remissão incompleta dos sintomas com o tratamento clínico, sintomas persistentes e de longa duração e a idade jovem, são objetos de consideração para a indicação do tratamento cirúrgico. Na presença de lesões esofágicas graves, como úlceras, estenose, ou esôfago de Barrett, e a presença de hérnia hiatal são outras indicações para correção cirúrgica. A indicação mais frequente é a persistência dos sintomas apesar da terapia médica instituída.

Quando o RGE é demonstrado por meio dos exames subsidiários anteriormente mencionados em pacientes dependentes de terapia medicamentosa com expectativa de vida superior a 10 anos, ou diante de EEI mecanicamente defeituoso, a cirurgia anti-refluxo deve

ser considerada o tratamento de escolha. Devem-se afastar sintomas não relacionados ao RGE, como gastrites, duodenites e dispepsia funcional, ou ainda megaesôfago e esclerodermia. O tratamento cirúrgico atualmente preconizado é por vídeo-laparoscopia, consistindo na dissecação e isolamento do esôfago distal e dos pilares diafragmáticos, realização de hiatoplastia e construção de válvula anti-refluxo, utilizando o fundo gástrico. A técnica de Nissen (funduplicatura a 360°) deve ser o procedimento de escolha para a maioria dos doentes. As funduplicaturas parciais (180°) estão associadas a maior falha terapêutica e recidiva de sintomas, especialmente em doentes com refluxo mais intenso, com esofagite grave ou com esôfago de Barret<sup>37,39,48</sup>.

### 1.3- Modelos experimentais de refluxo

Simular a DRGE em animais não é simples, uma vez que os episódios de refluxo são frequentes, ocorrem várias vezes ao dia e em diferentes intensidades. Muitos estudos adicionam substâncias promotoras da carcinogênese que não estão presentes no conteúdo refluído na laringe e faringe no material instilado na mucosa exposta.

Adams *et al.*<sup>50</sup> utilizaram cinco diferentes grupos de estudo de Hamsters, aplicando soluções do carcinógeno dimetil-benzantraceno associados ou não a ácido clorídrico, com e sem adição de pepsina porcina. Os autores confirmaram o surgimento de lesões neoplásicas na mucosa jugal dos animais.

Bulmer *et al.*<sup>51</sup>, estudando a laringe de porcos, verificaram a ação deletéria do ácido clorídrico, associado ou não à pepsina, em cinco subsítios diferentes, simulando o RFL. Os autores verificaram que a mucosa laríngea é resistente à injúria do ácido em pH igual ou superior a 4, embora na presença da pepsina o dano esteja presente.

Não foi encontrado na literatura o emprego de associação de ácido clorídrico, pepsina e nitrato de sódio no estudo das consequências do RFL e RGE.

Embora sejam inúmeros métodos propostos, com diferentes substâncias em diferentes quantidades e em diferentes animais, o modelo ideal de simulação do RFL e RGE ainda é utópico.





## **2- OBJETIVOS**



Os objetivos do presente estudo experimental em ratos Wistar foram:

1. Desenvolver e analisar os modelos de simulação do refluxo faringolaríngeo e gastro-esofágico e do tabagismo em câmara fechada;
2. Demonstrar a intensidade do dano tecidual (processo inflamatório, displasia e neoplasia) às mucosas faringolaríngea e esofágica causada pela ação do ácido clorídrico, potencializada pela pepsina e pelo nitrato de sódio e a causada pela fumaça do cigarro.



### **3- MÉTODOS**



### 3.1- Animais

Cento e trinta e dois ratos machos adultos, entre quinze e dezesseis semanas de vida, da linhagem Wistar pesando entre 250g e 400g foram utilizados na pesquisa. Os animais, escolhidos aleatoriamente, foram fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp e acondicionados em gaiolas plásticas comuns para a espécie (*Rattus norvegicus albinus*), revestidas com maravalha e mantidos no Biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da UNICAMP. Durante o tempo de observação receberam dieta com ração padrão, água foi oferecida *ad libitum*, e seus pesos foram monitorados mensalmente. O Comitê de Ética em Experimentação Animal deu parecer favorável para a realização do experimento, conforme protocolo 1394-1 (Apêndice 1).

### 3.2- Fases de Estudo

#### 3.1.1- Fase I - Simulação do tabagismo

Cinquenta animais do grupo pre-selecionado foram incluídos nesta fase, sendo vinte expostos à fumaça do cigarro, simulando o tabagismo, em câmara de exposição descrita por Shapiro<sup>26</sup> e modificado por Biselli *et al.*<sup>27</sup>. (Ver Fluxograma no Esquema 2).

#### 3.2.1.1- Grupos de animais

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos e receberam numeração própria, marcada com tintura capilar no pelo corpóreo.

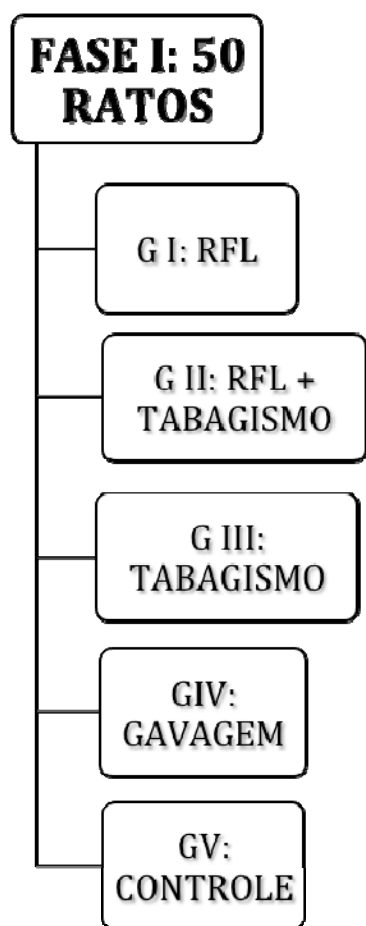
Grupo I composto por dez animais submetidos diariamente à aplicação da mistura das soluções de ácido clorídrico 0,1N (normal) e pepsina na diluição de 1mg em 1ml de água destilada, diretamente sobre a mucosa laringofaríngea, simulando o refluxo faringolaríngeo.

Grupo II composto por dez animais submetidos diariamente à aplicação da mistura das soluções de ácido clorídrico 0,1N (normal) e pepsina na diluição de 1mg em 1ml de água destilada diretamente sobre a mucosa laringofaríngea, simulando o refluxo faringolaríngeo, além de exposição inalatória à fumaça de cigarro em câmara de exposição.

Grupo III composto por dez animais submetidos diariamente à exposição inalatória à fumaça de cigarro em câmara de exposição.

Grupo IV composto por dez animais submetidos diariamente à aplicação da mistura das soluções de ácido clorídrico 0,1N (normal) e pepsina na diluição de 1mg em 1ml de água destilada diretamente sobre a mucosa da transição esôfago-gástrica através de gavagem com sonda atraumática, simulando o refluxo gastro-esofágico.

Grupo V composto por dez animais submetidos diariamente à aplicação de água filtrada com pH neutro diretamente sobre a mucosa laringofaríngea, servindo como grupo controle.



**Esquema 2-** Fluxograma Fase I que demonstra divisão dos 50 ratos em 5 grupos de 10 animais e substâncias aplicadas no estudo.



### 3.2.1.2- Composição do cigarro

O cigarro utilizado continha as seguintes especificações (segundo fonte da empresa fornecedora):

Alcatrão 10mg / cigarro

Nicotina 0,8 mg / cigarro

CO 10 mg / cigarro

### 3.2.1.3- Câmara de simulação do tabagismo

A câmara era composta por recipiente hermético plástico, com 50cm de altura, 70cm de largura e 30cm de profundidade, onde os animais foram acondicionados, acoplado a um sistema de fluxo laminar com ar comprimido, baseando-se no princípio de Venturi. As partículas de ar comprimido foram aceleradas num sistema com tubos de PVC transparente, de fluxo laminar com queda de pressão, dependente do fluxo e aceleração. Mediante redução do diâmetro transversal do tubo, utilizando-se uma pipeta interposta, o ar comprimido foi acelerado de maneira constante, porém as partículas de ar que passavam pela ponteira da pipeta adquiriam uma velocidade maior. Quando a pressão neste ponto sofria queda abaixo da pressão atmosférica, produzia-se o efeito desejado: aspiração da fumaça do cigarro Derby vermelho (Souza Cruz), escolhido pelas suas altas concentrações de nicotina e alcatrão, na extremidade oposta do sistema.

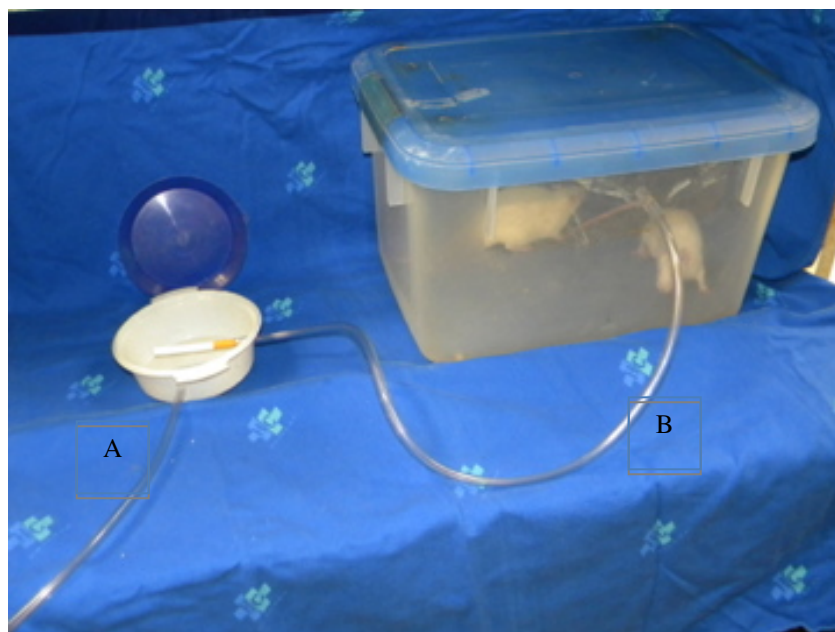
Após a fase piloto notou-se a necessidade de usar um modelo de tabagismo que produzisse maior quantidade de gás obtido da queima do cigarro, sendo proposta uma modificação do sistema.

A nova modificação foi composta por um tanque de ar comprimido que pressuriza a câmara através de um conduto de ar "A". Dentro da câmara é colocado o cigarro já aceso com a extremidade do filtro conectada ao conduto de ar "B" que leva a fumaça diretamente à câmara de exposição, obtendo-se um significativo aumento na quantidade de fumaça produzida e inalada pelos animais (Ver Figuras 1, 2 e 3 e Esquema 3).

Os animais foram submetidos a aplicações diárias de oito cigarros, com exposição à fumaça por seis meses, período considerado longo o suficiente para causar alterações na mucosa, pois em média um mês de vida do animal corresponde aproximadamente a cinco anos de vida do homem<sup>52,53</sup>.



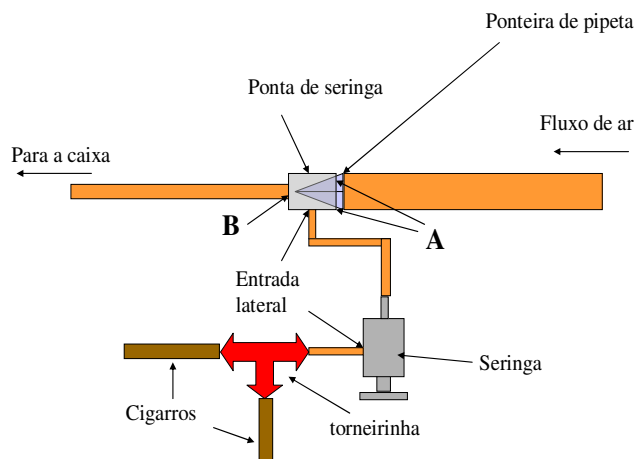
**Figura 1-** Visão geral do sistema, respectivamente: tanque de ar comprimido; conduto A; câmara com cigarro; conduto B; câmara de exposição dos animais.



**Figura 2-** Detalhe da câmara pressurizada e câmara de exposição. A: mangueira de ar comprimido. B: mangueira com fumaça do cigarro.



**Figura 3-** Visão do sistema em funcionamento com queima do cigarro e saída de fumaça pela mangueira B.



Obs: No ponto **B**, o fluxo vindo da ponteira deve ser dirigido para o interior do tubo que vai à caixa de exposição  
 No ponto **A**, a ponteira da pipeta deve ficar justa (adaptamos com borracha para reduzir vazamentos)

**Esquema 3-** Câmara de Exposição de Biselli *et al.*<sup>27</sup> e efeito Venturi.

#### 3.2.1.4- Soluções utilizadas

As soluções utilizadas para a simulação do refluxo faringo-laríngeo e gastro-esofágico foram:

Ácido clorídrico 0,1N preparado no laboratório de Medicina e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Unicamp.

Mistura de solução de ácido clorídrico 0,1N com Pepsina comercial, na diluição de 1mg em 1ml de água destilada.

#### 3.2.1.5- Oximetria

Na câmara de exposição à fumaça também foi feita a contagem no número de partículas de CO com aparelho ToxiPro®, empresa Biosystems. Em dois momentos do estudo realizou-se a hemo-oximetria dos animais, realizado no aparelho Oxímetro Radiometer OSM 3.

#### 3.2.1.6- Sacrifício dos animais e remoção de órgãos

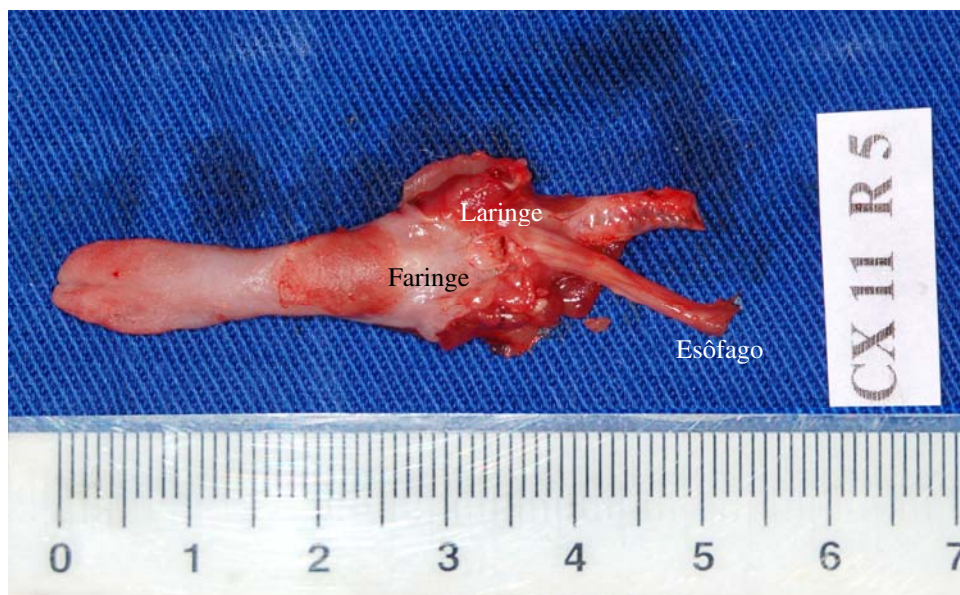
Após o período de exposição, os ratos foram sacrificados por prolongamento anestésico com Tiopental endovenoso em dose letal de dois mililitros (2ml) por quilograma de peso, um mês após o término do experimento.

Os espécimes para estudo foram obtidos a partir de dissecação da mucosa de risco, removendo-se as peças *in toto*, isto é, semelhante ao procedimento cirúrgico realizado em humanos.



**Figura 4-** Mostra a remoção da mucosa da laringe, faringe e esôfago cervical exposta à fumaça do cigarro para estudo, no rato sacrificado.





**Figura 5-** Mostra detalhe do espécime removido com as áreas de risco (faringe, laringe e esôfago) expostas à fumaça do cigarro do rato para estudo anátomo-patológico.

#### 3.2.1.7- Estudos histopatológicos

Após a retirada dos órgãos para estudo, os mesmos foram fixados em formalina a 10% por 24 horas e, em seguida, armazenados em solução de álcool 70%. Cortes seriados foram preparados em lâminas a partir dos espécimes corados com hematoxilina e eosina e fixados em parafina.

Posteriormente as lâminas foram analisadas sob supervisão de patologista experiente de forma cega, e avaliou-se a presença de alterações inflamatórias na mucosa faringolaríngea e esofágica como ulceração, infiltrado inflamatório e presença de lesões displásicas. Realizou-se avaliação das células presentes no infiltrado inflamatório e a sua frequência.

#### 3.2.1.8- Análise estatística

Não se justificou expressar os resultados em análise estatística uma vez que o desfecho foi pouco expressivo, sendo mais adequado expressá-los em porcentagem e/ou números absolutos.

### 3.2.2- Fase II – Refluxo Faringolaríngeo

Oitenta e dois ratos machos jovens foram estudados nesta fase, sendo todos à exceção do grupo controle, expostos ao refluxo faringolaríngeo, simulando essa doença como ocorre em humanos.

#### 3.2.2.1- Grupos de animais

Oitenta e dois ratos machos jovens foram divididos aleatoriamente em sete grupos e receberam numeração própria, marcada com caneta hidrográfica na cauda.

Grupo I composto por doze animais submetidos três vezes por semana à aplicação de solução de ácido clorídrico 0,1N diretamente sobre a mucosa laringofaríngea, simulando o refluxo faringolaríngeo.

Grupo II composto por doze animais submetidos duas vezes por semana à aplicação de solução de ácido clorídrico 0,1N diretamente sobre a mucosa laringofaríngea.

Grupo III composto por doze animais submetidos três vezes por semana à aplicação da mistura de solução de ácido clorídrico 0,1N com solução de pepsina na diluição de 1mg em 1ml de água destilada, diretamente sobre a mucosa laringofaríngea.

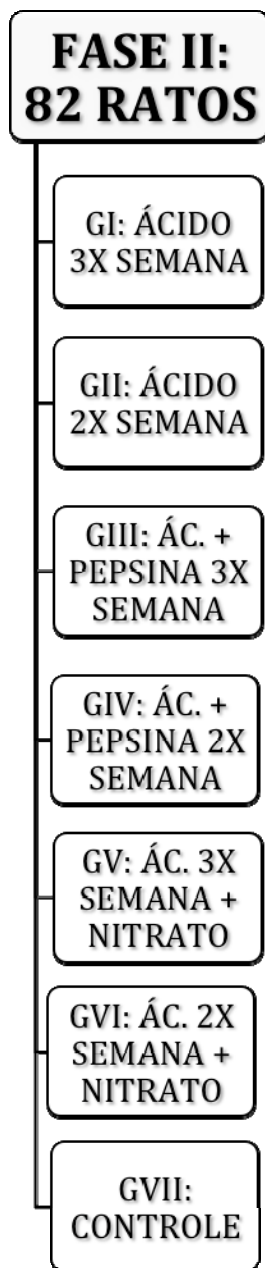
Grupo IV composto por doze animais submetidos duas vezes por semana à aplicação da mistura de solução de ácido clorídrico 0,1N com solução de pepsina na diluição de 1mg em 1ml de água destilada, diretamente sobre a mucosa laringofaríngea.

Grupo V composto por doze animais que receberam diariamente em seus bebedouros solução de 400mg de nitrato de sódio diluídos em 300ml de água filtrada e submetidos três vezes por semana à aplicação de solução de ácido clorídrico 0,1N diretamente sobre a mucosa laringofaríngea.

Grupo VI composto por doze animais que receberam diariamente em seus bebedouros solução de 400mg de nitrato de sódio diluídos em 300ml de água filtrada e submetidos duas vezes por semana à aplicação de solução de ácido clorídrico 0,1N diretamente sobre a mucosa laringofaríngea.



Grupo VII composto por dez animais submetidos duas vezes por semana à aplicação de água filtrada com pH neutro diretamente sobre a mucosa laringofaríngea, servindo como grupo controle deste estudo, como mostra o Esquema 4.



**Esquema 4-** Fluxograma Fase II que demonstra divisão dos 82 ratos em 7 grupos de 10 e 12 animais e substâncias aplicadas no estudo.

### 3.2.2.2- Soluções utilizadas

Foram utilizadas as mesmas soluções previamente empregadas no estudo, embora dois grupos de animais tenham sido tratados com mistura de 400mg de nitrato de sódio diluídos em 300ml de água filtrada, ofertada livremente em seus bebedouros, para se avaliar seu potencial co-promotor de carcinogênese.

### 3.2.2.3- Aplicação das soluções e tempo de estudo

A aplicação foi feita com pincel comum número 1 com cerdas macias, usando-se afastadores atraumáticos para exposição direta da mucosa laringofaríngea dos ratos. Pincel amarelo, exclusivo para aplicação do ácido, pincel bege para aplicação exclusiva da mistura ácido-pepsina, e pincel azul para aplicação exclusiva da água filtrada (Figuras 6 e 7). A área de aplicação compreendeu a mucosa de risco em estudo: mucosa laríngea da supraglote; além da mucosa faríngea da base da língua e esofágica cervical. Não houve necessidade de anestesia, pois o procedimento não causou maior desconforto para os animais.

Os animais foram submetidos a aplicações seriadas por período de seis meses, durante os quais seus pesos foram monitorados mensalmente.



**Figura 6-** Mostra preparação da aplicação da água filtrada no grupo controle.



**Figura 7-** Mostra a aplicação da solução de ácido clorídrico 0,1N na mucosa de risco do rato.

#### 3.2.2.4- Sacrifício dos animais e remoção dos órgãos

Seguiu padrão semelhante ao da Fase I. Após o período de exposição de seis meses, os ratos foram sacrificados por prolongamento anestésico com Tiopental endovenoso em dose letal de dois mililitros (2ml) por quilograma de peso.

Os órgãos para estudo foram obtidos a partir de dissecação da mucosa de risco, removendo-se as peças *in toto*.



**Figura 8-** Mostra a laringe removida do rato 5 da caixa 11, do grupo do estudo do refluxo.

### 3.2.2.5- Estudos histopatológicos

Seguiu padrão semelhante ao da Fase I. Os espécimes foram fixados em formalina a 10% por 24 horas e, em seguida, armazenados em solução de álcool 70%. Cortes seriados foram corados com hematoxilina e eosina e fixados em parafina para estudo em lâminas sob microscopia óptica.

As lâminas foram analisadas por patologista experiente de forma cega, e avaliou-se a presença de alterações inflamatórias nas mucosas laringofaríngea e esofágica, bem como ulceração, infiltrado inflamatório e a celularidade característica, além da presença de exsudato inflamatório na luz laríngea. Realizou-se avaliação das células presentes no infiltrado inflamatório e a sua frequência.

### 3.2.2.6- Análise estatística

Para análise estatística, o conjunto de dados foi transferido para um banco eletrônico compatível com o programa computacional The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 8.02. SAS Institute Inc, 1999-2001, Cary, NC, USA. A análise dos dados incluiu a comparação das alterações histológicas empregando-se o teste exato de Fisher, considerando um nível de significância de 5%. A comparação entre os grupos para a comparação de variação dos pesos foi utilizada a análise de variância para medidas repetidas (ANOVA), uma vez que se estudou comparativamente dois grupos objetivando se estabelecer o fator causal da injúria em amostra homogênea.



## **4- RESULTADOS**





## 4.1- Fase I – Simulação do tabagismo

### 4.1.1- Evolução do peso dos animais

O peso dos animais não mostrou alterações significativas, variando de 300g a 460g, com ganho de peso de todos os ratos avaliados durante o estudo. Não houve diferenças significativas de peso entre os grupos de animais (tabagismo e refluxo) e o grupo controle.

### 4.1.2- Hemo-oximetria

A aferição foi realizada em dois dias escolhidos aleatoriamente (02/06/2009 e 02/07/2009). Dois animais expostos à fumaça do cigarro e dois animais do grupo controle foram selecionados randomicamente para o teste; e os expostos à simulação do tabagismo foram avaliados em dois tempos distintos: 5 minutos e 10 minutos após a exposição.

Os itens analisados foram: Hemoglobina (Hb), Oxiemoglobina (HbO<sub>2</sub>), Carboxiemoglobina (HbCO), Metaemoglobina (MetHb), Oxigênio total (O<sub>2</sub> total), aos 5 minutos de exposição (5') e aos 10 minutos de exposição (10').

Os animais expostos à fumaça do cigarro tiveram seus valores de HbCO e MetHb significativamente aumentados no tempo 10' se comparados aos ratos do grupo controle: 6,8 e 7,1 *versus* 0,4 (HbCO) e 1,4 e 1,5 *versus* 0,6.

**Tabela 1-** Mostra as dosagem de Hb, HbO<sub>2</sub>, HbCO, MetHb e O<sub>2</sub> total nos ratos expostos à fumaça de cigarro.

	Hb (g/dl)	HbO <sub>2</sub>	HbCO	MetHb	O <sub>2</sub> total
Rato 1 – 5'	18,9	58,1	0,2	0,8	15,1
Rato 1 – 10'	18,9	58,6	6,8	1,4	15,2
Rato 2 – 5'	19,7	60,5	0,2	0,7	15,2
Rato 2 – 10'	19,7	60,4	7,1	1,5	15,4
Controle	19,8	45,9	0,4	0,6	10,4

#### 4.1.3- Concentração de CO2

A concentração de CO2 aferida com o aparelho ToxiPro®, empresa Biosystems, foi realizada diariamente por duas semanas. O resultado obtido, já a partir da queima do terceiro cigarro, em todas as leituras era superior a 999 partes por milhão, verificando-se a mensagem “ERROR”, o que confirmou a aferição de quantidades muito acima do valor limite de leitura do equipamento.

#### 4.1.4- Análise histopatológica das peças obtidas

A análise histopatológica dos cinquenta animais tratados, divididos por grupos, não evidenciou lesões neoplásicas na mucosa de risco. No entanto, foi observado:

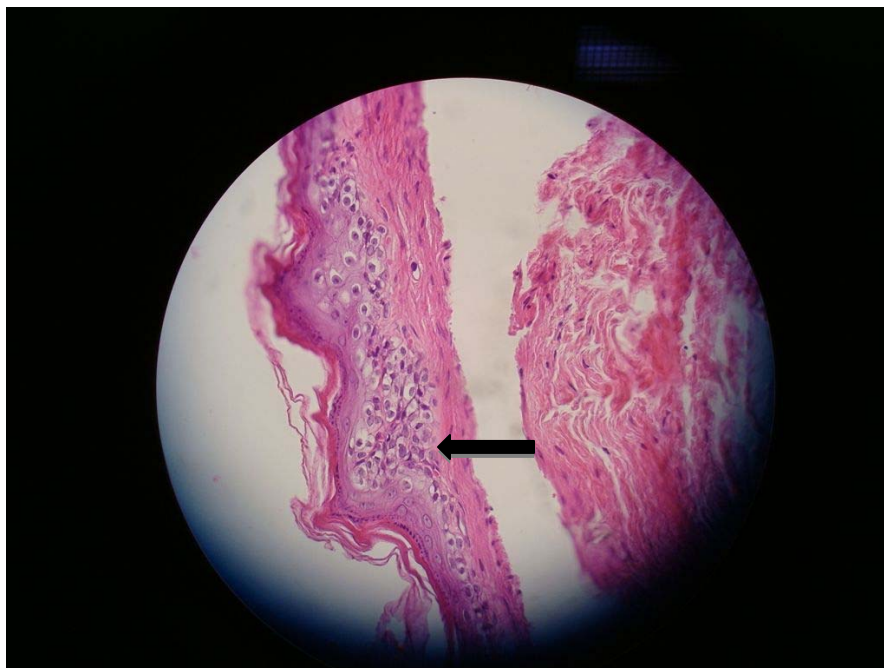
Grupo 1 (Refluxo faringolaríngeo): dois animais com área de displasia tênue com infiltrado inflamatório leve (20%) e oito animais sem alterações histológicas.

Grupo 2 (Refluxo faringolaríngeo associado a tabagismo): dois animais com área de hiperplasia epitelial focal, dois animais com área de hiperplasia de camada basal (40%) (Figura 9) e seis animais sem alterações histológicas (60%).

Grupo 3 (Tabagismo exclusivo): não foram encontradas alterações na mucosa em estudo.

Grupo 4 (Refluxo gastroesofágico): dois animais com leve hiperplasia epitelial focal (20%) (Figura 10) e oito animais sem alterações histológicas.

Grupo 5 (Grupo controle): não foram encontradas alterações histológicas.



**Figura 9-** Seta mostra detalhe histopatológico de hiperplasia camada basal do esôfago (HEx100).

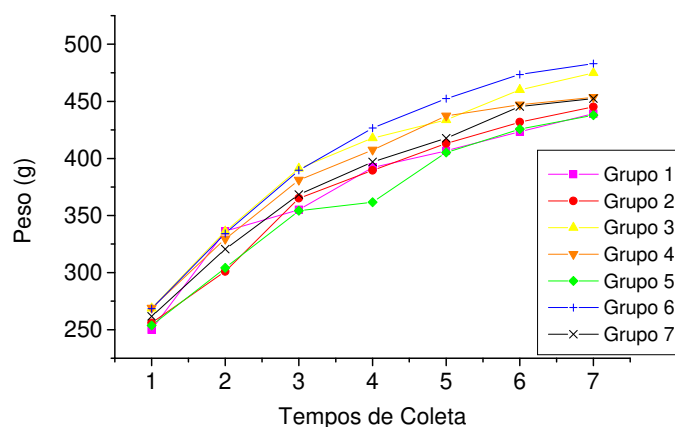


**Figura 10-** Seta mostra detalhe histopatológico com hiperplasia epitelial focal da TEG (HEx100).

## 4.2- Fase II - Refluxo Faringolaríngeo

### 4.2.1- Evolução do peso dos animais

Quando analisado o peso dos animais, houve diferença estatística apenas entre os grupos V e VI no tempo t4, o que se explica pela presença de um animal (rato 6 da caixa 10, grupo V) de constituição pequena em relação aos demais.



**Gráfico 1-** Evolução do peso dos animais.

### 4.2.2- Análise histopatológica das peças obtidas

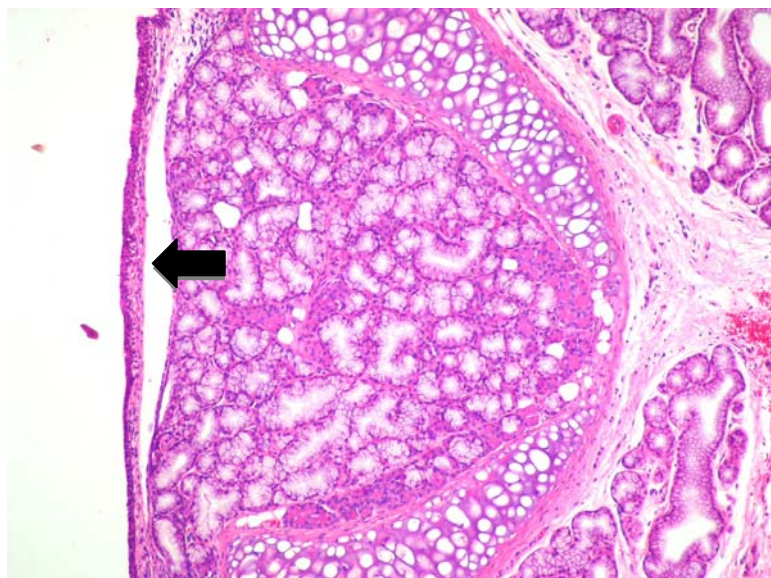
#### 4.2.2.1- Laringe

Cinco animais foram excluídos do estudo devido à ausência de mucosa laríngea no material analisado, sendo dois do grupo III e um dos grupos I, II e VII.

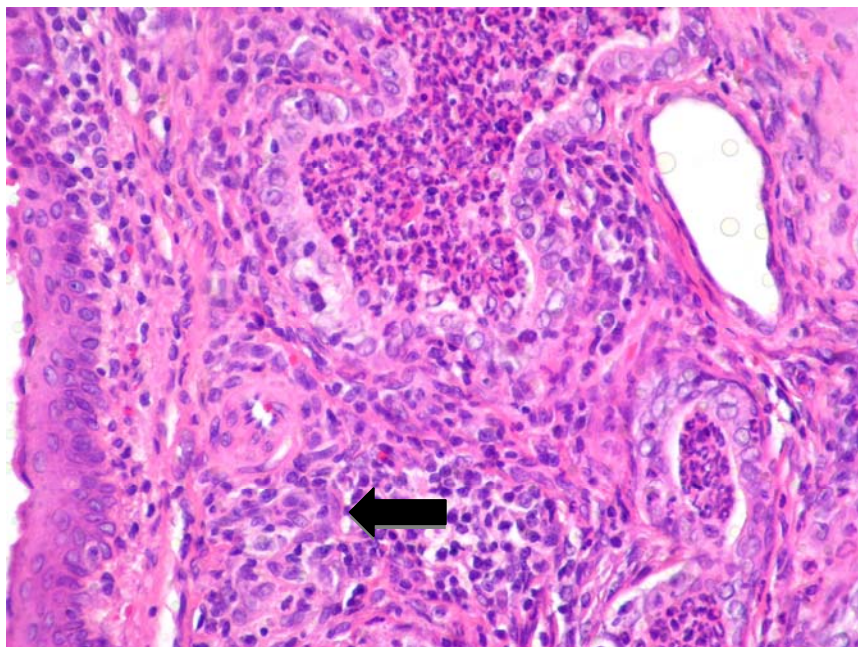
Dentre os grupos estudados não foram observadas alterações epiteliais sugestivas de displasia, neoplasia intra-epitelial ou francamente invasora. Obtiveram-se alterações histológicas inflamatórias em graus variados, como presença de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos; além de ulceração mucosa, infiltrado inflamatório na mucosa e exsudato inflamatório solto na luz laríngea, na dependência da substância aplicada e de sua frequência.

Quando se avaliou a presença de ulceração mucosa, obteve-se uma maior frequência e maior intensidade nos grupos I a IV, sem diferença estatisticamente significativa ( $p=0,582$ ). Avaliando-se separadamente as células que compunham a reação inflamatória nos achados histológicos, observou-se maior frequência de linfócitos nos grupos I, III e IV ( $p=0,007$ ). A presença de neutrófilos foi mais intensa nos grupos III e IV ( $p=0,007$ ); assim como a presença de plasmócitos ( $p<0,001$ ). (Figuras 11 e 12).

Ao se avaliar a intensidade do exsudato inflamatório, dividida em graus de 0 a 3, observou-se maior frequência de graus 2 e 3 nos grupos I, III e IV ( $p<0,001$ ). Estudando a quantidade de material inflamatório solto na luz laríngea, observou-se reação inflamatória mais intensa no grupo III ( $p<0,001$ ).



**Figura 11-** Seta mostra o aspecto histopatológico da laringe com infiltrado inflamatório leve de animal do Grupo I (HE-100x).



**Figura 12-** Seta mostra detalhe histopatológico da lâmina própria da laringe com infiltrado inflamatório intenso de animal do Grupo I (HE-400x).

**Tabela 2-** Análise comparativa do grau de ulceração. Teste de Fisher:  $p=0,582$ .

Ulceração	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VII	Total
<b>0</b>	8 (72.73%)	8 (72.73%)	8 (80%)	10 (83.33%)	11 (91.67%)	11 (91.67%)	9 (100%)	65
<b>1-3</b>	3 (27.27%)	3 (27.27%)	2 (20%)	2 (16.67%)	1 (8.33%)	1 (8.33%)	0 (0%)	12
<b>Total</b>	11	11	10	12	12	12	9	77

**Tabela 3-** Análise comparativa da presença de linfócitos nos grupos. Teste de Fisher:  $p=0,007$ .

Linfócitos	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VII	Total
<b>0</b>	1 (9,09%)	1 (9,09%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (16,7%)	7 (58,3%)	1 (11,11%)	12
<b>1</b>	4 (36,3%)	6 (54,5%)	5 (50,0%)	8 (66,6%)	9 (75,0%)	4 (33,3%)	4 (44,44%)	40
<b>2</b>	2 (18,2%)	4 (36,3%)	4 (40,0%)	2 (16,7%)	1 (8,33%)	1 (8,33%)	4 (44,44%)	18
<b>3-4</b>	4 (36,3%)	0 (0,0%)	1 (10,0%)	2 (16,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	7
<b>Total</b>	11	11	10	12	12	12	9	

#### 4.2.2.2- Faringe

Dois animais foram excluídos do estudo, um do Grupo VI e um do Grupo VII devido à ausência de mucosa faríngea no material analisado.

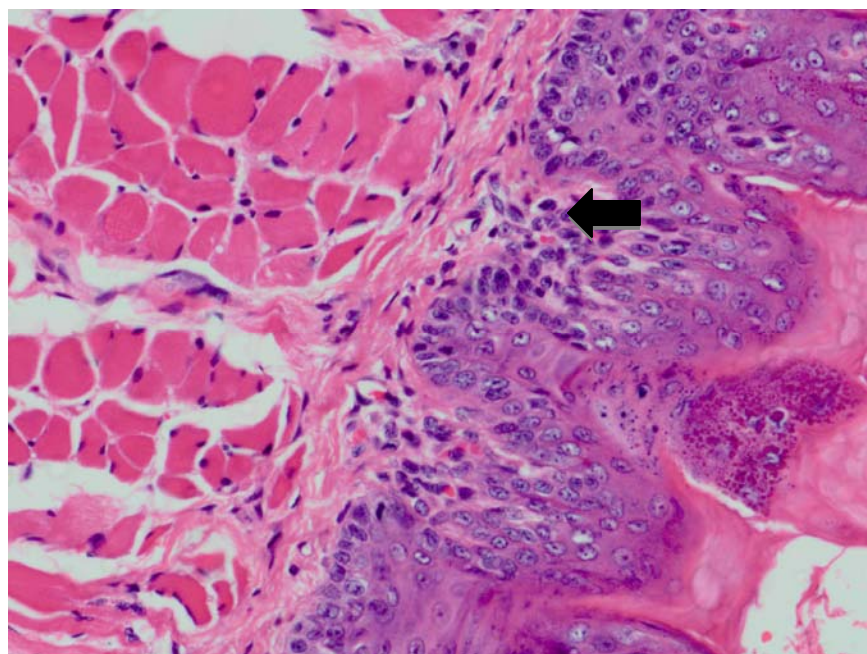
Dentre os sete grupos estudados não foram observadas alterações epiteliais sugestivas de displasia, neoplasia intra-epitelial ou francamente invasora. Alterações histológicas inflamatórias em graus variados foram observadas, como presença de linfócitos e mastócitos, além de infiltrado inflamatório na mucosa, na dependência da substância aplicada e de sua frequência. Não foi observada ulceração mucosa secundária à aplicação das substâncias (Figuras 13 e 14).

Avaliando-se separadamente as células que compunham a reação inflamatória nos achados histológicos, observou-se maior frequência de linfócitos nos Grupos II, III, IV e V, embora sem diferença estatística ( $p = 0.442$ ). A presença de mastócitos foi mais intensa nos Grupos V e VI ( $p = 0.006$ ) (Tabela 4).



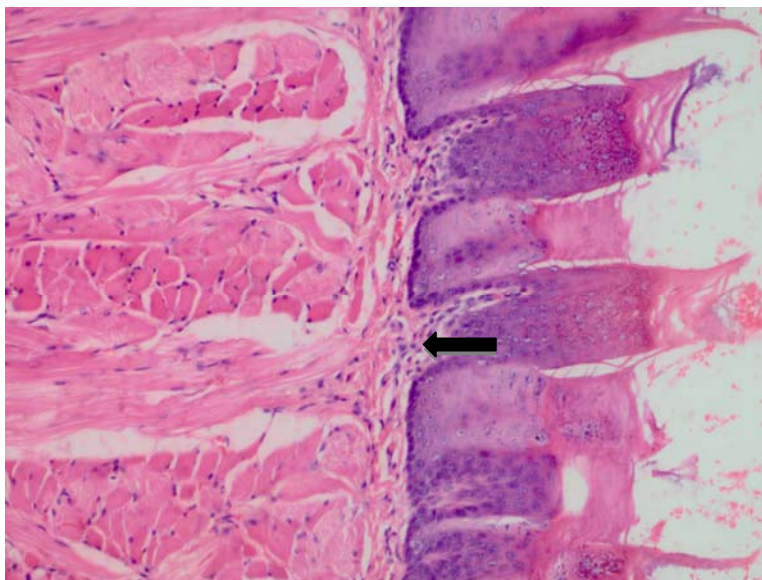
**Tabela 4-** Análise comparativa da presença de mastócitos nos grupos. Teste de Fisher:  
p=0,006.

Mastócitos	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VII	Total
<b>0</b>	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)	12 (100%)	8 (66,7%)	8 (81,8%)	7 (77,8%)	72
<b>1-3</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (33,3%)	3 (18,2%)	2 (22,2%)	8
<b>Total</b>	12	12	12	12	12	11	9	80



**Figura 13-** Mostra detalhe histopatológico da faringe com infiltrado inflamatório moderado em animal do Grupo V (HE-400x).





**Figura 14-** Mostra detalhe histopatológico da faringe com infiltrado inflamatório leve em animal do Grupo VI (HE-400x).

#### 4.2.2.3- Esôfago

Apenas um animal do grupo VI foi excluído do estudo devido à ausência de mucosa esofágica no material analisado. Dentre os sete grupos estudados não foram observadas alterações epiteliais sugestivas de displasia, neoplasia intra-epitelial ou francamente invasora. Obtiveram-se alterações histológicas inflamatórias em graus variados, como presença de linfócitos, plasmócitos e mastócitos; além de infiltrado inflamatório na mucosa, na dependência da substância aplicada e de sua frequência. Não foi observada ulceração mucosa secundária à aplicação das substâncias. Avaliando-se separadamente as células que compunham a reação inflamatória nos achados histológicos, observou-se maior frequência de linfócitos nos grupos I e II ( $p=0,019$ ) (Tabela 5). Ao se estudar a presença de mastócitos na reação inflamatória, observou-se maior frequência nos grupos I, II, V e VI, embora sem diferença estatística ( $p= 0,085$ ). A presença de neutrófilos foi observada em apenas um animal, bem como o exsudato inflamatório na luz esofagiana, não se efetuando análise estatística.

**Tabela 5-** Análise comparativa da presença de linfócitos nos grupos. Teste de Fisher:  
p=0,019.

<b>Linfócitos</b>	<b>Grupo I</b>	<b>Grupo II</b>	<b>Grupo III</b>	<b>Grupo IV</b>	<b>Grupo V</b>	<b>Grupo VI</b>	<b>Grupo VII</b>	<b>Total</b>
<b>0</b>	6	6	9	8	11	10	10	60
	(50%)	(50%)	(75%)	(66,6%)	(91,6%)	(90,9%)	(100%)	
<b>1-3</b>	6	6	3	4	1	1	0	21
	(50%)	(50%)	(25%)	(33,3%)	(8,3%)	(9,1%)	(0%)	
<b>Total</b>	12	12	12	12	12	11	10	81

## **5- DISCUSSÃO**



## 5.1- Tabagismo e Carcinoma Epidermóide

O tabagismo é o fator de risco mais importante na gênese do CEC de cabeça e pescoço, acometendo pacientes com história de uso crônico do cigarro. O risco relativo de desenvolver câncer de laringe entre fumantes e não fumantes é de 15,5 vezes. A cessação do tabagismo reduz o risco do surgimento de lesões neoplásicas e pré-neoplásicas, alcançando o nível de pacientes que nunca fumaram após quinze anos<sup>4</sup>.

O tabaco contém quarenta e três carcinógenos conhecidos, a maioria composta por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e nitrosaminas. Seu uso está implicado em aumento da incidência de CEC do TADS de maneira dose-dependente<sup>4</sup>.

Enquanto o cigarro e o hábito de fumar são amplamente divulgados como prejudiciais à saúde, o mesmo não ocorre com o consumo excessivo de álcool e muitos pacientes não estão cientes da associação tabagismo e etilismo com câncer de cabeça e pescoço<sup>4</sup>.

O risco associado ao etilismo varia entre os diversos sítios do TADS, estando mais relacionado ao câncer de faringe. Um efeito dose- resposta mostra que o risco de se desenvolver CEC de faringe aumenta progressivamente quando a quantidade consumida de álcool passa de duas (25g) para mais de sete (125g) doses diárias. Na laringe, a supraglote é mais acometida que a glote em pacientes etilistas, enquanto a glote é mais acometida em não etilistas<sup>4</sup>.

O mecanismo de ação do álcool na gênese do carcinoma de cabeça e pescoço não está claramente definido, todavia efeitos locais e sistêmicos estejam envolvidos. Embora o álcool não seja um carcinógeno, pode agir como solvente, aumentando a permeabilidade das células da mucosa do TADS aos demais carcinógenos presentes principalmente no cigarro<sup>4</sup>.

O etilismo crônico aumenta a ação das enzimas do sistema do citocromo p450, contribuindo para a ativação de pró-carcinógenos em carcinógenos. Esta ativação pode ser crítica na ativação de diversos carcinógenos, uma vez que a maioria dos carcinógenos ambientais existe na forma de pró-carcinógenos<sup>4</sup>.

O álcool também atua na carcinogênese reduzindo a atividade de enzimas do reparo do DNA, além dos possíveis efeitos na diminuição da imunidade resultante da redução do número de linfócitos T<sup>54</sup>.

## **5.2- Doença do Refluxo e Carcinoma**

A relação do tabagismo e etilismo com a etiologia das neoplasias malignas do trato aero-digestivo superior é bem conhecida<sup>1-3</sup>. No entanto, aproximadamente 5% dos pacientes portadores de CEC de mucosa em cabeça e pescoço não tem antecedente de uso crônico de fumo ou álcool, reforçando a existência de outros fatores envolvidos na gênese destes tumores<sup>4</sup>. Um desses co-fatores pode ser o refluxo faringolaríngeo e vários autores demonstraram a ação co-carcinogênica desta doença, cujo principal agente irritante sobre a mucosa é o ácido clorídrico<sup>6-21,24,38,40-47,55,56</sup>.

Outro co-promotor da carcinogênese é o nitrato e seus derivados, principalmente o grupo das nitrosaminas. O nitrato é absorvido nas alças intestinais ou gerado endogenamente pelo óxido nítrico e secretado pelas glândulas salivares. A flora bacteriana da língua reduz o nitrato em nitrito e este, em contato com o pH ácido em ácido nítrico e espécies nitrosantes, que ao reagir com aminas secundárias, pode formar as N-nitrosaminas, sabidamente carcinogênicas<sup>22-23</sup>.

A DRGE está diretamente relacionada com várias doenças do trato aéreo superior. Uma das primeiras publicações sobre a alteração do epitélio laríngeo devido ao refluxo foi de Cherry e Margulies<sup>55</sup> que relataram úlceras de contato no terço posterior das pregas vocais de três pacientes não explicadas por abuso vocal. Todos apresentavam queixa clínica de rouquidão associada a sintomas dispépticos, embora os achados de refluxo não tenham sido confirmados com endoscopia digestiva ou monitorização do pH esofágico.

Koufman demonstrou que os refluxos faringolaríngeo e gastroesofágico são entidades diversas com sintomatologia própria, sendo infrequentes a pirose e regurgitação no primeiro<sup>38</sup>. Observou também que o epitélio laríngeo é mais suscetível à injúria tecidual que o epitélio esofágico<sup>47</sup>.

Outros autores relacionam o RFL com alterações inflamatórias da laringe como laringite crônica<sup>40</sup>, disfonia persistente<sup>41</sup>, úlceras de contato<sup>42</sup>, pigarro, granuloma laríngeo, globo faríngeo, disfagia cervical e estenose subglótica<sup>43</sup>; ou ainda com doenças respiratórias como tosse crônica, asma, apnéia do sono e doença pulmonar obstrutiva crônica<sup>44</sup>.

Relatos de câncer de laringe em pacientes com laringite crônica foram descritos inicialmente por Gabriel e Jones<sup>45</sup>, avaliando 101 casos de laringite que progrediram para CEC de laringe, embora não haja menção de tabagismo ou etilismo entre os pacientes analisados. Glanz e Kleinsasser<sup>46</sup> avaliaram 35 casos de carcinoma laríngeo dentre 841 pacientes portadores de laringite crônica e disfonia persistente por mais de dois anos e encontraram na análise histológica focos multicêntricos de CEC permeando o infiltrado inflamatório. Mais uma vez não há referência de tabagismo ou etilismo na série estudada.

Koufman, em estudo clínico, avaliou em 225 pacientes portadores de DRGE seus sintomas mais prevalentes e achados laboratoriais após exame de pHmetria esofágica. Entre os pacientes estudados encontrou sintomatologia semelhante à descrita anteriormente e, em 31 casos, CEC de laringe associado. Neste mesmo estudo, avaliou experimentalmente os mecanismos deletérios do ácido clorídrico associado à pepsina na mucosa subglótica de 20 cães, divididos em três grupos, com aplicações de solução salina, pepsina apenas, ácido neutralizado e hidróxido de sódio (grupo controle); ácido clorídrico 0,1N e mistura de ácido clorídrico 0,1N com pepsina na diluição de 0,3mg/ml. Observou que no grupo de animais submetidos à aplicação de ácido clorídrico houve maior latência para cicatrização do processo inflamatório que no grupo controle e que não houve cicatrização no grupo submetido à mistura ácido e pepsina<sup>47</sup>.

Mercante *et al.*<sup>56</sup> analisaram 274 pacientes com CEC de cavidade oral, faringe e laringe e encontraram 29,3% de DRGE confirmada com endoscopia digestiva. Desta casuística apenas 92 pacientes não eram tabagistas, mas foi encontrada maior porcentagem de RGE nos portadores de CEC laríngeo (21,7%) do que na população em geral (5%),  $p=0,0001$ , mostrando que o refluxo pode ser considerado co-promotor da carcinogênese.

Rubin *et al.*<sup>57</sup>, Nurgalieva *et al.*<sup>58</sup> e Akbayr *et al.*<sup>59</sup> estudaram a possível ação do *Helicobacter pylorii* na carcinogênese laríngea, sendo que estes autores relatam resultados conflitantes em relação ao papel desta bactéria na gênese das lesões.

A ação tumorigênica do ácido clorídrico em altas concentrações na mucosa oral de Hamsters foi bem estabelecida pelo trabalho de Adams *et al.*<sup>50</sup>, em que os autores utilizaram cinco diferentes grupos de animais, aplicando soluções do carcinógeno dimetil-benzantraceno associados ou não a ácido clorídrico, com e sem adição de pepsina porcina. Os autores verificaram que a ação combinada do ácido clorídrico com a pepsina promoveu surgimento de lesões neoplásicas de maiores dimensões do que as do grupo controle, embora não tenha verificado menor tempo de latência para o surgimento das mesmas.

Qadeer *et al.*<sup>20</sup> propõem três opções correlatas do refluxo com as neoplasias do TADS. Pode haver associação como CEC, uma vez que tanto o tabaco quanto o álcool promovem relaxamento do EEI, facilitando a DRGE. O refluxo pode agir como fator independente, isto é, ser causa direta do câncer, principalmente em pacientes não fumantes; ou ainda o refluxo atuar como co-promotor da carcinogênese, aumentando o risco de surgimento de CEC em pacientes nos tabagistas e/ou etilistas quando presente.

Em estudo clínico que avaliou com pHmetria esofágica proximal e distal durante 24 horas em pacientes portadores de lesões leucoplásicas e neoplásicas de laringe e faringe, Galli *et al.*<sup>60</sup> consideraram que o RFL representa o principal co-fator endógeno envolvido na patogênese da laringite crônica e das alterações pré e neoplásicas da laringe e faringe, embora concluam que ensaios clínicos randomizados sejam necessários para confirmar a hipótese, mantendo a discussão aberta.

Francis *et al.*<sup>61</sup>, avaliando o refluxo como fator de risco para o desenvolvimento do câncer de laringe em estudo caso-controle do registro do Hospital dos Veteranos (Veteran Affairs's Care System) não encontraram aumento do risco de CEC de laringe em pacientes com refluxo.

Trabalhos experimentais anteriores<sup>50,62-68</sup> demonstraram clara ação tumorigênica do dimetil-benzantraceno (DMBA) e de outros derivados do benzeno, além da difluorometilornitina associada ao 5-Fluoracil, embora atualmente, devido à grande toxicidade desses agentes, tenha se preferido trabalhar com outras soluções.



Neste estudo foram utilizadas apenas as substâncias envolvidas na DRGE, isto é, o ácido clorídrico na concentração encontrada no organismo (0,1N), a pepsina, e o nitrato de sódio. Embora não tenham sido encontradas alterações pré-neoplásicas, observou-se maior intensidade de reação inflamatória nos grupos em que foi aplicada a mistura de ácido clorídrico e pepsina ( $p < 0,05$ ), com maior tendência no grupo de três aplicações semanais, confirmando a ação deletéria desta solução. Embora sem diferença estatística ( $p = 0,582$ ), a presença de ulceração mucosa, que pode evoluir para displasia, foi verificada mais frequentemente e com maior intensidade nos dois grupos de maior exposição ao ácido e pepsina. Como no estudo de Adams et al.<sup>50</sup>, o efeito sinérgico entre ácido e pepsina foi responsável por maior injúria tecidual, embora não se tenha observado alterações neoplásicas, uma vez que se optou por não utilizar o DMBA.

As alterações histológicas encontradas estão em acordo com as propostas por Lewis<sup>69</sup> que caracterizou as lesões inflamatórias na laringe de ratos submetidos à experimentação.

Corroborando os dados encontrados neste estudo, o trabalho de Goldberg et al.<sup>64</sup>, embora realizado em gatos, encontrou maior injúria tecidual na mucosa esofágica submetida à aplicação da mistura com maiores concentrações de ácido clorídrico e pepsina, sem observar alterações pré-neoplásicas. Já Lillemoe et al.<sup>65</sup> em experimento com coelhos Nova Zelândia, verificaram que a pepsina em pH ácido tem maior efeito irritante sobre a mucosa esofágica que a tripsina, bile ou ácido isoladamente, também não constatando alterações displásicas.

### **5.3- Modelos Experimentais**

Existem vários modelos experimentais de simulação de tabagismo em animais. Modelos de experimentação animal são úteis para novas pesquisas científicas, podem ser reproduzidos em várias instituições, além de apresentar um baixo custo. Por se tratar de pesquisa em animais, os fatores complicadores podem ser reduzidos dentro de uma população controlada.

Wright e Churg<sup>70</sup> e Shapiro<sup>26</sup> propuseram modelo de exposição total dos animais, estudando a injúria tecidual causada pela fumaça do cigarro no pulmão de camundongos para desenvolver modelo de estudo da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).

Biselli *et al.*<sup>27</sup> modificaram o modelo proposto por Shapiro<sup>26</sup>, introduzindo diversos animais simultaneamente na câmara de exposição. Os autores estudaram em camundongos as alterações teciduais pulmonares causadas tanto pela fumaça do cigarro quanto pelo resíduo do óleo diesel, novamente dentro de um modelo de DPOC.

Modelos experimentais para estudo do refluxo gastro-esofágico e faringolaríngeo são pouco descritos na literatura<sup>50,62,64-68,71</sup>. O modelo de mais fácil reprodução foi proposto por Adams *et al.*<sup>50</sup>, que com afastadores atraumáticos, instilava de maneira direta com uso de pincéis de cerdas macias as substâncias na mucosa jugal de Hamsters. Como previamente citado, o uso do DMBA certamente propiciou o surgimento de CEC nos animais estudados, uma vez que a substância é altamente carcinogênica e atualmente proibida em nosso meio. Se a adição do ácido clorídrico e pepsina tiveram real influência na gênese destas lesões permanecerá aberto a debate.

Para o estudo do CEC de mucosa do trato aerodigestivo superior não existe modelo experimental não sujeito a falhas e críticas do método. Embora sempre que se opte por simular doenças que ocorrem em humanos nos animais de laboratório, é sabido que inúmeras críticas e ressalvas ao modelo ou desenho do estudo devam ser consideradas. É extremamente difícil, senão impossível, reproduzir em laboratório com 100% de acurácia e fidedignidade as situações de exposição às diversas substâncias a que estão sujeitos os seres humanos.

Ratos da raça Wistar foram escolhidos por se tratar de animais não isogênicos, objetivando-se reproduzir o que ocorre na população humana.

Na tentativa de reproduzir o RFL e o RGE, optou-se por utilizar uma única exposição no dia, duas ou três vezes na semana nos ratos estudados. Somente foram utilizados ácido clorídrico 0,1N, pepsina e nitrato de sódio. Embora o objetivo principal fosse desenvolver um modelo que causasse alterações histológicas pré e neoplásicas, as

alterações inflamatórias encontradas evidenciaram que o mesmo não pode ser considerado ideal. Se a exposição às substâncias do refluxo fosse mais frequente, em episódios e intensidade, como o que se observa em humanos, os resultados indicam que poder-se-ia observar injúria tecidual mais intensa e as esperadas alterações displásicas e neoplásicas. A resistência à injúria apresentada pelos ratos da raça Wistar pode ser outro fator que explique a ausência de alterações neoplásicas na amostra estudada.

Na Fase I optou-se por adicionar outro fator altamente irritante da mucosa do TADS, embora a escolha do modelo de refluxo mantivesse a característica de conter apenas substâncias semelhantes ao do conteúdo refluído em humanos, alterando-se apenas a frequência, desta vez diária, embora se mantivesse uma única vez ao dia.

Para expor os ratos aos efeitos nocivos da fumaça do cigarro, o modelo proposto por Biselli *et al.*<sup>27</sup> foi inicialmente montado no laboratório do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da UNICAMP, com consentimento prévio dos autores. Após a fase piloto, em que se evidenciou a reprodutibilidade do método, nova modificação foi incorporada à câmara pré-existente para uma exposição mais intensa à mesma quantidade de cigarros, uma vez que os animais estudados eram ratos Wistar e não camundongos, sabidamente mais resistentes à injúria.

A nova câmara de exposição mostrou-se mais eficiente que a proposta por Biselli *et al.*<sup>27</sup> já que expunha os ratos a maior quantidade de partículas de monóxido de carbono, como aferido pelo aparelho ToxiPro®. Dois animais foram perdidos nesta fase por intoxicação ao CO, tamanha sua concentração na câmara durante o processo de queima do cigarro.

A associação refluxo e tabagismo não apresentou nos ratos as esperadas alterações significativas nos sítios estudados, salvo na TEG e apenas nos animais submetidos à simulação do RGE via gavagem. Embora ratos e humanos compartilhem muitas características no processo de lesão e resposta inflamatória, não se pode afirmar que ratos Wistar tenham a mesma predisposição a desenvolver CEC que os humanos, mesmo com exposição a altas concentrações da fumaça do cigarro e suas substâncias comprovadamente carcinógenas.

O modelo proposto com sua modificação expõe o animal como um todo, e não apenas a mucosa de risco. Exposição à fumaça do cigarro apenas da laringe, faringe e esôfago de qualquer animal empregado em modelo experimental permanece utópica.

#### **5.4- Considerações Finais**

Futuras pesquisas com este modelo experimental devem levar em consideração os fatores limitantes encontrados nas duas fases propostas e os demais modelos experimentais existentes ainda podem ser aprimorados. Elevando-se talvez o tempo de exposição tanto da simulação do RFL como do tabagismo, injúria mais intensa possa ocorrer. Repetir o experimento com animais especiais, como ratos Knock-out ou Sprague-Dawley, mais sensíveis imunologicamente ao desenvolvimento de tumores, deve ser a próxima etapa deste estudo. Nesse sentido, deve-se aceitar que os ratos Wistar, em geral, são animais mais resistentes, e talvez por esse motivo não se observou a ocorrência de displasias e neoplasias, apesar do tempo de exposição de seis meses.

Por outro lado, é também importante salientar que a pepsina utilizada na pesquisa foi a sintética, e se for utilizada pepsina de origem animal, como fizeram outros autores, talvez obtenha-se outros resultados.

Outra sugestão seria analisar mais detalhadamente a injúria tecidual, instituindo-se uma quantificação das células inflamatórias por campo de maior aumento mesmo com a microscopia óptica e depois chegar à microscopia eletrônica.

Além disso, a utilização de marcadores moleculares e de proliferação celular como o Ki-67 com técnicas de imunohistoquímica pode auxiliar na detecção de lesão tecidual precoce.

Obviamente não se deve transpor os resultados e as conclusões de uma pesquisa experimental para humanos. Entretanto, pode-se inferir com esta pesquisa que os RFL e o tabagismo causam injúria tecidual não desprezível.

## **6- CONCLUSÕES**



As conclusões obtidas foram:

- 1- Os modelos experimentais de simulação dos refluxos gastro-esofágico e faringolaríngeo e de tabagismo desenvolvido se mostraram eficazes e reprodutíveis.
- 2- Foi evidenciada lesão tecidual nas mucosas faringolaríngea e esofágica dos animais, caracterizada por processo inflamatório, com significância estatística, causada pela simulação dos refluxos faringolaríngeo e gastro-esofágico. Na orofaringe houve predominância de processo inflamatório mastocitário, enquanto na laringe e esôfago foi linfocitário. Foram evidenciadas alterações inflamatórias leves nas mucosas faringolaríngea e esofágica secundária à simulação do tabagismo.
- 3- Nenhum dos modelos estudados foi capaz de produzir alterações neoplásicas.





## **7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



1. Burch JD, Howe GR, Miller AB, Semenciw R. Tobacco, alcohol, asbestos, and nickel in the etiology of cancer of the larynx: A case study. *J Natl Cancer Inst.* 1981; 67(6):1219-24.
2. De Stefani E, Correa P, Oreggia F, Leiva J, Rivero S, Fernandez G, Deneo-Pellegrini H, Zavala D, Fontham E. Risk factors for laryngeal cancer. *Cancer.* 1987; 60(12):3087-91.
3. Koufman JA, Burke AJ. The etiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am.* 1997; 30(1): 1-19.
4. Davidson BJ. Epidemiology and Etiology. "In": Shah JP (org.): *Cancer of the Head and Neck.* McGraw Hill. 2001. p 1-18.
5. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 1953; 6(5): 963-8.
6. Assimakopoulos D, Patrikakos G. The role of gastroesophageal reflux in the pathogenesis of laryngeal carcinoma. *Am J Otolaryngol.* 2002; 23(6):351-7.
7. Bacciu A, Mercante G, Ingegnoli A, Bacciu S, Ferri T. Reflux esophagitis as a possible risk factor in the development of pharyngolaryngeal squamous cell carcinoma. *Tumori.* 2003; 89(5):485-7.
8. Biacabe B, Gleich LL, Lacourreye O, Hatl DM, Bouchoucha M, Brasnu D. Silent gastroesophageal reflux disease in patients with pharyngolaryngeal cancer: further results. *Head Neck.* 1998; 20: 510-514.
9. Chen MY, Ott DJ, Casolo BJ, Moghazy KM, Koufman JA. Correlation of laryngeal and pharyngeal carcinomas and 24-hour pH monitoring of the esophagus and pharynx. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998; 119(5):460-2.
10. Chen MY, Ott DJ, Casolo BJ, Moghazy KM, Koufman JA. Correlation of laryngeal and pharyngeal carcinomas and 24-hour pH monitoring of the esophagus and pharynx. Retraction. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999; 121(1):168.

11. Copper MP, Smit CF, Stanojcic LD, Devriese PP, Schouwenburg PF, Mathus-Vliegen LMH. High incidence of laryngo-pharyngeal reflux in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope*. 2000; 110: 1007-1011.
12. Dagli S, Dagli U, Kurtaran H, Alkim C, Sahin B. Laryngopharyngeal reflux in laryngeal cancer. *Turk J Gastroenterol*. 2004; 15(2):77-81.
13. El-Serag HB, Hepworth EJ, Lee P, Sonnenberg A. Gastroesophageal reflux disease is a risk factor for laryngeal and pharyngeal cancer. *Am J Gastroenterol*. 2001; 96(7): 2013-18.
14. Freije JE, Beatty TW, Campbell BH, Woodson BT, Schultz CJ, Toohill RJ. Carcinoma of the larynx with gastroesophageal reflux. *Am J Otolaryngol*. 1996; 17(6): 386-390.
15. Galli J, Cammarota G, Calo L, Agostino S, D'Ugo D, Cianci R, Almadori G. The role of acid and alkaline reflux in laryngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 2002; 112(10): 1861-5.
16. Galli J, Frenguelli A, Calo L, Agostinho S, Cianci R, Cammarota G. Role of gastroesophageal reflux in precancerous conditions and in squamous cell carcinoma of the larynx: our experience. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2001; 21(6):350-5.
17. Lewin JS, Gillenwater AM, Garrett JD, Bishop-Leone JK, Nguyen DD, Callender DL, Ayers GD, Myers JN. Characterization of laryngopharyngeal reflux in patients with premalignant or early carcinomas of the larynx. *Cancer*. 2003; 97(4):1010-4.
18. Morrison MD. Is chronic gastroesophageal reflux a causative factor in glottic carcinoma? *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1988; 99(4): 370-374.
19. Olson NR. Aerodigestive malignancy and gastroesophageal reflux disease. *Am J Med*. 1997; 24;103(5A):97S-99S
20. Qadeer MA, Colabianchi N, Strome M, Vaezi MF. Gastroesophageal reflux and laryngeal cancer: causation or association? *Am J Otolaryngol*. 2006; 27(2):119-28.

21. Ward PH, Hanson DG. Reflux as an etiological factor of carcinoma of the larynx. *Laryngoscope*. 1988; 98:1195-99.
22. Winter JW, Paterson S, Scobie G, Preston T, McColl KE. N-nitrosamine generation from ingested nitrate via nitric oxide in subjects with and without gastroesophageal reflux. *Gastroenterology*. 2007; 133(1):164-74.
23. Suzuki H, Iijima K, Scobie G, Fyfe V, McColl KE. Nitrate and nitrosative chemistry within Barrett's oesophagus during acid reflux. *Gut*. 2005; 54(11):1527-35.
24. Wight R, Paleri V, Arullendran P. Current theories for the development of nonsmoking and nondrinking laryngeal carcinoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003; 11(2): 73-7.
25. D'Agostini F, Balansky RM, Izzotti A, Lubet RA, Kelloff GJ, De Flora S. Modulation of apoptosis by cigarette smoke and cancer chemopreventive agents in the respiratory tract of rats. *Carcinogenesis*. 2001; 22(3): 375-80.
26. Shapiro SD. Animal Models for COPD. *Chest*. 2000; 117: 223S-227S.
27. Biselli PJC, FDTQS Lopes, HT Moriya, DHRF Rivero, AC Toledo, PHN Saldiva, T Mauad, MA Martins. Short-term exposure of mice to cigarette smoke and/or residual oil fly ash produces proximal airspace enlargements and airway epithelium remodeling. *Braz J Med Biol Res*. 2011; 44(5): 460-68.
28. Oezcelik A, DeMeester SR. General anatomy of the esophagus. *Thorac Surg Clin*. 2001; 21(2):289-97.
29. Patti MG, Gantert W, Way LW. Surgery of the esophagus. *Anatomy and physiology. Surg Clin North Am*. 1997; 77(5):959-70.
30. Kessing BF, Conchillo JM, Bredenoord AJ, Smout AJ, Masclee AA. Review article: the clinical relevance of transient lower oesophageal sphincter relaxations in gastro-oesophageal reflux disease. *Ailment Pharmacol Ther*. 2011; 33(6):650-61.

31. Goyal RK, Chaudhury A. Physiology of normal esophageal motility. *J Clin Gastroenterol*. 2008; 42(5):610-19.
32. Diamant NE. Neuromuscular mechanisms of primary peristalsis. *Am J Med*. 1997; 103(5A):40S-43S.
33. Park H, Conklin JL. Neuromuscular control of esophageal peristalsis. *Curr Gastroenterol Rep*. 1999; 1(3):186-97.
34. Goyal RK, Padmanabhan R, Sang Q. Neural circuits in swallowing and abdominal vagal afferent-mediated lower esophageal sphincter relaxation. *Am J Med*. 2001; 111 Suppl 8A: 95S-105S.
35. Sivarao DV, Goyal RK. Functional anatomy and physiology of the upper esophageal sphincter. *Am J Med*. 2000; 108 Suppl 4A:27S-37S.
36. Blackshaw LA. New insights in the neural regulation of the lower oesophageal sphincter. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2008; 12 Suppl 1:33-9.
37. Andreollo NA, Lopes LR. Doença do refluxo gastro-esofágico: o que há de atual? “In”: Ivan Ceconello e cols. *Atualização em Cirurgia do Aparelho Digestivo e Coloproctologia*. 1 ed. São Paulo: TecArt, 2009, v. 1, p. 63-71.
38. Koufman JA. Laryngopharyngeal reflux is different from classic gastroesophageal reflux disease. *Ear Nose Throat J*. 2002; 81(9 Suppl 2):7-9.
39. Andreollo NA, Lopes LR, Coelho-Neto JS. Gastroesophageal reflux disease: what is the effectiveness of diagnostic tests? *Arq Bras Cir Dig*. 2010; 23(1): 6-10.
40. Deveney CW, Benner K, Cohen J. Gastroesophageal reflux and laryngeal disease. *Arch Surg*. 1993; 128(9):1021-5.
41. Wiener GJ, Koufman JA, Wu WC, Cooper JB, Richter JE, Castell DO. Chronic hoarseness secondary to gastroesophageal reflux disease: documentation with 24-h ambulatory pH monitoring. *Am J Gastroenterol*. 1989; 84(12): 1503-8.

42. Thompson LDR. Diagnostically challenging lesions in head and neck pathology. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1997; 254: 357-366.
43. Olson NR. Laryngopharyngeal manifestations of gastroesophageal reflux disease. *Otolaryngol Clin North Am.* 199; 24(5):1201-13.
44. Malfertheiner P, Hallerback B. Clinical manifestations and complications of gastroesophageal reflux disease (GERD). *Int J Clin Pract.* 2005; 59(3): 346-55.
45. Gabriel CE, Jones DG. The importance of chronic laryngitis. *J Laryngol Otol.* 1960; 74: 349-57.
46. Glanz H, Kleinsasser O. Chronic laryngitis and carcinoma. *Arch Otorhinolaryngol.* 1976; 8;212(1):57-75.
47. Koufman JA. The Otolaryngologic Manifestations of Gastroesophageal Reflux Disease (GERD): A Clinical investigation of 225 Patients Using Ambulatory 24-Hour pH Monitoring and an Experimental Investigation of the Role of Acid and Pepsin in the Development of Laryngeal Injury. *Laryngoscope.* 1991; 101:1-78.
48. Nasi A, de Moraes-Filho JP, Cecconello I. Gastroesophageal reflux disease: an overview. *Arq Gastroenterol.* 2006; 43(4):334-41.
49. Johnson LF, DeMeester TR. Development of the 24-hour intraesophageal pH monitoring composite scoring system. *J Clin Gastroenterol.* 1986; 8 Suppl 1:52-8.
50. Adams J, Heintz P, Gross N, Andersen P, Everts E, Wax M, Cohen J. Acid/Pepsin promotion of carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2000; 126:405-409.
51. Bulmer DM, Ali MS, Brownlee IA, Dettmar DW, Pearson JP. Laryngeal mucosa: its susceptibility to acid and pepsin. *Laryngoscope.* 2010; 120(4): 777-82.
52. Quinn R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition.* 2005; 21:777-7.

53. Fagundes DJ, Taha MO. Animal disease model: choice's criteria and current animals specimens. *Acta Cir Bras.* 2004; 19(1): 59-65.
54. Maier H, Sennewald D, Heller GF, Weidauer H. Chronic alcohol consumption-the key risk factor for pharyngeal cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1994;110: 168-73.
55. Cherry J, Margulies SI. Contact ulcer of the larynx. *Laryngoscope.* 1968; 78(11): 1937-40.
56. Mercante G, Bacciu A, Ferri T, Bacciu S. Gastroesophageal reflux as a possible co-promoting factor in the development of the squamous-cell carcinoma of the oral cavity, of the larynx and of the pharynx. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 2003; 57(2): 113-7.
57. Rubin JS, Benjamin E, Prior A, Lavy J. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in malignant and premalignant conditions of head and neck. *J Laryngol Otol.* 2003; 117(2): 118-21.
58. Nurgalieva ZZ, Graham DY, Dahlstrom KR, Wei Q, Sturgis EM. A pilot study of *Helicobacter pylori* infection and risk of laryngopharyngeal cancer. *Head Neck.* 2005; 27(1): 22-7.
59. Akbayir N, Basak T, Seven H, Sungun A, Erdem L. Investigation of *Helicobacter pylori* colonization in laryngeal neoplasia. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2005;262(3):170-2.
60. Galli J, Cammarota G, Volante M, De Corso E, Almadori G, Paludetti G. Laryngeal carcinoma and laryngo-pharyngeal reflux disease. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2006; 26(5): 260-63.
61. Francis DO, Maynard C, Weymuller EA, Reiber G, Merati AL, Yueh B. Reevaluation of gastroesophageal reflux disease as a risk factor for laryngeal cancer. 2011; 121: 102-5.
62. Goldberg HI, Dodds WJ, Gee S, Montgomery C, Zboralske FF. Role of acid and pepsin in acute experimental esophagitis. *Gastroenterology.* 1969; 56(2): 223-30.



63. Delahunty JE, Cherry J. Experimentally produced vocal cord granulomas. *Laryngoscope*. 1968; 78(11): 1941-7.
64. Goldberg HI, Dodds WJ, Gee S, Montgomery C, Zboralske FF. Role of acid and pepsin in acute experimental esophagitis. *Gastroenterology*. 1969; 56(2): 223-30.
65. Lillemoe KD, Johnson LF, Harmon JW. Role of components of the gastroduodenal contents in experimental acid esophagitis. *Surgery*. 1982; 92(2):276-84.
66. Morris AL. Factors influencing experimental carcinogenesis in the Hamster cheek pouch. *J Dent Res*. 1961; 40:3-15.
67. Salley JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian Hamster. *J Dent Res*. 1954; 33:253-262.
68. Wattenberg LW, Wiedmann TS, Estensen RD. Chemoprevention of cancer of the upper respiratory tract of the Syrian Golden Hamster by aerosol administration of difluoromethylornithine and 5-Fluoracil. *Cancer Research*. 2004; 64:2347-49.
69. Lewis DJ. Morphological assessment of pathological changes within the rat larynx. *Toxicol Pathol*. 1991; 19(4):352-57.
70. Wright JL, Churg A. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142(6):1422-8.
71. Del Negro A, Araújo MR, Tincani AJ, Meirelles L, Martins AS, Andreollo NA. Experimental carcinogenesis on the oropharyngeal mucosa of rats with hydrochloric acid, sodium nitrate and pepsin. *Acta Cir Bras*. 2008;23(4):337-42.



## **8- ANEXOS**



## ANEXO 1- Divisão dos ratos da Fase I

Laboratório de Medicina e Cirurgia Experimental

Dr. André Del Negro, José Alexandre Colli Neto, José Hélio Zen Jr., Dr. Marina

Data: ____/____/2008			Responsável: _____				Nº	
Grupo I: Só fuma		Grupo II: Só reflui		Grupo III: Fuma e reflui		Grupo IV: Controle		
<b>Grupo I (só fumo):</b>				<b>Grupo III (fumo):</b>				
<b>Grupo II: Só reflui</b>	caixa 3	caixa 4	<b>Grupo III: Fuma e reflui</b>	caixa 5	caixa 6	<b>Grupo IV: controle</b>	caixa 7	caixa8
	r1	r1		r1	r1		r1	r1
	r2	r2		r2	r2		r2	r2
	r3	r3		r3	r3		r3	r3
	r4	r4		r4	r4		r4	r4
	r5	r5		r5	r5		r5	r5

Data: ____/____/2008			Responsável: _____				Nº	
Grupo I: Só fuma		Grupo II: Só reflui		Grupo III: Fuma e reflui		Grupo IV: Controle		
<b>Grupo I (só fumo):</b>				<b>Grupo III (fumo):</b>				
<b>Grupo II: Só reflui</b>	caixa 3	caixa 4	<b>Grupo III: Fuma e reflui</b>	caixa 5	caixa 6	<b>Grupo IV: controle</b>	caixa 7	caixa8
	r1	r1		r1	r1		r1	r1
	r2	r2		r2	r2		r2	r2
	r3	r3		r3	r3		r3	r3
	r4	r4		r4	r4		r4	r4
	r5	r5		r5	r5		r5	r5

Data: ____/____/2008			Responsável: _____				Nº	
Grupo I: Só fuma		Grupo II: Só reflui		Grupo III: Fuma e reflui		Grupo IV: Controle		
<b>Grupo I (só fumo):</b>				<b>Grupo III (fumo):</b>				
<b>Grupo II: Só reflui</b>	caixa 3	caixa 4	<b>Grupo III: Fuma e reflui</b>	caixa 5	caixa 6	<b>Grupo IV: controle</b>	caixa 7	caixa8
	r1	r1		r1	r1		r1	r1
	r2	r2		r2	r2		r2	r2
	r3	r3		r3	r3		r3	r3
	r4	r4		r4	r4		r4	r4
	r5	r5		r5	r5		r5	r5

Data: ____/____/2008			Responsável: _____				Nº	
Grupo I: Só fuma		Grupo II: Só reflui		Grupo III: Fuma e reflui		Grupo IV: Controle		
<b>Grupo I (só fumo):</b>				<b>Grupo III (fumo):</b>				
<b>Grupo II: Só reflui</b>	caixa 3	caixa 4	<b>Grupo III: Fuma e reflui</b>	caixa 5	caixa 6	<b>Grupo IV: controle</b>	caixa 7	caixa8
	r1	r1		r1	r1		r1	r1
	r2	r2		r2	r2		r2	r2
	r3	r3		r3	r3		r3	r3
	r4	r4		r4	r4		r4	r4
	r5	r5		r5	r5		r5	r5

Grupo I: Só fuma		Grupo II: Só reflui		Grupo III: Fuma e reflui		Grupo IV: Controle		
Grupo I (só fumo):				Grupo III (fumo):				
Grupo II: Só reflui	caixa 3	caixa 4	Grupo III: Fuma e reflui	caixa 5	caixa 6	Grupo IV: controle	caixa 7	caixa8
	r1	r1		r1	r1		r1	r1
	r2	r2		r2	r2		r2	r2
	r3	r3		r3	r3		r3	r3
	r4	r4		r4	r4		r4	r4
	r5	r5		r5	r5		r5	r5
Data: ____/____/2008		Responsável: _____					Nº	

<b>Cx 11</b>					
1	0	0	0	0	1
2	0	0	0	0	1
3	1	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0
5	0	0	0	0	1
6	0	0	0	0	0

<b>Cx 12</b>					
1	0	0	0	0	0
2	nr	nr	nr	nr	nr
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0

---

**Grupo VII**

---

<b>Cx 13</b>					
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	1
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	1

<b>Cx 14</b>					
1	0	0	0	0	0
2	nr	nr	nr	nr	nr
3	1	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0

## ANEXO 2- Alterações histológicas verificadas na orofaringe dos Ratos Fase II

Grupo I					
Cx 1	Linfócitos	Plasmócitos	Neutrófilos	Ulceração	Mastócitos
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
Cx 2					
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
Grupo II					
Cx 3					
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
Cx 4					
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
Grupo III					
Cx 5					
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0



<b>Cx 6</b>					
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0

---

**Grupo IV**

---

<b>Cx 7</b>					
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	2	0	0	0	0

<b>Cx 8</b>					
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0

---

**Grupo V**

---

<b>Cx 9</b>					
1	0	0	0	0	1
2	0	0	0	0	1
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0

<b>Cx 10</b>					
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	1
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	1

### ANEXO 3- Alterações histológicas verificadas na laringe dos Ratos Fase II.

Laringe								
	Epitélio	Ulceração	Linfócitos	Neutrófilos	Plasmócitos	Infiltrado inflamatório	Exsudato solto	Outros
<b>Cx 1</b>								
1	0	0	0	0	0	0	0	nr
2	ciliado transicional	0	3	0	2	3	0	nr
3	ciliado transicional	0	1	0	1	1	0	nr
4	ciliado transicional	1	1	0	1	1	1	nr
5	ciliado transicional	0	1	0	1	1	1	nr
6	ciliado transicional	0	3	3	2	3	1	nr
<b>Cx 2</b>								
1	ciliado transicional	0	1	0	1	1	0	nr
2	ciliado transicional	0	2	0	2	2	2	nr
3	ciliado	0	0	0	0	0	0	nr
4	ciliado transicional	0	3	0	3	3	0	nr
5	ciliado	1	3	3	2	3	1	nr
6	transicional	1	2	0	1	2	0	nr
<b>Cx 3</b>								
1	ciliado transicional	0	1	0	1	1	0	nr
2	ciliado transicional	1	2	0	2	2	2	nr
3	ciliado transicional	1	1	0	0	1	0	nr
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	ciliado	1	2	3	2	3	1	nr
6	ciliado	0	1	0	1	1	0	tireóide
<b>Cx 4</b>								
1	transicional	0	2	0	2	2	0	nr
2	ciliado transicional	0	1	0	0	1	0	nr
3	transicional	0	0	0	0	1	0	nr
4	transicional	0	1	0	1	1	0	nr
5	transicional	0	1	0	0	0	0	nr
6	transicional	0	2	2	1	2	0	nr
<b>Cx 5</b>								
1	ciliado transicional	0	2	0	1	2	1	nr
2	ciliado transicional	1	1	0	2	1	1	nr
3	ciliado	3	4	3	3	3	1	tireóide
4	ciliado transicional	0	1	0	1	1	1	hemácias
5	transicional	0	2	1	1	2	1	hemácias
6	0	0	0	0	0	0	0	nr

<b>Cx 6</b>								
1	ciliado transicional	0	1	1	1	1	1	hemácias
2	ciliado transicional	0	1	1	1	1	1	hemácias
3	ciliado transicional	0	1	1	0	1	1	hemácias
4	ciliado transicional	0	2	2	1	1	2	nr
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	ciliado transicional	0	2	0	1	2	2	nr
<b>Cx 7</b>								
1	ciliado transicional	0	1	0	1	1	0	nr
2	ciliado transicional	0	2	0	1	1	0	agregado linfóide
3	escamoso + ciliado transicional	0	1	0	1	1	0	nr
4	escamoso + ciliado transicional	0	1	0	0	1	0	nr
5	escamoso + ciliado transicional	0	1	0	1	1	0	nr
6	Ciliado	3	1	1	3	3	2	tireóide/paratireóide
<b>Cx 8</b>								
1	escamoso + ciliado transicional	0	3	1	3	3	0	nr
2	escamoso + ciliado transicional	2	3	1	1	3	2	nr
3	escamoso + ciliado transicional	0	1	0	1	1	0	nr
4	escamoso + ciliado transicional	0	2	0	1	2	0	nr
5	escamoso + ciliado transicional	0	1	1	1	1	1	nr
6	escamoso + ciliado transicional	0	1	1	1	1	3	fibrose leve
<b>Cx 9</b>								
1	ciliado transicional	1 c/ erosão	1	1	1	1	2	exsudato purulento
2	ciliado	0	1	0	1	1	0	paratireóide
3	escamoso + ciliado transicional	0	1	0	1	1	0	nr
4	escamoso + ciliado transicional	0	1	0	1	1	0	nr
5	escamoso + ciliado transicional	0	1	0	1	1	0	nr
6	escamoso + ciliado transicional	0	1	0	1	1	1	nr

Cx 10								
1	escamoso + ciliado transicional	0	1	0	0	1	0	nr
2	escamoso + ciliado transicional	0	0	0	0	0	0	nr
3	escamoso + ciliado transicional	0	1	0	1	1	0	nr
4	transicional	0	1	0	1	1	0	nr
5	transicional	0	0	0	0	0	0	nr
6	escamoso + ciliado transicional	0	2	0	1	1	0	eosinófilos
Cx11								
1	escamoso + ciliado transicional	0	1	0	0	1	0	eosinófilos
2	escamoso + ciliado transicional	0	1	0	0	1	0	nr
3	ciliado	0	0	0	0	0	0	tireóide
4	ciliado transicional	0	0	0	0	0	0	nr
5	escamoso + ciliado transicional	0	0	0	0	0	0	nr
6	escamoso + ciliado transicional	0	1	0	1	1	0	nr
Cx 12								
1	escamoso + ciliado transicional	0	0	0	0	0	0	nr
2	escamoso + ciliado transicional	0	2	1	2	3	1	nr
3	escamoso + transicional	0	1	0	0	0	1	nr
4	escamoso + transicional	0	0	0	0	0	0	nr
5	transicional	1	0	0	0	0	0	nr
6	escamoso + transicional	0	0	0	0	0	0	nr
Cx 13								
1	escamoso + transicional	0	1	0	1	1	0	nr
2	escamoso + transicional	0	2	0	2	2	0	nr
3	escamoso + ciliado transicional	0	2	0	2	2	0	nr
4	escamoso + transicional	0	2	0	1	2	0	nr
5	escamoso + transicional	0	0	0	1	0	2	nr
Cx 14								
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	ciliado transicional	0	2	1	2	2	0	nr
3	escamoso + ciliado transicional	0	1	1	1	1	2 (neutrófilos)	nr
4	escamoso + ciliado transicional	0	1	0	1	1	0	nr
5	ciliado transicional	0	1	0	1	1	0	nr

**ANEXO 4-** Tabela mostra evolução do peso dos ratos Fase II.

Tabela de pesos dos ratos								
	23-May	13-Jun	16-Jul	13 ago	2 out	01-Nov	Final	Data
<b>Caixa 1</b>	<b>Peso g</b>							
1	217	407	308	342	328	367	374	21-Nov
2	254	349	332	368	397	419	431	21-Nov
3	237	356	341	378	405	421	427	21-Nov
4	243	307	354	397	419	438	449	21-Nov
5	242	339	342	378	403	421	436	21-Nov
6	228	299	342	384	384	397	400	21-Nov
<b>Caixa 2</b>								
1	301	370	427	467	501	402	406	21-Nov
2	292	315	405	446	405	442	466	21-Nov
3	235	347	335	375	382	390	390	21-Nov
4	238	288	326	356	394	408	501	21-Nov
5	280	350	411	448	474	495	492	21-Nov
6	234	307	338	365	387	481	497	21-Nov
<b>Caixa 3</b>								
1	243	289	347	376	400	420	427	21-Nov
2	219	242	288	292	328	451	462	21-Nov
3	276	270	380	416	440	460	471	21-Nov
4	267	323	389	417	435	447	446	21-Nov
5	258	302	348	361	421	446	452	21-Nov
6	266	325	404	379	422	343	349	21-Nov
<b>Caixa 4</b>								
1	265	322	381	413	378	417	427	21-Nov
2	261	325	380	425	457	471	497	21-Nov
3	253	321	381	425	430	441	465	21-Nov
4	235	255	316	333	355	375	396	21-Nov
5	251	307	367	400	420	475	490	21-Nov
6	279	330	402	437	471	436	459	21-Nov
<b>Caixa 5</b>								
1	285	401	408	432	463	478	488	22-Nov
2	284	375	445	491	454	512	525	22-Nov
3	243	273	425	342	366	400	406	22-Nov
4	235	285	330	361	373	391	400	22-Nov
5	289	358	401	432	449	457	483	22-Nov
6	285	369	430	475	460	505	528	22-Nov

<b>Caixa 6</b>								
1	290	336	394	436	464	503	519	22-Nov
2	262	348	405	447	401	394	422	22-Nov
3	247	313	345	382	477	498	545	10-Nov
4	260	312	370	406	441	483	(104,3) 503	22-Nov
5	297	362	405	444	463	490	511	22-Nov
6	247	301	336	367	393	410	368	22-Nov

<b>Caixa 7</b>								
1	250	320	369	355	422	454	460	22-Nov
2	239	303	362	395	421	453	461	22-Nov
3	261	332	390	414	441	445	446	22-Nov
4	288	352	391	424	456	463	472	22-Nov
5	289	373	414	442	470	482	490	22-Nov
6	267	312	356	375	401	428	438	22-Nov

<b>Caixa 8</b>								
1	260	314	356	384	414	396	427	27-Nov
2	267	320	362	385	408	333	309	10-Nov
3	272	325	381	404	453	478	484	27-Nov
4	246	279	338	376	394	540	555	27-Nov
5	307	387	459	506	522	436	449	27-Nov
6	282	336	394	428	444	455	452	27-Nov

<b>Caixa 9</b>								
1	254	306	359	408	447	466	475	28-Nov
2	264	325	378	383	414	434	450	28-Nov
3	291	287	x	x	x	x	x	28-Nov
4	295	299	451	492	547	566	578	28-Nov
5	260	282	377	403	426	448	454	28-Nov
6	223	205	345	329	388	418	434	28-Nov

<b>Caixa 10</b>								
1	246	299	355	376	394	424	428	28-Nov
2	282	320	370	387	421	432	454	28-Nov
3	242	358	325	290	368	396	414	28-Nov
4	245	374	350	301	386	406	420	28-Nov
5	254	321	333	352	380	394	398	28-Nov
6	188	274	253	257	286	298	310	28-Nov

<b>Caixa 11</b>								
1	274	345	425	474	518	535	565	28-Nov
2	247	277	326	358	381	401	422	28-Nov
3	272	339	394	427	461	485	506	28-Nov
4	217	265	310	338	367	390	384	28-Nov
5	250	333	384	422	450	474	486	28-Nov
6	292	349	401	438	485	515	531	28-Nov

<b>Caixa 12</b>								
1	293	363	413	442	484	418	436	28-Nov
2	302	372	432	477	473	469	449	28-Nov
3	239	320	373	412	420	471	480	28-Nov
4	262	325	358	386	404	446	450	28-Nov
5	293	373	448	499	511	546	556	28-Nov
6	281	350	411	447	475	531	532	28-Nov

<b>Caixa 13</b>								
1	274	343	370	384	417	468	478	28-Nov
2	257	298	332	423	386	422	429	28-Nov
3	279	352	396	412	444	441	450	28-Nov
4	286	331	410	367	480	492	496	28-Nov
5	251	308	372	365	430	453	454	28-Nov

<b>Caixa 14</b>								
1	245	317	368	401	x	x	x	28-Nov
2	267	345	389	355	443	471	486	28-Nov
3	266	326	381	423	455	372	482	28-Nov
4	240	291	328	440	385	406	418	28-Nov
5	253	295	337	399	319	485	379	28-Nov

## ANEXO 5

### 12- ORIGINAL ARTICLE

#### Experimental Oncology

#### **Experimental carcinogenesis on the cervical esophagus mucosa of rats with hydrochloric acid, sodium nitrate and pepsin<sup>I</sup>**

Carcinogênese experimental na mucosa esofágica cervical de ratos com ácido clorídrico, nitrato de sódio e pepsina

**André Del Negro<sup>I</sup>, Marina Raquel Araújo<sup>II</sup>, Alfio José Tincani<sup>III</sup>, Luciana Meirelles<sup>IV</sup>, Antônio Santos Martins<sup>IV</sup>, Nelson Adami Andreollo<sup>V</sup>**

<sup>I</sup> Fellow PhD degree, Attending surgeon, Division of Head and Neck, Department of Surgery, UNICAMP, Campinas, Brazil.

<sup>II</sup> Biologist, Laboratory of Enzymology and Experimental Carcinogenesis, UNICAMP, Campinas, Brazil.

<sup>III</sup> PhD, Associated Professor, Division of Head and Neck, Department of Surgery, UNICAMP, Campinas, Brazil.

<sup>IV</sup> PhD, Assistant Professor, Department of Pathology, UNICAMP, Campinas, Brazil.

<sup>V</sup> PhD, Full Professor, Gastroenterological Surgery, Chairman of the Department of Surgery, UNICAMP, Campinas, Brazil.

#### **ABSTRACT**

**Purpose:** To investigate the carcinogenic action of hydrochloric acid, pepsin and sodium nitrate on the cervical esophagus mucosa of rats, simulating the gastroesophageal reflux. **Methods:** Eighty-two Wistar rats were divided in seven groups and submitted to 2 or 3 weekly applications of hydrochloric acid, pepsin and sodium nitrate on the esophageal mucosa during 6 months. Study groups comprised 12 animals each. Rats in groups I and II were submitted to 2 (GI) or 3 (GII) weekly applications of 0.1N hydrochloric acid. Groups III and IV were submitted to 2 (GIII) or



3 (GIV) weekly applications of 0.1N hydrochloric acid solution with pepsin. Groups V and VI were submitted to 2 (GV) or 3 (GVI) weekly applications of 0.1N hydrochloric acid and treated with daily nitrate diluted in water. Group VII consisted of 10 animals submitted to 2 weekly applications of filtered water. **Results:** No dysplasia, intra-epithelial neoplasia or invasive carcinomas were detected. Inflammatory changes were observed in varying degrees and lymphocytes were more common in Groups I and II ( $p=0.019$ ). **Conclusion:** The data of the current study could not corroborate the hypothesis that gastroesophageal and pharyngolaryngeal refluxes are carcinogenic factors to the cervical esophagus mucosa, and more studies are necessary in the future.

**Key words:** Gastroesophageal Reflux. Hydrochloric Acid. Nitrates. Carcinoma, Squamous Cell. Rats.

## RESUMO

**Objetivo:** Investigar a ação carcinogênica do ácido clorídrico, pepsina e nitrato de sódio na mucosa do esôfago cervical de ratos, simulando o refluxo gastro-esofágico. **Métodos:** Oitenta e dois ratos Wistar foram divididos em 7 grupos e submetidos a 2 ou 3 aplicações semanais de ácido clorídrico, pepsina e nitrato de sódio na mucosa esofágica durante 6 meses. Os grupos de estudo envolveram 12 animais cada. Os ratos nos grupos I e II foram submetidos à 2 (GI) ou 3 (GII) aplicações semanais de ácido clorídrico 0,1N. Nos grupos III e IV foram 2 (GIII) ou 3 (GIV) aplicações semanais de ácido clorídrico e pepsina. Nos grupos V e VI foram 2 (GV) ou 3 (GVI) aplicações semanais de ácido clorídrico além da oferta de nitrato diluído em água diariamente. Grupo VII era composto por 10 animais submetidos a 2 aplicações semanais de água filtrada. **Resultados:** Não se observou displasia, neoplasia intra-epitelial ou neoplasia invasora. Alterações inflamatórias em graus variados foram observadas, com infiltrado linfocitário mais intenso nos grupos I e II. ( $p=0,019$ ). **Conclusão:** Os dados do presente estudo não confirmam a hipótese que o refluxo gastro-esofágico e faringolaríngeo são fatores carcinogênicos para a mucosa esofágica cervical e mais estudos são necessários no futuro.

**Descritores:** Refluxo Gastroesofágico. Ácido Clorídrico. Nitratos. Carcinoma de Células Escamosas. Ratos.

## ANEXO 6

### 7- ORIGINAL ARTICLE

#### Experimental Oncology

#### **Experimental carcinogenesis on the oropharyngeal mucosa of rats with hydrochloric acid, sodium nitrate and pepsin<sup>1</sup>**

Carcinogênese experimental na mucosa orofaríngea de ratos com ácido clorídrico, nitrato de sódio e pepsina

André Del Negro <sup>I</sup>, Marina Raquel Araújo<sup>II</sup>, Alfio José Tincani<sup>III</sup>, Luciana Meirelles<sup>IV</sup>, Antônio Santos Martins<sup>III</sup>, Nelson Adami Andreollo<sup>V</sup>

I Fellow PhD degree, Attending surgeon, Division of Head and Neck, Department of Surgery, UNICAMP, Brazil.

II Biologist, Laboratory of Enzymology and Experimental Carcinogenesis, UNICAMP. Brazil

III PhD, Associate Professor, Division of Head and Neck, Department of Surgery, UNICAMP, Brazil.

IV PhD, Assistant Professor, Department of Pathology, UNICAMP, Brazil.

V PhD, Full Professor, Gastroenterological Surgery, Chairman of the Department of Surgery, UNICAMP, Brazil.

#### **ABSTRACT**

##### **Purpose:**

To investigate the carcinogenic action of hydrochloric acid, pepsin and sodium nitrate on the oropharyngeal mucosa of rats, simulating the reflux of gastric contents.

**Methods:** Eighty-two Wistar rats were divided in seven groups and submitted to 2

or 3 weekly applications of hydrochloric acid, pepsin and sodium nitrate on the pharyngeal mucosa during six months. Study groups comprised 12 animals each. Rats in groups I and II were submitted to 2 (GI) or 3 (GII) weekly applications of 0.1N hydrochloric acid. Groups III and IV were submitted to 2 (GIII) or 3 (GIV) weekly applications of 0.1N hydrochloric acid solution with

pepsin. Groups V and VI were submitted to 2 (GV) or 3 (GVI) weekly applications of 0.1N hydrochloric acid and treated with daily nitrate diluted in water. Group VII consisted of 10 animals submitted to 2 weekly applications of filtered water.

### **Results:**

No dysplasia, intra-epithelial neoplasia or invasive carcinomas were detected. Inflammatory changes were observed in varying degrees and mast cells were more common in Groups V and VI ( $p=0.006$ ).

**Conclusion:** The data of the current study could not corroborate the hypothesis that gastroesophageal and pharyngolaryngeal refluxes are carcinogenic factors to the laryngopharyngeal mucosa, and more studies are necessary in the future.

**Key words:** Gastroesophageal Reflux. Hydrochloric Acid. Nitrates. Carcinoma, Squamous Cell. Rats.

## **RESUMO**

### **Objetivo:**

Investigar a ação carcinogênica do ácido clorídrico, pepsina e nitrato de sódio na mucosa orofaríngea de ratos, simulando o refluxo do conteúdo gástrico à mucosa do faringo-laríngea.

**Métodos:** Oitenta e dois ratos Wistar foram divididos em 7 grupos e submetidos a 2 ou 3 aplicações semanais de ácido clorídrico, pepsina e nitrato de sódio na mucosa orofaríngea durante 6 meses.

Os grupos de estudo envolveram 12 animais cada. Os ratos nos grupos I e II foram submetidos à 2 (GI) ou 3 (GII) aplicações semanais de ácido clorídrico 0,1N. Nos grupos III e IV foram 2 (GIII) ou 3 (GIV) aplicações semanais de ácido clorídrico e pepsina. Nos grupos V e VI foram 2 (GV) ou 3 (GVI) aplicações semanais de ácido clorídrico além da oferta de nitrato diluído em água diariamente. Grupo VII era composto por 10 animais submetidos a 2 aplicações semanais de água filtrada.

**Resultados:** Não se observou displasia, neoplasia intra-epitelial ou neoplasia invasora. Alterações inflamatórias em graus variados foram observadas, com infiltrado mastocitário mais intenso nos grupos V e VI. ( $p=0,006$ ).

**Conclusão:** Os dados do presente estudo não confirmam a hipótese que o refluxo gastro-esofágico e faringo-laríngeo são fatores carcinogênicos para a mucosa laringo-faríngea e mais estudos são necessários no futuro.

**Descritores:** Refluxo Gastroesofágico. Ácido Clorídrico. Nitratos. Carcinoma de Células Escamosas. Ratos.

<sup>1</sup> Research performed at the Laboratory of Enzymology and Experimental Carcinogenesis, School of Medical Sciences – UNICAMP, Campinas,

Sao Paulo, Brazil.

Del Negro A et al

338 - Acta Cirúrgica Brasileira - Vol. 23 (4) 2008

## **9- APÊNDICES**



## APÊNDICE 1- Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp



CEEA/Unicamp

### Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

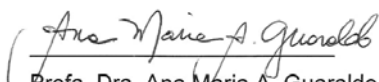
#### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1394-1, sobre "Carcinogênese experimental na mucosa faríngea, laríngea e esofágica de ratos com ácido clorídrico, nitrato de sódio e pepsina associado ao tabagismo", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Nelson Adami Andreollo / André Del Negro, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 29 de novembro de 2007.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1394-1, entitled "Experimental carcinogenesis in the laryngeal, pharyngeal and esophageal mucosa of rats with hydrochloric acid, sodium nitrate and pepsin associated with smoking", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on November 29, 2007.

Campinas, 29 de novembro de 2007.

  
Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea>

## APÊNDICE 2

De: Câmara de Pesquisa – Serviço de Estatística – FCM – Unicamp  
Para: André Del Negro / Dr. Nelson A Andreollo – Cirurgia  
Data: 27 de junho de 2007.

### Carcinogênese experimental na mucosa laríngea de ratos com ácido clorídrico, nitrato de sódio e pepsina.

#### Objetivos:

1. Analisar e comparar o peso dos ratos entre os 7 grupos (com n=10 a n=12 animais por grupo) e os 7 tempos de coleta.
2. Analisar e comparar os parâmetros de alteração histológica da laringe entre os ratos dos 7 grupos de estudo (controle, ácido clorídrico, pepsina e nitrato de sódio, com 2 ou 3 aplicações por semana).

#### Metodologia Estatística:

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo, foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas (alterações histológicas), com os valores de frequência absoluta (n) e relativa (%), e calculadas as estatísticas descritivas (com medidas de posição e dispersão – média, desvio-padrão, valores mínimo, máximo, e mediana) das variáveis contínuas (peso e graus).

Para comparar as alterações histológicas como variáveis categóricas entre os grupos foram utilizados os testes Qui-Quadrado ou exato de Fisher (para valores esperados menores que 5). Para comparação dos graus das alterações histológicas (considerados como variáveis numéricas) entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, devido à ausência de distribuição Normal das variáveis, seguido do teste de Dunn.

Para comparação simultânea do peso entre os grupos e entre os tempos de coleta, foi utilizada a Análise de Variância para medidas repetidas (ANOVA for repeated measures), seguida pelo teste post-hoc de Tukey para comparar os grupos em cada momento, e o teste de perfil por contrastes (Profile test) para analisar a evolução entre os tempos, em cada grupo.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ( $p < 0.05$ ).



## Resultados:

### Análise Descritiva e Comparativa entre Grupos – Histologia Laringe

- as tabelas 1 e 2, a seguir, apresentam as análises descritivas e comparativas das alterações histológicas entre os 7 grupos de ratos, considerando os graus como variáveis categóricas, e depois como variáveis numéricas ou escores.

Tabela 1. Análise comparativa das variáveis categóricas entre os 7 grupos.

Tabela 1: Análise comparativa das variáveis clínicas entre os 3 grupos.

ANÁLISE DESCRITIVA GERAL

ULCERACAO	Frequency	Percent	NEUTROFILOS	Frequency	Percent	INFIL_INFLAM	Frequency	Percent
0	65	84.42	0	58	75.32	0	13	16.88
1	9	11.69	1	13	16.88	1	40	51.95
2	1	1.30	2	2	2.60	2	14	18.18
3	2	2.60	3	4	5.19	3	10	12.99
LINFOCITOS	Frequency	Percent	PLASMOCITOS	Frequency	Percent	EXSUDA_SOLT	Frequency	Percent
0	12	15.58	0	20	25.97	0	50	64.94
1	40	51.95	1	41	53.25	1	17	22.08
2	18	23.38	2	12	15.58	2	9	11.69
3	6	7.79	3	4	5.19	3	1	1.30
4	1	1.30						

EPITELIO	Frequency	Percent	OUTROS	Frequency	Percent
ciliado	8	10.39	agregado linfóide	1	1.30
ciliado transicional	26	33.77	eosinófilos	2	2.60
escamoso + ciliado transicional	26	33.77	exsudato purulento	1	1.30
escamoso + transicional	7	9.09	fibrose leve	1	1.30
transicional	10	12.99	hemácias	5	6.49
			nr	62	80.52
			paratireóide	1	1.30
			tireóide	3	3.90
			tireóide/paratireóide	1	1.30

ULCERACAO	GRUPO	Total
Frequency,		
Col Pct	AC CLOR3, AC CLOR2, PEPSINA3, PEPSINA2, NITRATO3, NITRATO2, CONTROLE,	
0	8, 8, 8, 10, 11, 11, 9,	65
	72.73, 72.73, 80.00, 83.33, 91.67, 91.67, 100.00,	
1-3	3, 3, 2, 2, 1, 1, 0,	12
	27.27, 27.27, 20.00, 16.67, 8.33, 8.33, 0.00,	
Total	11 11 10 12 12 12 9	77

TESTE EXATO DE FISHER: P=0.582

LINFOCITOS	GRUPO	Total
Frequency,		
Col Pct	AC CLOR3, AC CLOR2, PEPSINA3, PEPSINA2, NITRATO3, NITRATO2, CONTROLE,	
0	1, 1, 0, 0, 2, 7, 1,	12
	9.09, 9.09, 0.00, 0.00, 16.67, 58.33, 11.11,	
1	4, 6, 5, 8, 9, 4, 4,	40
	36.36, 54.55, 50.00, 66.67, 75.00, 33.33, 44.44,	
2	2, 4, 4, 2, 1, 1, 4,	18
	18.18, 36.36, 40.00, 16.67, 8.33, 8.33, 44.44,	
3-4	4, 0, 1, 2, 0, 0, 0,	7
	36.36, 0.00, 10.00, 16.67, 0.00, 0.00, 0.00,	
Total	11 11 10 12 12 12 9	77

TESTE EXATO DE FISHER: P=0.007

Tabela 1 (cont). Análise comparativa das variáveis categóricas entre os 7 grupos.

NEUTROFILOS		GRUPO							Total
Frequency,	Col Pct	AC CLOR3	AC CLOR2	PEPSINA3	PEPSINA2	NITRATO3	NITRATO2	CONTROLE	
0	9 81.82	9 81.82	4 40.00	7 58.33	11 91.67	11 91.67	7 77.78		58
1	0 0.00	0 0.00	4 40.00	5 41.67	1 8.33	1 8.33	2 22.22		13
2-3	2 18.18	2 18.18	2 20.00	0 0.00	0 0.00	0 0.00	0 0.00		6
Total		11	11	10	12	12	12	9	77
TESTE EXATO DE FISHER: P=0.007									
PLASMOCITOS		GRUPO							Total
Frequency,	Col Pct	AC CLOR3	AC CLOR2	PEPSINA3	PEPSINA2	NITRATO3	NITRATO2	CONTROLE	
0	1 9.09	4 36.36	1 10.00	1 8.33	3 25.00	10 83.33	0 0.00		20
1	5 45.45	4 36.36	7 70.00	9 75.00	9 75.00	1 8.33	6 66.67		41
2-3	5 45.45	3 27.27	2 20.00	2 16.67	0 0.00	1 8.33	3 33.33		16
Total		11	11	10	12	12	12	9	77
TESTE EXATO DE FISHER: P<0.001									
INFIL INFLAM		GRUPO							Total
Frequency,	Col Pct	AC CLOR3	AC CLOR2	PEPSINA3	PEPSINA2	NITRATO3	NITRATO2	CONTROLE	
0	1 9.09	1 9.09	0 0.00	0 0.00	2 16.67	8 66.67	1 11.11		13
1	4 36.36	6 54.55	6 60.00	7 58.33	10 83.33	3 25.00	4 44.44		40
2	2 18.18	3 27.27	3 30.00	2 16.67	0 0.00	0 0.00	4 44.44		14
3	4 36.36	1 9.09	1 10.00	3 25.00	0 0.00	1 8.33	0 0.00		10
Total		11	11	10	12	12	12	9	77
TESTE EXATO DE FISHER: P<0.001									
EXSUDA SOLT		GRUPO							Total
Frequency,	Col Pct	AC CLOR3	AC CLOR2	PEPSINA3	PEPSINA2	NITRATO3	NITRATO2	CONTROLE	
0	6 54.55	9 81.82	0 0.00	8 66.67	10 83.33	10 83.33	7 77.78		50
1	4 36.36	1 9.09	8 80.00	1 8.33	1 8.33	2 16.67	0 0.00		17
2-3	1 9.09	1 9.09	2 20.00	3 25.00	1 8.33	0 0.00	2 22.22		10
Total		11	11	10	12	12	12	9	77
TESTE EXATO DE FISHER: P<0.001									

Tabela 2. Análise comparativa das variáveis numéricas (grau histológico) entre os 7 grupos.

ULCERAÇÃO							LINFÓCITOS						
VARIÁVEL	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIANA	MÁX	VARIÁVEL	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIANA	MÁX
AC CLOR3	11	0.27	0.47	0.00	0.00	1.00	AC CLOR3	11	1.82	1.08	0.00	2.00	3.00
AC CLOR2	11	0.27	0.47	0.00	0.00	1.00	AC CLOR2	11	1.27	0.65	0.00	1.00	2.00
PEPSINA3	10	0.40	0.97	0.00	0.00	3.00	PEPSINA3	10	1.70	0.95	1.00	1.50	4.00
PEPSINA2	12	0.42	1.00	0.00	0.00	3.00	PEPSINA2	12	1.50	0.80	1.00	1.00	3.00
NITRATO3	12	0.08	0.29	0.00	0.00	1.00	NITRATO3	12	0.92	0.51	0.00	1.00	2.00
NITRATO2	12	0.08	0.29	0.00	0.00	1.00	NITRATO2	12	0.50	0.67	0.00	0.00	2.00
CONTROLE	9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	CONTROLE	9	1.33	0.71	0.00	1.00	2.00
TESTE DE KRUSKAL-WALLIS: P=0.570							TESTE DE KRUSKAL-WALLIS: P=0.004						
COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS (TESTE DE DUNN) / DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS:							COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS (TESTE DE DUNN) / DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS:						
GRUPO 1 * GRUPO 6; GRUPO 3 * GRUPO 6; GRUPO 4 * GRUPO 6.							GRUPO 1 * GRUPO 6; GRUPO 3 * GRUPO 6; GRUPO 4 * GRUPO 6.						
NEUTRÓFILOS							PLASMÓCITOS						
VARIÁVEL	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIANA	MÁX	VARIÁVEL	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIANA	MÁX
AC CLOR3	11	0.55	1.21	0.00	0.00	3.00	AC CLOR3	11	1.45	0.82	0.00	1.00	3.00
AC CLOR2	11	0.45	1.04	0.00	0.00	3.00	AC CLOR2	11	0.91	0.83	0.00	1.00	2.00
PEPSINA3	10	0.90	0.99	0.00	1.00	3.00	PEPSINA3	10	1.20	0.79	0.00	1.00	3.00
PEPSINA2	12	0.42	0.81	0.00	0.00	1.00	PEPSINA2	12	1.25	0.87	0.00	1.00	3.00
NITRATO3	12	0.08	0.29	0.00	0.00	1.00	NITRATO3	12	0.75	0.45	0.00	1.00	1.00
NITRATO2	12	0.08	0.29	0.00	0.00	1.00	NITRATO2	12	0.25	0.62	0.00	0.00	2.00
CONTROLE	9	0.22	0.44	0.00	0.00	1.00	CONTROLE	9	1.33	0.50	1.00	1.00	2.00
TESTE DE KRUSKAL-WALLIS: P=0.074							TESTE DE KRUSKAL-WALLIS: P=0.001						
COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS (TESTE DE DUNN) / DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS:							COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS (TESTE DE DUNN) / DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS:						
GRUPO 1 * GRUPO 6; GRUPO 7 * GRUPO 6; GRUPO 4 * GRUPO 6; GRUPO 3 * GRUPO 6.							GRUPO 1 * GRUPO 6; GRUPO 7 * GRUPO 6; GRUPO 4 * GRUPO 6; GRUPO 3 * GRUPO 6.						
INFILTRADO INFLAMATÓRIO							EXSUDATO SOLTO						
VARIÁVEL	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIANA	MÁX	VARIÁVEL	N	MÉDIA	D.P.	MÍN	MEDIANA	MÁX
AC CLOR3	11	1.82	1.08	0.00	2.00	3.00	AC CLOR3	11	0.55	0.69	0.00	0.00	2.00
AC CLOR2	11	1.36	0.81	0.00	1.00	3.00	AC CLOR2	11	0.27	0.65	0.00	0.00	2.00
PEPSINA3	10	1.50	0.71	1.00	1.00	3.00	PEPSINA3	10	1.20	0.42	1.00	1.00	2.00
PEPSINA2	12	1.57	0.89	1.00	1.00	3.00	PEPSINA2	12	0.67	1.07	0.00	0.00	3.00
NITRATO3	12	0.83	0.39	0.00	1.00	1.00	NITRATO3	12	0.25	0.62	0.00	0.00	2.00
NITRATO2	12	0.50	0.90	0.00	0.00	3.00	NITRATO2	12	0.17	0.39	0.00	0.00	1.00
CONTROLE	9	1.33	0.71	0.00	1.00	2.00	CONTROLE	9	0.44	0.88	0.00	0.00	2.00
TESTE DE KRUSKAL-WALLIS: P=0.002							TESTE DE KRUSKAL-WALLIS: P=0.003						
COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS (TESTE DE DUNN) / DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS:							COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS (TESTE DE DUNN) / DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS:						
GRUPO 1 * GRUPO 6; GRUPO 4 * GRUPO 6; GRUPO 3 * GRUPO 6.							GRUPO 3 * GRUPO 7; GRUPO 3 * GRUPO 2; GRUPO 3 * GRUPO 5; GRUPO 3 * GRUPO 6.						

\* p-valores referentes ao teste de Mann-Whitney para comparação entre os grupos controle e tratado.

## Análise Comparativa dos Pesos entre Grupos e Tempos

- as tabelas 3 e 4, a seguir, apresentam as estatísticas descritivas do peso dos animais por grupo e tempo de coleta, e os resultados da análise de variância para medidas repetidas (*repeated measures ANOVA*) para comparação simultânea dos pesos entre os 7 grupos e entre os 7 tempos de coleta. Pelos resultados, verifica-se diferença significativa de peso entre os grupos 5 e 6 no tempo t4, e entre tempos (aumento significativo ao longo dos tempos em relação ao tempo t1). Também foi feita a análise comparativa apenas do peso inicial (T1) entre os grupos, não obtendo diferença significativa (ANOVA;  $p=0.217$ ).

**Tabela 3.** Análise descritiva dos pesos dos animais, por grupo e por tempo.

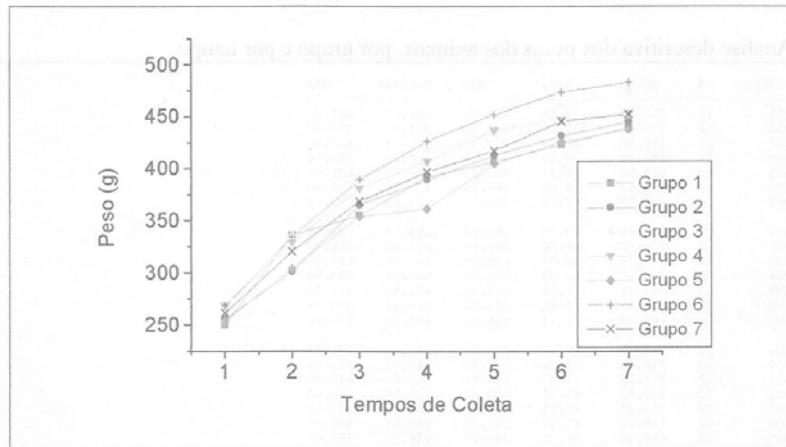
GRUPO	VARIÁVEL	N	MEDIA	D.F.	MÍN	MEDIANA	MAX
AC CLOR3	PESO1	12	250.08	26.56	217.00	240.00	301.00
	PESO2	12	336.17	34.23	288.00	343.00	407.00
	PESO3	12	355.08	37.69	308.00	341.50	427.00
	PESO4	12	392.00	39.94	342.00	378.00	467.00
	PESO5	12	406.58	44.27	328.00	400.00	501.00
	PESO6	12	423.42	36.58	367.00	420.00	495.00
	PESO7	12	439.08	42.96	374.00	433.50	501.00
AC CLOR2	PESO1	12	256.08	17.25	219.00	259.50	279.00
	PESO2	12	300.92	30.24	242.00	314.00	330.00
	PESO3	12	365.25	34.87	288.00	380.00	404.00
	PESO4	12	389.50	43.38	292.00	406.50	437.00
	PESO5	12	413.08	41.54	328.00	421.50	471.00
	PESO6	12	431.83	38.81	343.00	443.50	475.00
	PESO7	12	445.08	41.13	349.00	455.50	497.00
PEPSINA3	PESO1	12	268.67	21.93	235.00	273.00	297.00
	PESO2	12	336.08	39.36	273.00	342.00	401.00
	PESO3	12	391.17	37.76	330.00	403.00	445.00
	PESO4	12	417.92	46.59	342.00	432.00	491.00
	PESO5	12	433.67	39.19	366.00	451.50	477.00
	PESO6	12	460.08	47.67	391.00	480.50	512.00
	PESO7	12	474.83	59.62	368.00	495.50	545.00
PEPSINA2	PESO1	12	269.00	19.83	239.00	267.00	307.00
	PESO2	12	329.42	29.78	279.00	322.50	387.00
	PESO3	12	381.00	32.32	338.00	375.00	459.00
	PESO4	12	407.33	40.07	355.00	399.50	506.00
	PESO5	12	437.17	35.66	394.00	431.50	522.00
	PESO6	12	446.92	49.84	333.00	453.50	540.00
	PESO7	12	453.58	56.33	309.00	456.00	555.00
NITRATO3	PESO1	12	253.67	29.50	188.00	254.00	295.00
	PESO2	12	304.17	42.99	205.00	302.50	374.00
	PESO3	11	354.18	47.30	253.00	355.00	451.00
	PESO4	11	361.64	65.63	257.00	376.00	492.00
	PESO5	11	405.18	62.95	286.00	394.00	547.00
	PESO6	11	425.64	63.69	298.00	424.00	566.00
	PESO7	11	437.73	63.74	310.00	434.00	578.00
NITRATO2	PESO1	12	268.50	26.01	217.00	273.00	302.00
	PESO2	12	334.25	34.01	265.00	342.00	373.00
	PESO3	12	389.58	41.89	310.00	397.50	448.00
	PESO4	12	426.67	47.91	338.00	432.50	499.00
	PESO5	12	452.42	49.17	367.00	467.00	518.00
	PESO6	12	473.42	52.48	390.00	472.50	546.00
	PESO7	12	483.08	56.63	384.00	483.00	565.00
CONTROLE	PESO1	10	261.80	15.09	240.00	261.50	286.00
	PESO2	10	320.60	22.20	291.00	321.50	352.00
	PESO3	10	368.30	27.96	328.00	371.00	410.00
	PESO4	10	396.90	28.49	355.00	400.00	440.00
	PESO5	9	417.67	48.18	319.00	430.00	480.00
	PESO6	9	445.56	39.48	372.00	453.00	492.00
	PESO7	9	452.44	38.22	379.00	454.00	496.00

**Tabela 4.** Resultados da ANOVA para medidas repetidas para comparação entre grupos e tempos.

Variável*	Comparação entre 7 Grupos	Comparação entre 7 Avaliações	Interação Grupos vs Tempos
Peso	$F_{(6,73)}=2.41$ ; $P=0.035$ <sup>a</sup>	$F_{(6,438)}=483.58$ ; $P<0.001$ <sup>a</sup>	$F_{(36,438)}=0.90$ ; $P=0.581$

\* Valores correspondem à estatística F e p-valor da ANOVA para medidas repetidas.

(a) diferenças significativas entre grupos (Tukey): Grupo 5 ≠ Grupo 6 no tempo 4; diferenças significativas entre tempos (Perfil): T1≠T2, T1≠T3, T1≠T4, T1≠T5, T1≠T6, T1≠T7, para todos os grupos.



### Bibliografia:

- Conover, W. J. (1971). *Practical Nonparametric Statistics*. New York: John Wiley & Sons.
- Fleiss, J. L. (1981). *Statistical Methods for Rates and Proportions*. New York: John Wiley & Sons. 2<sup>nd</sup> ed.
- Milliken, G.A. & Johnson, D.E. (1984). *Analysis of Messy Data. Volume I: Designed Experiments*. New York: Van Nostrand Reinhold Company.
- Montgomery, Douglas C. (1991). *Design and Analysis of Experiments*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: John Wiley & Sons.
- Siegel, S. (1975). *Estatística Não-Paramétrica para as Ciências do Comportamento*. São Paulo: McGraw-Hill.

### Programa Computacional:

Para análise estatística foi utilizado o seguinte programa computacional:

- The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 8.02.  
SAS Institute Inc, 1999-2001, Cary, NC, USA.