



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas

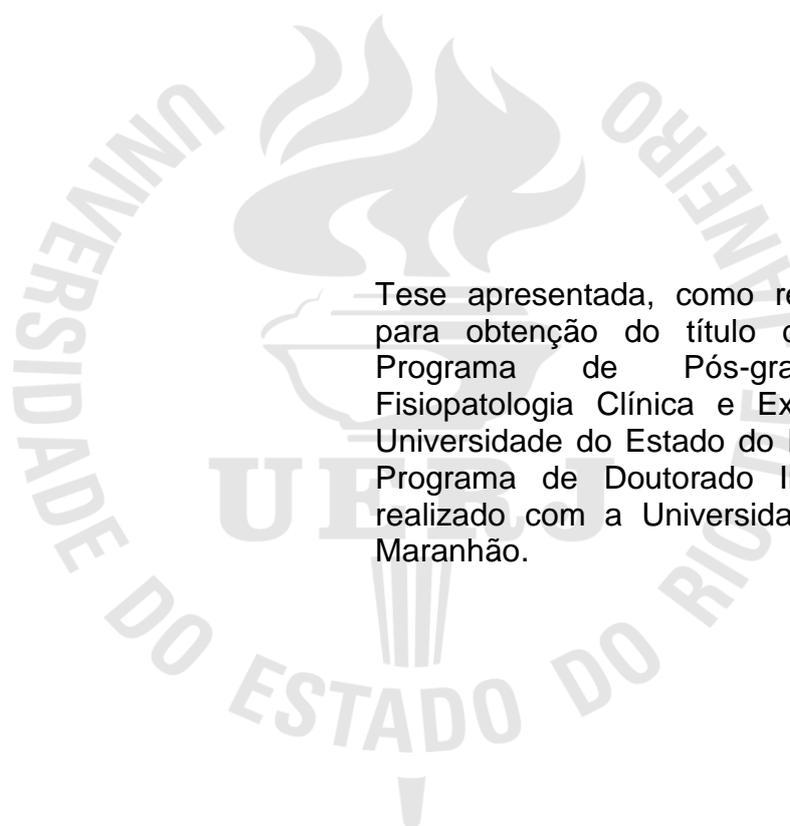
José Carlos Ribeiro de Araújo

**Influência do refluxo duodenogástrico nas alterações histológicas  
da mucosa gástrica em ratos infectados por *Helicobacter Pylori*:  
modelo experimental**

Rio de Janeiro  
2013

José Carlos Ribeiro de Araújo

**Influência do refluxo duodenogástrico nas alterações histológicas da mucosa gástrica em ratos infectados por *Helicobacter Pylori*: modelo experimental**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão.

Orientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria do Rosário da Silva Ramos Costa

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB/A

A663 Araújo, José Carlos Ribeiro de.  
Influência do refluxo duodenogástrico nas alterações histológicas da mucosa gástrica infectada com *Helicobacter Pylori* : modelo experimental / José Carlos Ribeiro de Araújo. – 2013.  
54 f.

Orientador: Jorge José de Carvalho.

Coorientadora: Maria do Rosário da Silva Ramos Costa.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão

1. *Helicobacter pylori* – Teses. 2. Neoplasias gástricas. 3. Adenocarcinoma – Teses. 4. Refluxo Duodenogástrico. 5. Gastrite. I. Carvalho, Jorge José de. II. Costa, Maria do Rosário da Silva Ramos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV Título.

CDU 616.33

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

---

Assinatura

Data

José Carlos Ribeiro de Araújo

**Influência do refluxo duodenogástrico nas alterações histológicas da mucosa gástrica em ratos infectados por *Helicobacter pylori*: modelo experimental**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão.

Aprovada em 26 de março de 2013

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria do Rosário da Silva Ramos Costa  
Universidade Federal do Maranhão

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho (Orientador)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Tatiana Marlowe Cunha Brunini  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Elias Amorim  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. Humberto Oliveira Serra  
Universidade Federal do Maranhão

Rio de Janeiro

2013

## DEDICATÓRIA

A Deus, cuja presença dá sentido e ilumina minha vida. Aos meus pais, Ivo e Maria, pela orientação permanente. À minha esposa Rosângela e aos meus filhos, Carla e Silvano, pela compreensão e estímulo

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Jorge José de Carvalho, pela paciência e orientação.

Ao Dr. Milton Vieira Costa, pelo apoio incondicional.

À Dra. Syomara Pereira da Costa Melo, patologista da pesquisa.

Ao Dr. Valério Monteiro Neto pelo estudo bacteriológico.

A todos os colegas da Universidade Federal do Maranhão, pela atenção sempre dispensada.

Seja a mudança que você quer ver no mundo.

*Dalai Lama*

## RESUMO

ARAÚJO, José Carlos Ribeiro de. **Influência do refluxo duodenogástrico nas alterações histológicas da mucosa gástrica em ratos infectados por *Helicobacter pylori*: modelo experimental**. 2013. 54f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro; Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2013.

O *Helicobacter pylori*, é tido como o principal fator de risco para o carcinoma gástrico. Diferentes estudos experimentais em animais procuram relacionar essa carcinogênese a outros fatores carcinógenos sem sucesso. Neste estudo, procurou-se avaliar-se em ratos, se há correlação entre o refluxo duodenogástrico, o *Helicobacter pylori* e o desenvolvimento do câncer gástrico ou de seus precursores. Para tal, realizou-se nos três grupos de ratos (*n* de dez por grupo) as técnicas de: piloroplastia precedida de infecção, gastrectomia subtotal precedida de infecção e um grupo no qual foi praticada apenas a infecção. Após seis meses, analisou-se as alterações da mucosa, comparando-se os três grupos. As alterações da mucosa pesquisadas foram as seguintes: gastrites, metaplasias, displasias e neoplasias epiteliais. Ao término do estudo, foi encontrado, no grupo submetido a piloroplastia precedida de infecção um alto percentual de alterações epiteliais. Conclui-se que, no rato, a operação de piloroplastia, levou ao maior desenvolvimento da população do *Helicobacter pylori*, que se relaciona com as lesões pré-malignas e o adenocarcinoma gástrico.

Palavras-chave: Câncer gástrico. *Helicobacter pylori*. Refluxo duodenogástrico. Gastrites.

## ABSTRACT

Helicobacter pylori is considered the main risk factor for gastric carcinoma. Different experimental studies in animals seek to relate this carcinogenesis to other carcinogenic factors without success. This study sought to evaluate in rats, if there was a correlation between duodenogastric reflux, Helicobacter pylori and the development of gastric cancer or its precursors. To this end, it was carried out in three groups of rats the techniques: pyloroplasty, subtotal gastrectomy and only infection. After six months, the changes in mucosa were analyzed comparing the three groups. The mucosal changes researched were: gastritis, metaplasia, dysplasia and epithelial neoplasms. At the end of the study, was found in the group that underwent pyloroplasty a high percentage of epithelial alterations and these correlated with the population of Helicobacter pylori. It is concluded that in the rat, the operation of pyloroplasty led to increased colonization of the population of Helicobacter pylori and is related with the development of benign lesions and gastric cancer.

Keywords: Gastric cancer. Helicobacter pylori. Duodenogastric reflux. Gastritis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fotomicrografia de corte histológico do antro mostrando a presença de infiltrado linfocitário (seta). Coloração H-E. Aumento de 40X.....	30
Figura 2 -	Fotomicrografia de corte histológico do antro mostrando a presença de metaplasia intestinal (seta). Coloração H-E. Aumento de 40X.....	35
Figura 3 -	Fotomicrografia corte histológico do antro mostrando a presença displasia (setas). Coloração H-E. Aumento de 40X.....	36
Figura 4 -	Corte histológico do antro mostrando a presença de desarranjo estrutural extra-epitelial.....	38
Figura 5 -	Imunohistoquímica da expressão do PCNA do antro nos grupos estudados (seta): Piroplastia (P), Gastrectomia (G) e (I) Controle.....	38
Figura 6 -	Imunohistoquímica da expressão do TGF- $\beta$ do antro nos grupos estudados Piroplastia (P), Gastrectomia (G) e (I) Controle.....	39
Figura 7 -	Corte histológico do antro mostrando a presença de bastonetes ( <i>Helicobacter pylori</i> ) na superfície foveolar.....	41

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	- Formas de gastrite crônica observadas no antro gástrico nos grupos Píloroplastia, Gastrectomia e Controle.....	29
Gráfico 2	- Formas de gastrite crônica observadas no corpo gástrico nos grupos Píloroplastia, Gastrectomia e Controle.....	31
Gráfico 3	- Formas de gastrite crônica observadas no fundo gástrico nos grupos Píloroplastia, Gastrectomia e Controle.....	31
Gráfico 4	- Atividade da gastrite crônica observada no antro gástrico nos grupos Píloroplastia, Gastrectomia e Controle.....	32
Gráfico 5	- Atividade da gastrite crônica observada no corpo gástrico de nos grupos Píloroplastia, Gastrectomia e Controle.....	33
Gráfico 6	- Atividade de gastrite cônica observada no fundo gástrico nos grupos Píloroplastia, Gastrectomia e Controle.....	34
Gráfico 7	- Presença de metaplasia no antro gástrico nos grupos Píloroplastia, Gastrectomia e Controle.....	34
Gráfico 8	- Presença de displasia no antro gástrico nos grupos Píloroplastia, Gastrectomia e Controle.....	35
Gráfico 9	- Presença de neoplasia no antro gástrico nos grupos Píloroplastia, Gastrectomia e Controle.....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Quantidade de <i>Helicobacter pylori</i> nos diferentes segmentos gástricos independente dos grupos. ....	39
Tabela 2 -	Quantidade de <i>Helicobacter pylori</i> nos diferentes segmentos gástricos de acordo com os grupos. ....	40
Tabela 3 -	Correlação entre a quantidade de <i>Helicobacter pylori</i> e as alterações da mucosa gástrica considerando todos os grupos. Correlação de Spearman.....	40
Tabela 4 -	Correlação entre a quantidade de <i>Helicobacter pylori</i> e as alterações da mucosa gástrica do grupo dos ratos submetidos à piloroplastia. ....	40

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1	<b>CONSIDERAÇÕES ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DO ESTÔMAGO</b>	19
1.1	<b>Histologia</b> .....	19
1.1.1	<u>Região do cárdia</u> .....	19
1.1.2	<u>Região gástrica</u> .....	19
1.1.3	<u>Região antro pilórica</u> .....	20
1.2	<b>Aspectos Imunohistoquímicos</b> .....	20
1.2.1	<u>Fator de crescimento transformador beta (TGFβ)</u> .....	20
1.2.2	<u>Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)</u> .....	21
1.3	<b>Infecção por Helicobacter pylori</b> .....	21
1.3.1	<u>Mecanismo de ação</u> .....	22
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
2.1	<b>Geral</b> .....	24
2.2	<b>Específicos</b> .....	24
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
3.1	<b>Animais e protocolo experimental</b> .....	25
3.2	<b>Microorganismo</b> .....	25
3.3	<b>Cirurgia</b> .....	26
3.3.1	<u>Gastrectomia parcial</u> .....	26
3.3.2	<u>Piloroplastia</u> .....	26
3.4	<b>Eutanásia e preparação técnica do material</b> .....	26
4	<b>RESULTADOS</b> .....	29
4.1	<b>Gastrite crônica</b> .....	29
4.1.1	<u>Estudo do antro</u> .....	29
4.1.2	<u>Estudo do corpo</u> .....	30
4.1.3	<u>Estudo do fundo</u> .....	31
4.2	<b>Atividade da gastrite crônica</b> .....	32
4.2.1	<u>Estudo do antro</u> .....	32
4.2.2	<u>Estudo do corpo</u> .....	32
4.2.3	<u>Estudo do fundo</u> .....	33
4.3	<b>Metaplasia</b> .....	34

4.3.1	<u>Estudo do antro</u> .....	34
4.4	<b>Displasia</b> .....	35
4.4.1	<u>Estudo do antro</u> .....	35
4.5	<b>Neoplasia</b> .....	36
4.5.1	<u>Estudo do antro</u> .....	36
4.6	<b>Imunohistoquímica</b> .....	38
4.7	<b>Helicobacter pylori</b> .....	39
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	42
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	47
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48
	<b>ANEXO - Comissão de Ética para o cuidado e uso de animais Experimentais</b> .....	54

## INTRODUÇÃO

O câncer gástrico um problema de saúde mundial, continua a ser a neoplasia maligna mais frequente do aparelho digestivo no ser humano, além de ser a segunda causa mais comum de óbito por câncer no mundo, principalmente entre os idosos (PARKIN et al., 2005; HU et al., 2012). Possui prognóstico reservado, pois seu diagnóstico geralmente é feito na fase avançada de progressão da doença (LIU et al., 2012), apesar dos avanços tecnológicos permitirem o diagnóstico mais precoce e conhecimento das técnicas cirúrgicas mais avançadas, promoverem ressecções curativas ou potencialmente curativas (KATSUBE et al., 2009; NAKA et al., 2012).

O adenocarcinoma representa 90%-95% dos tumores malignos desse órgão, sendo classificado com base em aspectos histopatológicos nos tipos intestinal e difuso. Apesar de, teoricamente, qualquer tipo de célula poder transformar-se em um carcinoma, outras células gástricas, que não as glandulares, raramente transformam-se em neoplasias malignas (CREW; NEUGUT, 2006). Entre eles está o tecido linfóide associado a mucosa (MALT) (GISBERT; CALVET, 2011), tumores carcinoides (SANCHEZ-FAYOS et al., 2008) e os fibroblastos (SUNG et al., 2011).

A incidência de câncer gástrico varia em diferentes partes do mundo, com as maiores taxas documentadas no Leste da Ásia, Europa Oriental e América do Sul, enquanto a América do Norte e na África mostram as taxas mais baixas registradas. O câncer de estômago é o quinto câncer mais comum na Europa, com 159,900 novos casos e 118,200 óbitos reportados em 2006 (NAGINI, 2012). No ano de 2012, estimou-se, para o Brasil, 12.670 casos novos de câncer do estômago em homens e 7.420 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 13 casos novos a cada 100 mil homens e 7 a cada 100 mil mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2012).

Variações significativas na incidência de câncer gástrico têm sido observadas entre diferentes grupos étnicos vivendo na mesma região; Africano-americanos, hispânicos e os nativos americanos são mais afetados do que os brancos nos Estados Unidos. No entanto, a distribuição geográfica do câncer gástrico não pode ser atribuída somente a diferenças raciais. Habitantes que migram de áreas de alta incidência, como Japão para baixa incidência, como os Estados

Unidos, apresentaram uma redução significativa de câncer gástrico (HOWE et al., 2006; NAGINI, 2012).

Assim, dependendo da região geográfica e/ou do hábito dietético de seu povo, a quantidade de substâncias encontradas nos alimentos com conservantes, ricos em nitritos e nitratos, formam n-nitrosaminas, capazes de induzir a carcinogênese (MAGEE; BARNES, 1956). Além disso, o aumento na produção de oxigênio e de seus derivados, as espécies reativas de oxigênio, podem atuar sobre o DNA, aumentando a probabilidade de mutação durante sua síntese (TU et al., 2011).

Essa formação endógena de compostos N-nitrosos pode ocorrer, quando uma amina e um agente nitrosante como o nitrito, nitrato ou óxidos de nitrogênio, estejam presentes e é bloqueada pelos agentes antioxidante (BARTSCH et al., 1989). Hipótese essa também sustentada pelo aumento do pH, onde a hipoacidez gástrica, tem sido fortemente associadas com o aumento do risco de malignidade gástrica (FOSSMARK et al., 2008).

A gastrectomia prévia para tratar patologia benigna péptica, elimina o antro, reduzindo a fase gástrica da digestão, e retira parte do corpo gástrico, diminuindo a quantidade de glândulas produtoras da secreção cloridropeptica, aumentando a colonização e proliferação bacteriana e com isso a incidência de câncer. A gastrite crônica e a metaplasia intestinal são identificados em quase 100% dos casos em que houve gastrojejunostomose, sendo menos comum após as ressecções gástricas seguidas de gastroduodenoanastomose. Em 1922 Balfour descreveu, pela primeira vez, um adenocarcinoma de coto gástrico (ADVANCED, 1975; ABRÃO; FEIJÓ, 1972).

Muitos são os fatores relacionados com a incidência do câncer gástrico, entre eles o refluxo duodenogástrico e o *Helicobacter pylori*.

O refluxo do conteúdo duodenal secundário, principalmente, à cirurgia que têm o objetivo de alargar o canal pilórico e assegurar o esvaziamento gástrico satisfatório como gastroduodenostomia, gastrojejunostomia e piloroplastia, pode também pelo refluxo, elevar o pH gástrico, o que favorece a colonização e proliferação bacteriana (MASON, 1986; CHAN et al., 2007; KAMINSKI; KRUEL, 2011).

A ação bacteriana, não só de *Helicobacter pylori*, mais de outras bactérias como *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp* etc, têm sido consideradas como importante fator no desenvolvimento da carcinogênese gástrica, já que essas

bactérias promovem uma eficiente redução da transformação de nitratos e nitritos, catalisando o processo de nitrosação com conseqüente formação endógena de compostos N-nitrosos. Outro importante aspecto a ser considerado é a redução significativa do índice ácido ascórbico / nitritos no suco gástrico, esta relação que regularia a síntese de compostos N-nitrosos potencialmente carcinogênicos (ARAUJO et al., 2011).

O refluxo do conteúdo do duodeno, principalmente às custas dos sais biliares, do suco pancreático e da secreção duodenal, age sobre a mucosa gástrica, alterando as características físicoquímica das camadas protetoras de muco, expondo o epitélio da mucosa, tornando suas membranas permeáveis aos íons H<sup>+</sup> do suco gástrico (RITCHIE, 1980; KAWIORSKI et al., 2001).

Ao atravessar a barreira mucosa, esses íons atingem os mastócitos, provocando a liberação de histamina, implicada nos processos inflamatórios locais (KLAUSZ et al., 2004).

Esse contato de material refluído para a mucosa gástrica, principalmente da parte distal do estômago, onde os sais biliares, por meio de suas propriedades detergentes, levariam a atrofia da mucosa gástrica e, desta forma, facilitariam a penetração de carcinógenos através da barreira mucosa e sua atuação junto ao compartimento proliferativo da mucosa favorecendo o aparecimento de patologias benignas com potencial de malignação, como a gastrite crônica, úlcera péptica gástrica e metaplasia intestinal, já que as células parietais produzem sinais reguladores que controlariam o programa de diferenciação celular de linhagens de células principais, sugerindo que a redução na população de células parietais, na gastrite atrófica, poderia comprometer a diferenciação das células principais (LANGHANS et al., 1981; KAMATA, 1993; NAKAJIMA et al., 2008; TANIGAWA et al., 2010).

Outro fator considerado é o *Helicobacter pylori* que é o principal fator de risco para carcinoma gástrico (EPPEIN et al., 2012). Ele vive quase que exclusivamente no estômago, podendo ser encontrado também em mucosa gástrica ectópica como no divertículo de Meckel, no esôfago de Barrett e em outras áreas de metaplasia. É o único microrganismo conhecido capaz de colonizar esse ambiente em função de sua capacidade de formar uma camada de amônia, que os protege do ambiente ácido (NAKAJIMA et al., 2008). Outras enzimas, que a bactéria sintetiza tais como superóxido dismutase, catalase e arginase, conferem proteção a bactéria

contra a atividade lítica dos macrófagos e leucócitos, impedindo uma resposta eficaz do hospedeiro (LADEIRA et al., 2003). Sua capacidade de mover-se facilmente, devido à sua morfologia em espiral e os flagelos, possibilita atravessar a camada de muco, estabelecendo contato com as células epiteliais de revestimento (WORKU et al., 1999).

Os mecanismos moleculares do *Helicobacter pylori* associados a carcinogênese gástrica permanecem mal definidos, podem estar relacionados à capacidade de produzir urease, enzima que forma amônia no estômago, gerando compostos nitrogenados. Porém as taxas de incidência de malignidade flutuam de 0 a 71,4% (PEEK et al., 1997).

Acredita-se que a infecção crônica causada pela bactéria induziria o desenvolvimento de diversos tipos de câncer estomacal, sem entretanto conhecer os mecanismos ou os fatores bacterianos que contribuíam para o desenvolvimento da doença. Atualmente acha-se que um fator produzido pela bactéria ativa diretamente a enzima polimerase, que está no núcleo das células (MOTOTSUGU, 2010).

A infecção da mucosa gástrica por *Helicobacter pylori* pode afetar o equilíbrio normal entre a proliferação epitelial gástrica e morte por apoptose, assim desregulando o ciclo celular normal, podendo inicialmente levar à gastrite. Esta pode avançar para gastrite atrófica e em seguida metaplasia, displasia e neoplasia. O resultado deste processo está relacionado com uma alteração severa da taxa de apoptose em estágios, com uma resposta desproporcional proliferativa no hospedeiro em estágios mais avançados (metaplasia e displasia), que pode vir a terminar em uma condição de malignidade (OLIVARES et al., 2005).

Krienitz (1906) foi o primeiro a observar essas espiroquetas no estômago humano. Em 1979, foi redescoberta pelo médico patologista australiano Robin Warren e isolada pela primeira vez, em 1983, por Warren e Marshall, na Austrália (Prêmio Nobel de Medicina em 2005), a partir de fragmentos de biopsia gástrica de pacientes com gastrite crônica e úlcera péptica (MARSHALL; WARREN, 1984).

A infecção por *Helicobacter pylori* está claramente associada com a indução de inflamação crônica da mucosa, o que aumenta as chances do desenvolvimento progressivo de várias patologias gastrointestinais benignas e malignas, dentre elas, gastrite crônica, úlcera péptica, carcinoma e etc.. Acredita-se que ele funcione como um coadjuvante no processo da carcinogênese com o hábito

de fumar, consumo alcoólico, hábitos alimentares e a idade avançada (SUGANUMA et al., 2012).

O *Helicobacter pylori* tem como principal característica sua fraca atividade endotóxica que permite a esta bactéria estabelecer uma infecção crônica, em vez de causar uma resposta inflamatória aguda sistêmica, como no choque séptico. Contribui diretamente na destruição dos fatores defensivos do epitélio da mucosa gástrica, como a produção de muco, pelo aumento da produção de oxigênio derivado de radicais livres presente na inflamação crônica, lesionando assim a mucosa (YOKOTA et al., 2010).

Em 1994 a Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC) classificou o *Helicobacter pylori* como um agente cancerígeno em definitivo, mostrando sua associação com a metaplasia intestinal, adenocarcinoma gástrico não-cardia e linfoma MALT (WOTHERSPOON et al., 1993; GISBERT; CALVET, 2011). Embora a prevalência de infecção por *Helicobacter. pylori*, alcance mais de 50% da população mundial, indivíduos que desenvolvem patologias gástricas, apresentam baixo percentual de incidência de câncer gástrico, não chegando a 3 por cento em todo mundo, mostrando que os fatores etiológicos continuam controversos e com isso a necessidade de mais dados sobre o tema (MATSUO et al., 2011). Uma variedade de fatores patogênicos podem agir em diferentes fases, tais como fatores inflamatórios gerando radicais livres e dano celular direto do DNA ou gerando proliferação epitelial com risco de desenvolvimento de erros mitóticos e mutações celulares. A incidência do câncer gástrico continua a ser um fator de múltiplos processos em várias etapas. (TU et al., 2011).

O reconhecimento do *Helicobacter pylori* como principal indutor no múltiplo processo nas fases dessa neoplasia, oferece uma oportunidade única para explorar novas estratégias de prevenção e controle, quer seja por meio de observações epidemiológicas, das observações clínicas, terapêuticas, biológicas quer seja por modelos experimentais. Embora o carcinoma primário de estômago em animais seja um dos cânceres mais raros, não existindo uma cepa isolada capaz de desenvolvê-lo, a importância do tema aumenta de importância devido ao contínuo crescimento e envelhecimento populacional, que afetará de forma significativa a incidência de câncer no mundo nos próximos anos (NAGINI, 2012).

## 1 CONSIDERAÇÕES ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DO ESTÔMAGO

Localiza-se entre a extremidade inferior do esôfago e o começo do intestino delgado (o duodeno).

Anatomicamente o estômago divide-se em quatro porções: (1) cárdia, que marca a transição entre o esôfago e o estômago; (2) fundo; (3) corpo, que é a maior parte do estômago; (4) antro, situado entre a incisura angular e o piloro. A cárdia é um a prega da mucosa que funciona como um esfíncter na porção superior do estômago. Já o piloro é um esfíncter verdadeiro que controla a passagem do quimo para o duodeno (WILLARD, 1997).

Internamente, o estômago apresenta uma superfície enrugada e tubular. Sua parede é formada por quatro camadas, respectivamente serosa, muscular, submucosa e mucosa (STINSON; CALHOUN, 1982).

### 1.1 Histologia

O estômago estende-se do esôfago até o duodeno. Na junção gastroesofágica o epitélio muda de estratificado pavimentoso não-queratinizado para cilíndrico simples. A camada muscular da mucosa do esôfago é continua com o estômago. Entretanto a submucosa não possui uma nítida linha de demarcação e glândulas da porção cárdica do estômago podem se alojar sob o epitélio estratificado pavimentoso e entrar em contato com as glândulas cárdicas esofágicas. É um órgão exócrino e endócrino que digere os alimentos e secreta hormônios, cuja função é homogenizar e processar quimicamente o alimento semi-sólido deglutido (ROSS; ROMRELL, 1993; WILLARD, 1997).

#### 1.1.1 Região do cárdia

Zona de transição entre o esôfago e o estômago. Suas glândulas são tubulosas, com uma extremidade enovelada e uma abertura continua com as fossetas gástricas. Um epitélio secretor de muco reveste as glândulas cárdicas.

#### 1.1.2 Região gástrica

Abrange as regiões do fundo e corpo gástrico. As glândulas gástricas (ou glândulas fundicas) são as principais contribuintes para a formação do suco gástrico. Cerca de 15 milhões de glândulas fúndicas se abrem em 3,5 milhões de fossetas

gástricas. De duas a sete glândulas fúndicas se abrem em uma única fosseta ou foveola.

A porção superior do corpo da glândula fúndica contém células parietais em abundância. As células principais e as células gastroenteroendocrinas predominam na porção inferior.

A mucosa gástrica do corpo e do fundo possui duas classes de células produtoras de muco: (1) as células mucosas superficiais, que revestem as fossetas, e (2) as células mucosa do colo, localizadas na abertura da glândula fundica na fossa. Ambas as células produzem mucinas, glicoproteínas com alto peso molecular. A camada de muco, contém 95% de água e 5% de mucinas, forma um gel insolúvel que se prende a superfície da mucosa gástrica, formando uma barreira produtora na mucosa gástrica de 100 $\mu$  de espessura. Esta camada protetora de muco retem os íons bicarbonato e neutraliza o microambiente adjacente a região apical das células mucosas superficiais a um pH alcalino.

As células principais predominam no terço inferior da glândula fúndica. As células principais não estão presentes nas glândulas cárdicas e raramente são encontradas no antro pilórico.

As células parietais predominam no colo e no segmento superior das glândulas fúndicas e estão unidas as células por complexos juncionais. As células parietais produzem o ácido clorídrico do suco gástrico e o fator intrínseco.

### 1.1.3 Região antro pilórica

Zona do estômago que o delimita com o duodeno, as glândulas pilóricas localizam-se na porção antral do estômago, ocupando os 20% distais desse. São glândulas tubulosas simples ramificadas, altamente enoveladas.

A diferenciação histológica dessas quatro regiões do estômago é feita exclusivamente pelas características microscópicas de suas túnicas mucosas, uma vez que as demais túnicas apresentam idêntica constituição (BANKS, 1992; ABRAHAM; KIERSZENBAUM, 2008).

## **1.2 Aspectos Imunohistoquímicos**

### 1.2.1 O fator de crescimento transformador beta (TGFB)

Wahl et al. (1993) mostraram que o TGFB é um potente quimiotático para leucócitos, incluindo neutrófilos, monócitos e mastócitos e está envolvido na

formação do infiltrado inflamatório, especialmente na lesão inflamatória crônica. (CHOI, 2000) relatou que o TGF $\beta$  1 é uma citocina produzida por diferentes tipos celulares que atua sobre várias células, incluindo linfócitos, macrófagos e hepatócitos, bem como queratinócitos e fibroblastos (BAUER; SCHUPPAN, 2001). também mostraram que entre os seus efeitos pleiotróficos o TGF $\beta$  estimula o crescimento celular, morte celular, diferenciação celular e síntese da matriz extracelular. O TGF $\beta$  pode exercer um papel pró ou antiinflamatório, dependendo do estágio da doença ou da cicatrização. Esta modulação pró ou antiinflamatória está pouco elucidada (SKALERIC et al., 1997). Suas principais fontes são as plaquetas, monócitos/macrófagos, células endoteliais e fibroblastos (BENNETT; SCHULTZ, 1993). Steinsvoll et al. (1999) e Wahl et al. (1993) destacaram que os tecidos inflamados contêm 100 vezes mais células produtoras de TGF $\beta$  1 do que no saudável. Segundo Igarashi et al. (1993), TGF $\beta$  é produzido por macrófagos ativados e neutrófilos que estão presentes durante a fase inicial da cicatrização da ferida.

### 1.2.2 Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)

Um importante marcador de proliferação celular é o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), que está envolvido em vários processos que envolvem o DNA, como o reparo e sua replicação (Maga G & Hübscher U, 2003). O PCNA é sintetizado nas fases S e G1 do ciclo celular (Gronowicz GA e cols, 2008) e sua expressão pode ser detectada por meio da técnica de imunohistoquímica (Wu YF e cols, 2010). Estudos experimentais com essa técnica auxiliaram no entendimento dos mecanismos de regeneração (Chuen FS e cols, 2004; Kawamura S e cols, 2005).

### 1.3 **Infecção por Helicobacter pylori**

Helicobacter pylori é uma bactéria gram-negativa, que infecta a mucosa do estômago, que tem distribuição cosmopolita e sua prevalência é uma questão de saúde pública na população mundial, especialmente em países subdesenvolvidos, sem saneamento básico e em pessoas de baixa classe socioeconômica, onde se estima que a incidência de colonização é de 70% a 90% da população, dos quais a maior parte dos indivíduos adquire a infecção ainda na infância e pode persistir por toda a vida. A gastrite é uma consequência presente em quase todos os indivíduos

infectados pela *Helicobacter pylori* apesar de muitos hospedeiros permanecerem assintomáticos, outros apresentarem úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico e linfomas principalmente o linfoma MALT (Linfoma do tecido linfoide associado à mucosa) (SIQUERA et al., 2007; COELHO; CASTRO, 2002; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

### 1.3.1 Mecanismo de ação

Entre as patologias causada pelo *Helicobacter pylori* está a úlcera péptica, que é uma solução de continuidade que compromete a camada muscular da mucosa do trato digestivo exposta à secreção cloridopéptica. Ocorre principalmente no antro ou duodeno. Usualmente ocorre lesão única, que mede menos de 2 cm de diâmetro. A maioria das úlceras pépticas gástricas (80-85%) e praticamente todas as úlceras duodenais (98%) estão relacionadas as *Helicobacter pylori*. Essa bactéria altera a barreira muco-bicarbonato que protege a mucosa gástrica, favorecendo o contato direto do ácido com as células epiteliais de revestimento do órgão. Na ausência da bactéria, os anti-inflamatórios não esteroidais estão associados à úlcera péptica.

Sem ácido não há úlcera. A úlcera péptica decorre da autodigestão, do desequilíbrio entre fatores agressivos e defensivos, ou excesso de ácido ou pepsina para o grau de resistência local da mucosa.

É conveniente considerar o suco gástrico como uma combinação de duas secreções: (1) um componente representado por um gel mucoso alcalino protetor, produzido pelas células mucosas superficiais e pelas células mucosas do colo, e (2) o ácido clorídrico e a pepsina, dois componentes potencialmente agressivos produzidos pelas células parietais, e principais, respectivamente. O componente protetor e constitutivo, está sempre presente. O componente agressivo é facultativo, já que os níveis de ácido clorídrico e de pepsina aumentam, em relação aos níveis basais, após a ingestão de alimento.

Entretanto a camada de muco que reveste o epitélio gástrico, em particular no antro pilórico, é o local onde a bactéria flagelada *Helicobacter pylori* reside, apesar do ambiente hostil. A *Helicobacter pylori* sobrevive e se replica no lúmen gástrico, e sua presença tem sido associada á úlceras pépticas ácidas e o adenocarcinoma do estômago.

Três fases definem a patogênese do *Helicobacter pylori*:

a) uma fase ativa, na qual bactérias moveis aumentam o pH gástrico pela produção de amônia através da ação da uréase;

b) uma fase estacionaria, consistindo na adesão das bactérias a receptores contendo fucose na superfície das células mucosas superficiais da região pilórica. A adesão do *Helicobacter pylori* resulta na produção de proteases citotóxicas que garantem às bactérias um suprimento de nutrientes a partir de células mucosas superficiais, e também atraem leucócitos. Tanto a produção de amônia como a produção de proteases citotóxicas estão correlacionadas com o desenvolvimento de úlceras pépticas da mucosa da região pilórica;

c) durante a fase de colonização, as bactérias *Helicobacter pylori* se desprendem dos receptores contendo fucose, aumentando em numero através de replicação dentro da camada de muco, e permanecem aderidas a glicoproteínas contendo ácido sialico. Apesar da rápida renovação das células gástricas secretoras de muco, o *Helicobacter pylori* impede que haja a sua eliminação juntamente com as células epiteliais mortas devido a produção de uréase e a alta motilidade.

Por volta dos 20 anos de idade, cerca de 20% da população está infectada pelo *Helicobacter pylori*. A incidência de infecção aumenta para cerca de 60% por volta dos 60 anos de idade (ABRAHML; KIERSZENBAUM, 2008).

Visa essa pesquisa avaliar o papel do refluxo duodenogástrico na mucosa gástrica infectada com *Helicobacter pylori* na carcinogênese gástrica, em ratos submetidos a piloroplastia. E comparar com ratos submetidos à cirurgia de gastrectomia parcial (retirada de 2/3 de antro e metade do corpo gástrico), modelo citorredutor com preservação do piloro e vagos (mecanismo antirefluxo) e ratos apenas infectados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Estudar alterações histológicas e imunohistoquímicas da mucosa gástrica de ratos infectados com *Helicobacter pylori*.

### 2.2 Específicos

- a) descrever alterações histológicas da mucosa gástrica de ratos infectados com *Helicobacter pylori* sem cirurgia gástrica;
- b) descrever alterações histológicas da mucosa gástrica de ratos submetidos à gastrectomia subtotal.
- c) descrever alterações histológicas da mucosa gástrica de ratos submetidos à piloroplastia;
- c) correlacionar as alterações encontradas na mucosa com a concentração tecidual de *Helicobacter pylori*;
- d) correlacionar as alterações histológicas com a expressão imunohistoquímica de PCNA e TGF $\beta$ .

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais e protocolo experimental**

Foram utilizados trinta ratos machos albinos da raça Wistar, com idade de doze semanas e peso médio de 250g. Eles se mantiveram sob condições normais de, temperatura e luminosidade e tiveram livre acesso a água e alimento. Após duas semanas de aclimatação foram infectados com o microorganismo patogênico *Helicobacter pylori*.

Antes de serem infectados pela bactéria, foram mantidos em jejum por vinte e quatro horas. Após esse período, receberam primeiramente 1mL de NaHCO<sub>3</sub> por gavagem com sonda metálica orogástrica, de acordo com o método descrito por (KONTUREK et al., 1999). Logo em seguida, foi inoculado ainda por gavagem orogástrica 1mL ( $9 \times 10^8$ ) de *Helicobacter pylori* (ATCC-43504, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, em suspensão de Mueller-Hinton. Cada animal recebeu três doses iguais, com um intervalo de dois dias entre cada aplicação. Os roedores tiveram livre acesso à água e alimento logo após a primeira aplicação.

Após trinta dias da última aplicação do parasita, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=10): Grupo Infecção (I), controle; Grupo Gastrectomia (G), submetidos a gastrectomia parcial e Grupo Píloroplastia (P), submetidos a píloroplastia. Todos os animais sobreviveram e a eutanásia foi realizada após de 24 semanas.

#### **3.2 Microorganismo**

O estoque de *Helicobacter pylori* foi mantido em cultura de caldo Hinton Muller (Himedia, Mumbai, India) a uma temperatura de -20 C, em glicerol a 20%. A bactéria inoculada foi preparada em placas (90x15mm) de Agar (Becton, Dickinson and Company), suplementados com sangue de carneiro a 5% ou em BHI e mantidos em jarra com “sache” gerador de microaerofilia e gás O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (Probac do Brasil) por 3 a 5 dias a 37°C. A identificação morfológica e atividade das bactérias foram baseadas na exigência de microaerofilia para crescimento da bactéria e pela coloração de Gram.

### 3.3 Cirurgia

Os animais dos grupos G e P foram submetidos à gastrectomia e à piloroplastia, respectivamente. Nas vinte e quatro horas que antecederam o procedimento cirúrgico, eles tiveram acesso somente à água. A técnica anestésica utilizada foi a inalação de éter sulfúrico em cuba fechada para sedação inicial e ketamina intramuscular na face posterior da coxa, na dose de 50 mg/Kg. Todos os animais foram operados em condições assépticas.

Todos os vinte animais foram submetidos à laparotomia mediana a partir do apêndice xifóide até o terço médio abdominal. Duas pinças tipo *Halsted* foram colocadas, uma de cada lado da parede de modo a atuarem, pelo próprio peso, como afastadores. O fígado foi rebatido e o estômago foi exteriorizado através da incisão por tração de ponto, o que permitiu o desenvolvimento da técnica extracavitária. No pós-operatório foi oferecida alimentação *ad libitum*.

#### 3.3.1 Gastrectomia parcial

Foi realizada a ressecção de 2/3 do antro e metade do corpo gástrico com preservação do piloro e dos nervos vagos. A reconstituição gástrica foi realizada por chuleio simples com fio sertix de prolene 5.0 de agulha cilíndrica de 1,5 cm. A parede abdominal foi fechada com fio prolene 3.0 em chuleio contínuo alcançando todos os planos. Todos os animais do grupo G foram operados no mesmo dia.

#### 3.3.2 Piloroplastia

Foi realizada uma incisão longitudinal de 01 cm no estômago e de 01 centímetro no duodeno, interessando todos os planos. O fechamento foi realizado no sentido transversal com chuleio simples com fio sertix de prolene 5.0 de agulha cilíndrica de 1,5 cm à Heinecke-Mikulicz. A parede abdominal foi fechada com fio de prolene 3.0 em chuleio contínuo alcançando todos os planos. Todos os animais do grupo P foram operados no mesmo dia.

### 3.4 Eutanásia e preparação técnica do material

Vinte e quatro horas antes da eutanásia, os animais foram privados de alimentos, e em seguida anestesiados profundamente (pentobarbital sódico intraperitoneal, 150 mg/Kg). O estômago foi retirado inteiro e seccionado

longitudinalmente em duas metades (anterior e posterior), que foram rapidamente colocadas numa solução de 1,27 mol/L de formaldeído (0,1 M de tampão fosfato, pH 7,2) por 48 horas. O material foi incluído com a face de corte para baixo (ambas as metades, cada uma contendo antro, corpo e fundo gástrico).

Os fragmentos foram tratados em aparelho Histotécnico (processador de tecidos) de marca Micom GMBH, emblocados em parafina por meio de aparelho auto-inclisor da marca Microm AP280, cortados em 5 micrômetros de espessura em micrótomo ZEISS-HYRAXMIS. Foram realizados 2 cortes histológicos das partes que foram coradas com hematoxilina-eosina e de Giemsa modificada. As lâminas histológicas foram observadas ao microscópio óptico da marca NIKON ECLAPSE 200.

Os cortes foram analisados por imunohistoquímica com marcação para TGF- $\beta$  e PCNA. A recuperação antigênica foi realizada utilizando tampão citrato, pH 6,0 a 60°C e em seguida bloqueado com cloreto de amônio, glicina 2% e tampão fosfato, pH 7,4 (PBS). Os cortes foram incubados com um anticorpo primário específico anti- ratos, ambos na concentração de 1:100 (TGF- $\beta$ , sc-146 e PCNA, sc-25280, ambos adquiridos da Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) durante toda a noite a 4°C. Em seguida, as amostras foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com um anticorpo secundário biotilado (K0679, Universal DakoCytomation LSAB + Kit Peroxidase; DakoCytomation Glostrup, Denmark), foi usado um anticorpo secundário de cavalo anti-rato detectável por reação do complexo streptavidina-biotina-enzima. A imunomarcação positiva foi identificada após a incubação com 3,3'-tetracloro de diaminobenzidina (K3466, DAB; DakoCytomation) e contrastado com Hematoxilina de Mayer.

Na análise histopatológica, foram estudadas 100 glândulas de cada segmento gástrico (antro, corpo e fundo), para pesquisa de *Helicobacter pylori* e inflamação, metaplasia, displasia e neoplasia, em microscopia óptica nas objetivas de 4x, 10x, e 40x. Os resultados foram classificados como: normal, gastrite, metaplasia, displasia e neoplasia.

O estudo da mucosa gástrica foi considerado:

a) normal - quando se observou na lamina própria sobre o epitélio até 10 linfócitos e plasmócitos por campo microscópico examinado com objetiva de 40X, sem a presença de neutrófilos;

b) gastrite crônica - caracterizada pela presença de células predominantemente mononucleares (linfócitos e plasmócitos), a atividade de cronicidade foi mensurada mediante a presença de densidade do infiltrado de linfócitos, células plasmáticas ou polimorfonucleares na lamina própria. A gastrite e sua atividade obedeceram à classificação de Sydney modificada (DIXON et al., 1996);

c) metaplasia - através da presença de células intestinais na mucosa do estômago;

d) displasia - mediante a distorção da citoarquitetura intra-epitelial (aumento da população celular, perda de polaridade, diminuição de muco, proliferação de células e glândulas, alteração da forma das glândulas);

e) neoplasia com as mesmas características da displasia além da invasão extra-epitelial.

Quanto às camadas gástricas, considerou-se o acometimento restrito a mucosa do antro, corpo e fundo gástrico.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Gastrite crônica

#### 4.1.1 Estudo do antro

No estudo dos cortes realizados no antro (Gráfico 1) observou-se uma maior incidência de gastrite crônica no grupo de ratos submetidos à piloroplastia: discreta 2 (20,0%); leve 2 (20,0%); e moderada 6 (60,0%). No grupo controle, notamos que ocorreu um predomínio da forma discreta (70,0%). Nos ratos submetidos à gastrectomia, também houve predomínio das formas menos graves: discreta 3 (30,0%) e leve 7 (70,0%). O teste exato de Fisher mostrou haver diferenças estatisticamente significantes nessas proporções ( $p = 0,004$ ).

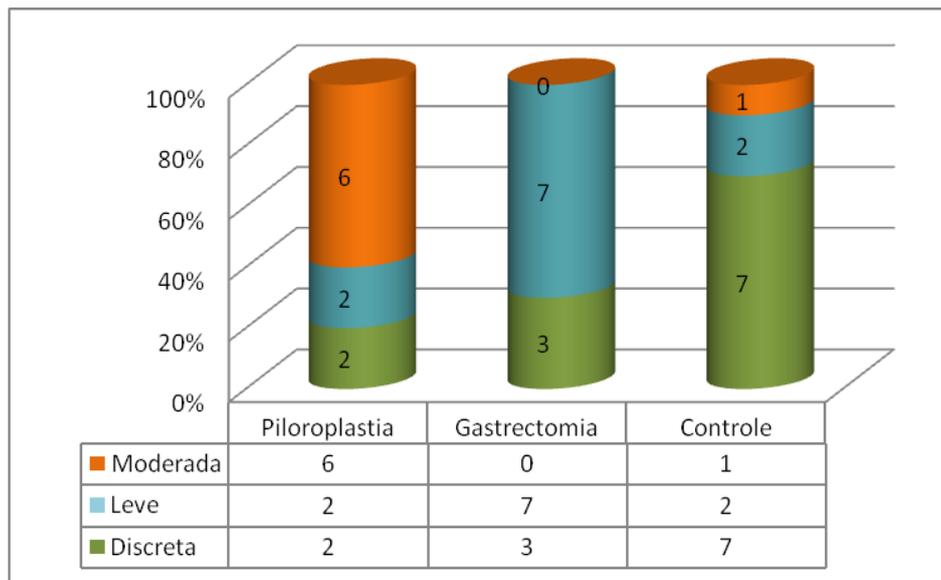


Gráfico 1 - Formas de gastrite crônica observadas no antro gástrico nos grupos Piloroplastia, Gastrectomia e Controle.

A Figura 1 mostra presença de infiltrado exagerado de linfócitos comprimindo as glândulas gástricas no corte histológico do antro do grupo submetido à piloroplastia, o que caracteriza gastrite crônica.

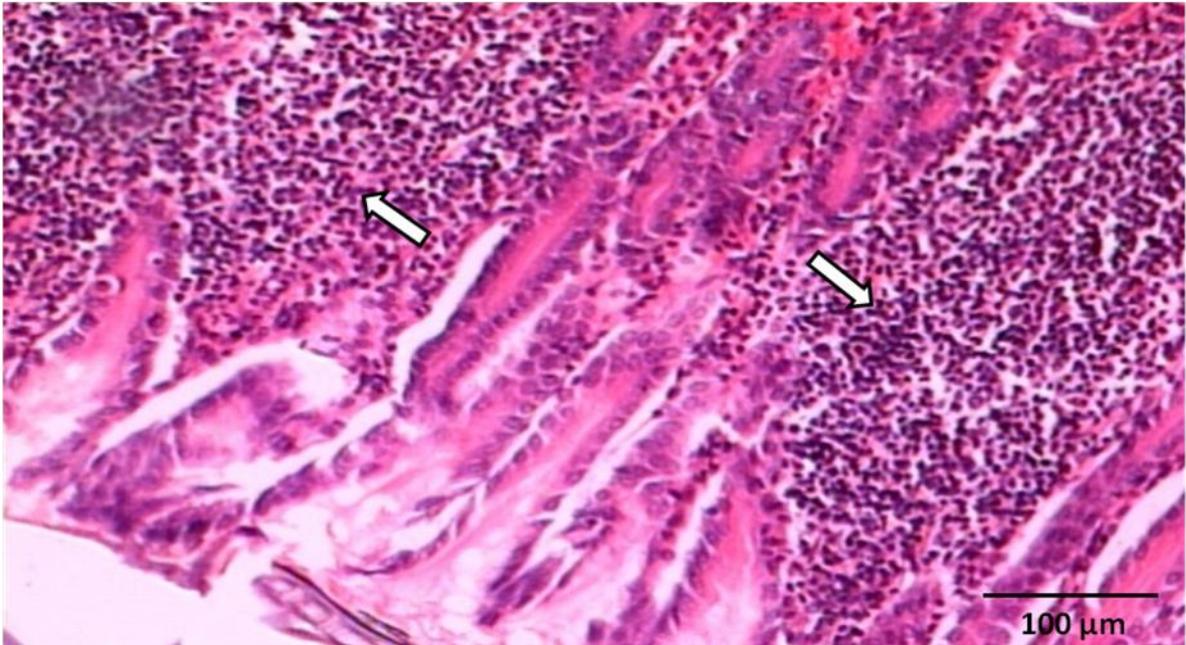


Figura 1 - Fotomicrografia de corte histológico do antro mostrando a presença de infiltrado linfocitário (seta). Coloração H-E. Aumento de 40X.

#### 4.1.2 Estudo do corpo

No estudo dos cortes realizados no corpo (Gráfico 2) observou-se uma maior incidência de gastrite crônica no grupo de ratos submetidos à piloroplastia: leve 3 (30,0%); e moderada 7 (70,0%). No grupo controle, ocorreu um predomínio da forma discreta (90,0%). Nos ratos submetidos à gastrectomia, também houve predomínio das formas menos graves: leve 6 (60,0%) e moderada 4 (40,0%). O teste exato de Fisher mostrou haver diferenças estatisticamente significantes nessas proporções ( $p < 0,001$ ).

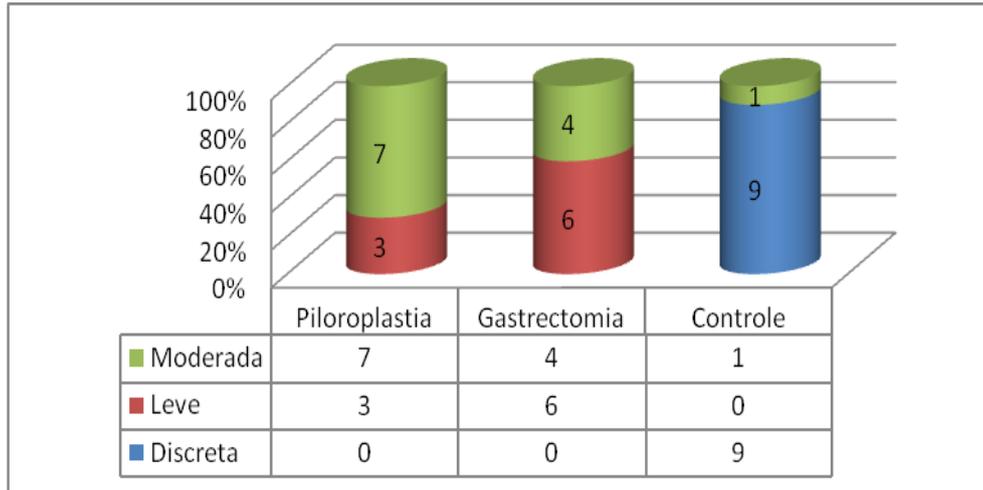


Gráfico 2 - Formas de gastrite crônica observadas no corpo gástrico nos grupos Píloroplastia, Gastrectomia e Controle.

#### 4.1.3 Estudo do fundo

No estudo dos cortes realizados no corpo (Gráfico 3) observou-se uma maior incidência de gastrite crônica no grupo de ratos submetidos à píloroplastia: discreta 1 (10,0%); leve 4 (40,0%); e moderada 5 (50,0%) enquanto que no grupo controle notamos que ocorreu um predomínio da forma leve 10 (100,0%). Nos ratos submetidos à gastrectomia, também houve predomínio das formas menos graves: leve 9 (90,0%) e moderada 1 (10,0%). O teste exato de Fisher mostrou haver diferenças estatisticamente significantes em essas proporções ( $p < 0,001$ ).

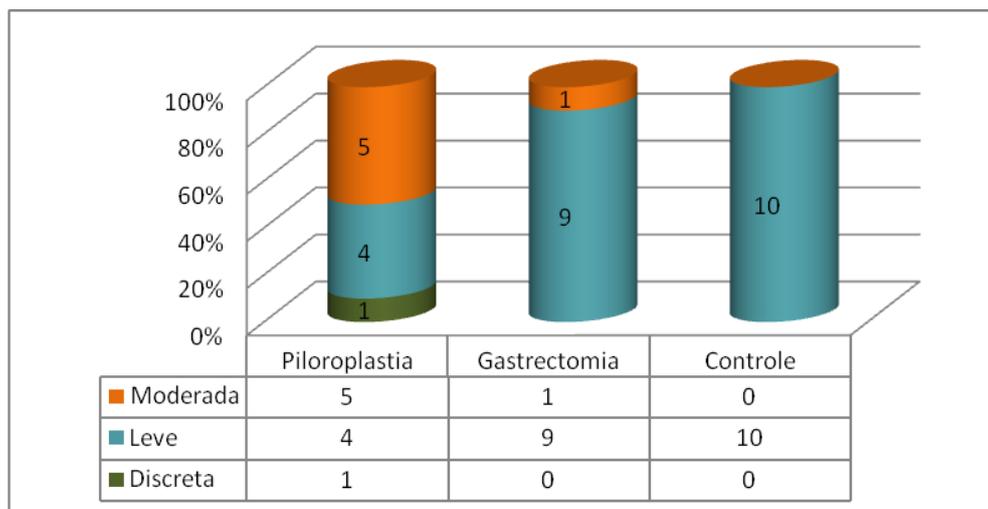


Gráfico 3 - Formas de gastrite crônica observadas no fundo gástrico nos grupos Píloroplastia, Gastrectomia e Controle.

## 4.2 Atividade da gastrite crônica

### 4.2.1 Estudo do antro

No estudo dos cortes realizados no antro (Gráfico 4) observou-se que no grupo de ratos submetidos à piloroplastia a atividade da gastrite crônica esteve presente em todos os ratos estudados, no entanto não houve um predomínio significativo estatisticamente da gravidade dessa atividade: discreta 4 (40,0%); leve 3 (30,0%); e moderada 3 (30,0%). No grupo gastrectomizado a atividade foi ausente em 2 (20,0%) e não foram evidenciadas formas graves: discreta 2 (20,0%) e leve 6 (60,0%). No grupo controle notamos que ocorreu um predomínio das formas menos graves 10 (100,0%). Nos ratos do grupo controle, houve predomínio das formas: ausente 1 (10,0%) leve 8 (80,0%) e discreta 1 (10,0%). O teste exato de Fisher mostrou haver diferenças estatisticamente significantes, quando comparadas as proporções entre grupos ( $p < 0,013$ ).

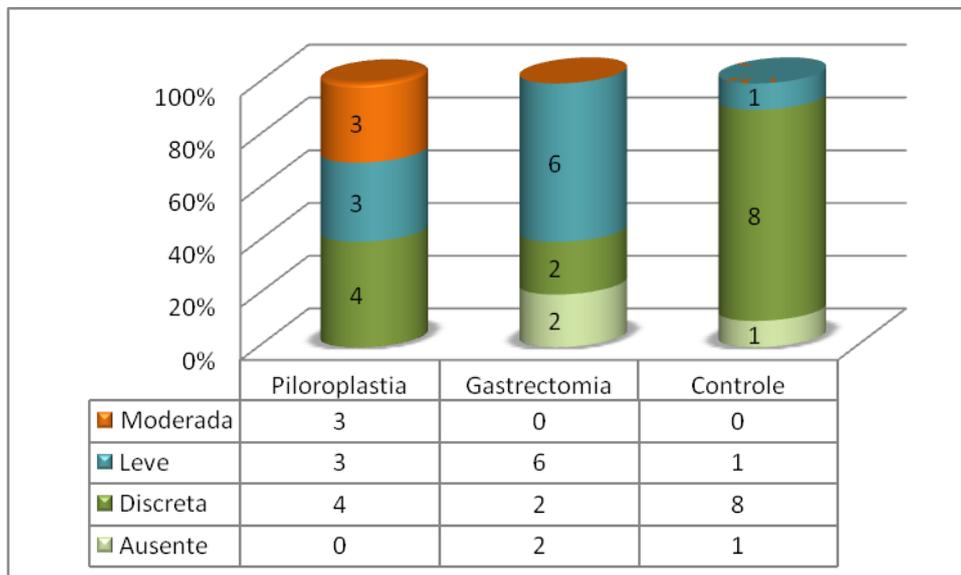


Gráfico 4 - Atividades de gastrite crônica observada no antro gástrico nos grupos Piloroplastia, Gastrectomia e Controle.

### 4.2.2 Estudo do corpo

No estudo dos cortes realizados no corpo (Gráfico 5) observou-se que no grupo de ratos submetidos à piloroplastia a atividade da gastrite crônica foi presente em todos os ratos estudados, com predomínio da forma discreta 7 (70,0%) e de

apenas 3 (30,0%) observações da forma leve. No grupo gastrectomizado a atividade foi ausente em 4(40,0%) e não foram evidenciadas formas graves: discreta 4 (40,0%) e leve 2 (20,0%), enquanto que no grupo controle notamos que ocorreu um predomínio da forma menos grave 10 (100,0%). Nos ratos do grupo controle, houve predomínio das formas menos graves: ausente 9 (90,0%) e discreta 1 (10,0%). O teste exato de Fisher mostrou haver diferenças estatisticamente significantes, quando comparadas as proporções entre grupos ( $p < 0,001$ ).

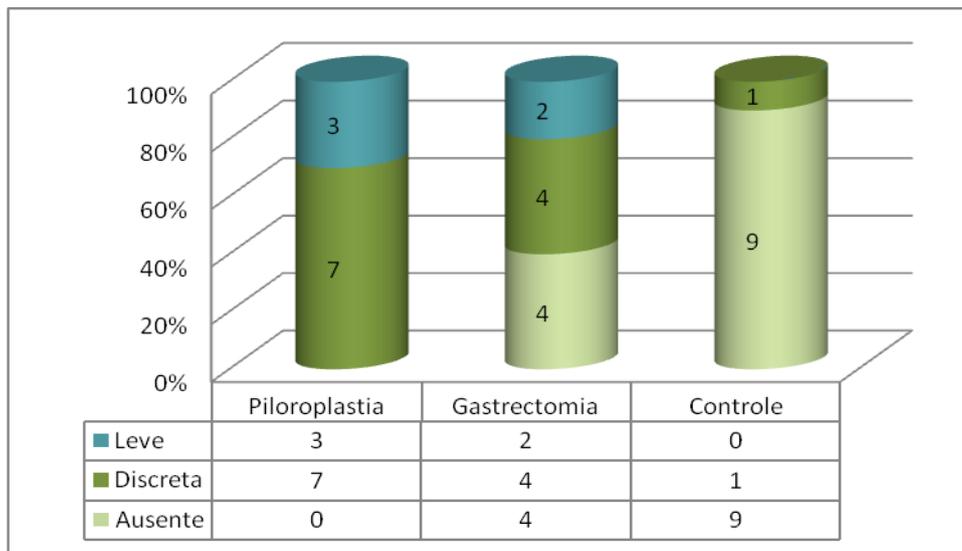


Gráfico 5 - Atividade de gastrite crônica observada no corpo gástrico nos grupos Píloroplastia, Gastrectomia e Controle.

#### 4.2.3 Estudo do fundo

No estudo dos cortes realizados no fundo (Gráfico 6) observou-se que no grupo de ratos submetidos à píloroplastia a atividade da gastrite crônica foi ausente em 4 (40,0%), presente na forma discreta 2 (20,0%) e leve 4 (40,0%). No grupo gastrectomizado a atividade foi presente em todos os ratos estudados, (100,0%) na forma discreta. Nos ratos do grupo controle, houve predomínio das formas menos graves: ausente 8 (80,0%) e discreta 2 (20,0%). O teste exato de Fisher mostrou haver diferenças estatisticamente significantes, quando comparadas as proporções entre grupos ( $p < 0,001$ ).

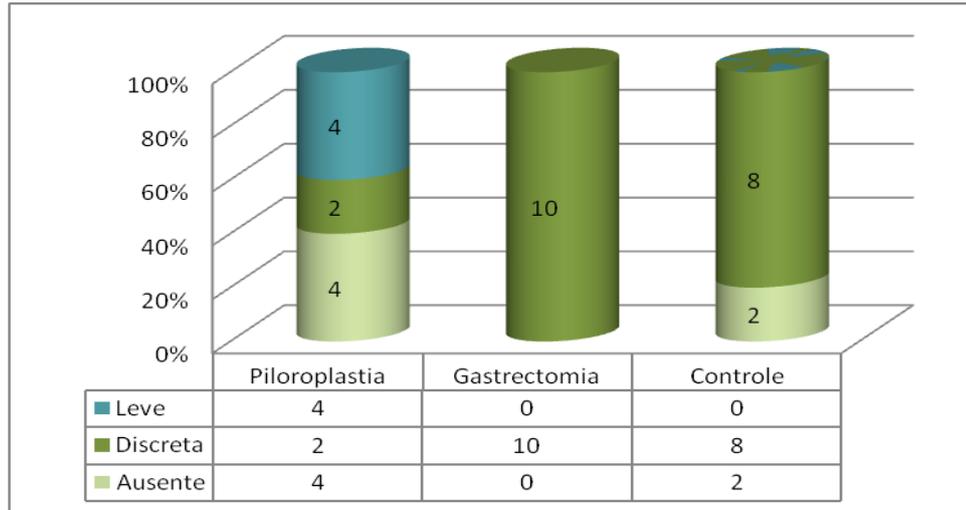


Gráfico 6 - Atividade de gastrite crônica observada no fundo gástrico nos grupos Píloroplastia, Gastrectomia e Controle.

### 4.3 Metaplasia

#### 4.3.1 Estudo do antro

O gráfico 7 mostra que não houve diferença estatisticamente significativa entre as proporções das taxas de metaplasia nos três grupos estudados.

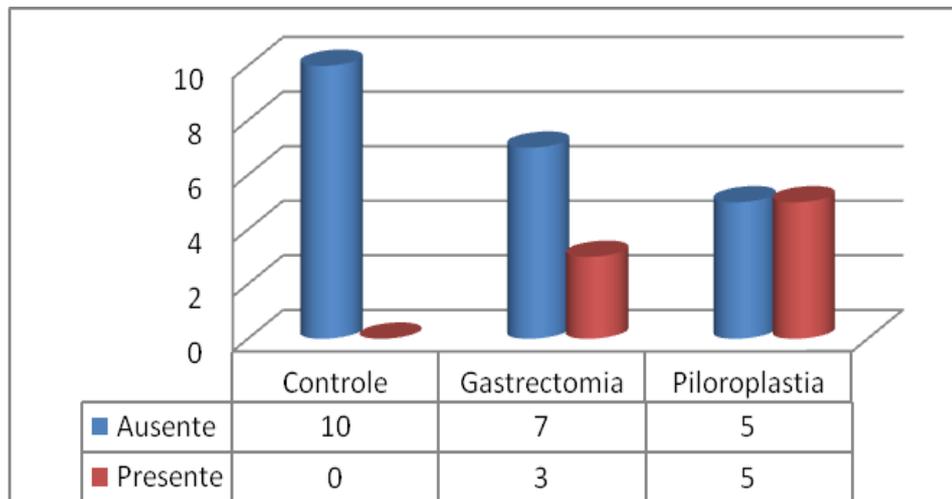


Gráfico 7 - Presença de metaplasia no antro gástrico nos grupos Píloroplastia, Gastrectomia e Controle.

A Figura 2 mostra presença de células calciformes em agregados brancos próprio do intestino caracterizada pela presença de mucina. Corte histológico do antro do grupo submetido à píloroplastia.

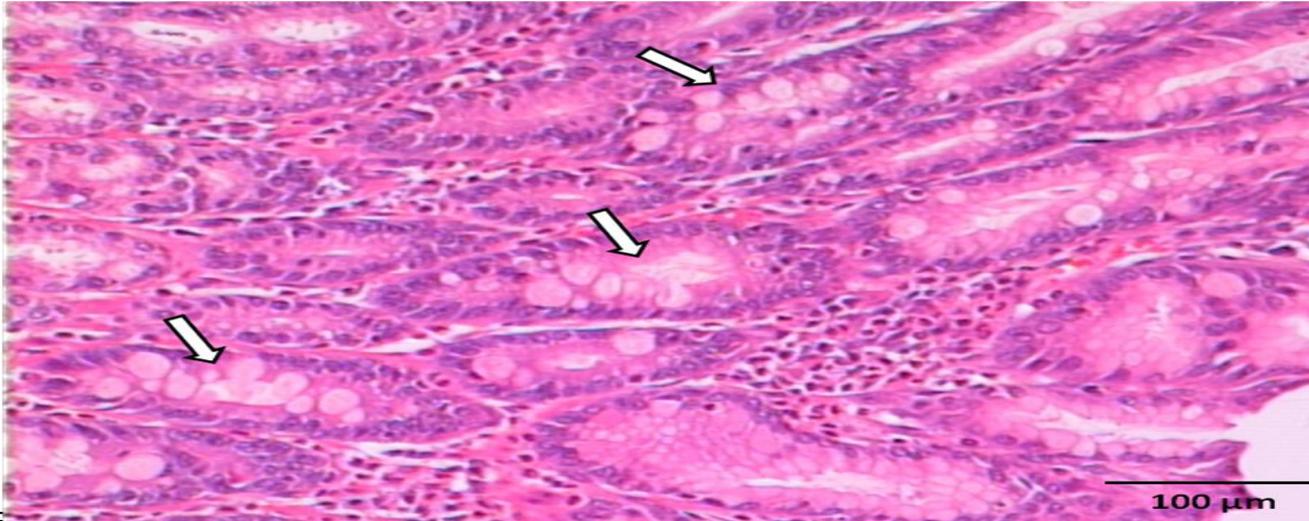


Figura 2 - Fotomicrografia de corte histológico do antro mostrando a presença de metaplasia intestinal (seta). Coloração H-E. Aumento de 40X.

## 4.4 Displasia

### 4.4.1 Estudo do antro

O Gráfico 8 mostra que o grupo dos ratos submetidos à piloroplastia apresentou 50% de displasia, o dos gastrectomizados 10% e que no grupo controle não foi evidenciado nenhum caso. O Teste do Exato de Fisher mostrou diferença estatisticamente significativa entre essas proporções ( $p=0,027$ ).

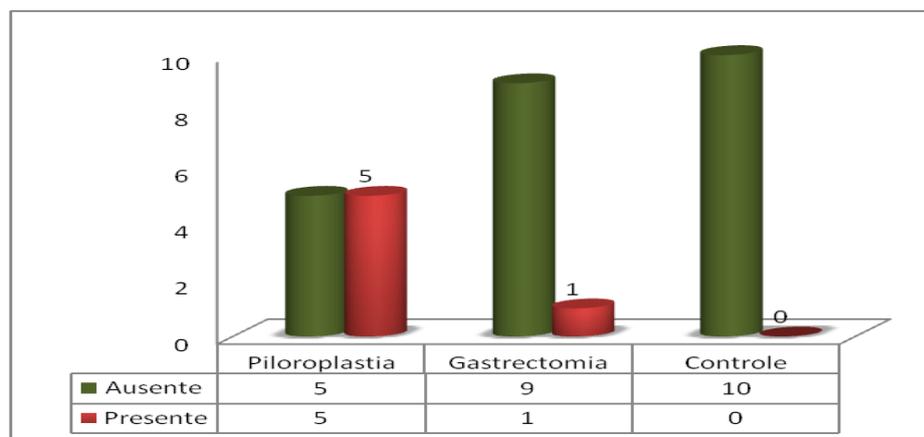


Gráfico 8 - Presença de displasia no antro gástrico nos grupos Piloro-plastia, Gastrectomia e Controle.

A Figura 3 mostra distorção da citoarquitetura intraepitelial ( perda de polaridade, diminuição de muco, proliferação de células e glândulas com alteração de suas formas. Corte histológico do antro do rato 06 do grupo submetido à piloroplastia.

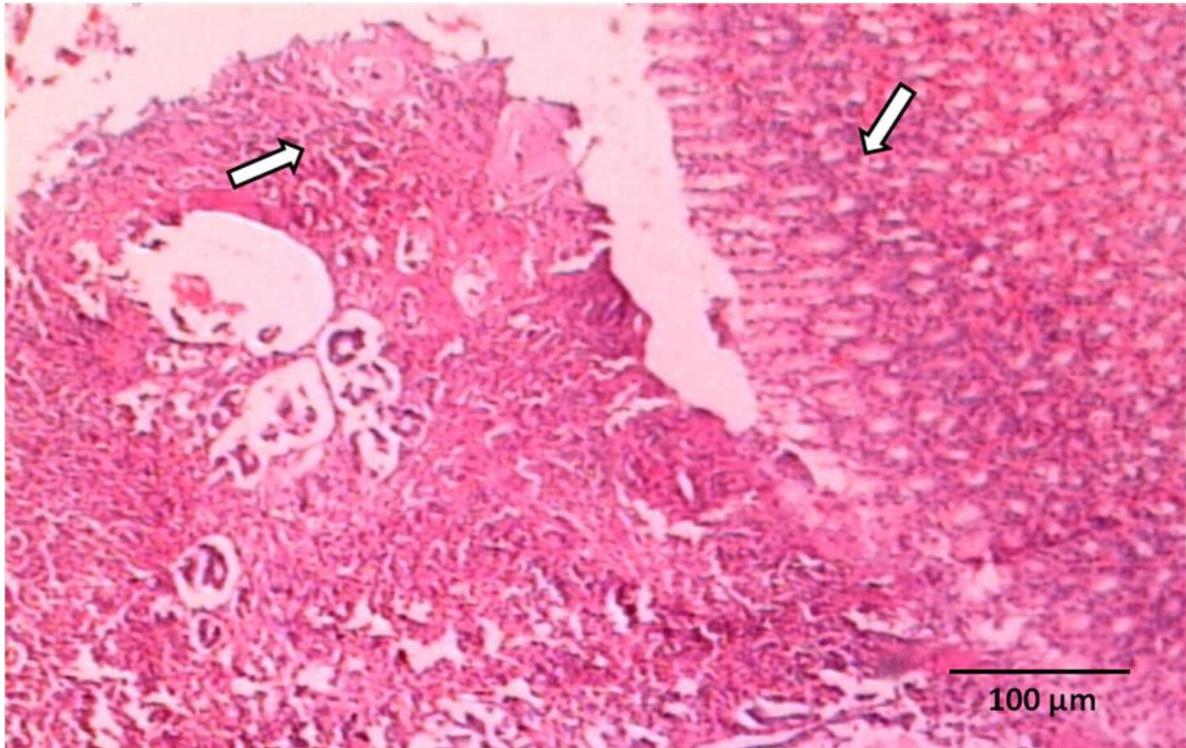


Figura 3 - Fotomicrografia corte histológico do antro mostrando a presença de displasia (setas). Coloração H-E. Aumento de 40X.

## 4.5 Neoplasia

### 4.5.1 Estudo do antro

O Gráfico 9 mostra que o grupo de ratos submetidos a piloroplastia foi o único que apresentou neoplasia (40%) quando comparado com os demais (gastrectomia 0% e controle 0%). O Teste do Exato de Fisher mostrou diferença estatisticamente significativa entre essas proporções ( $p=0,023$ ).

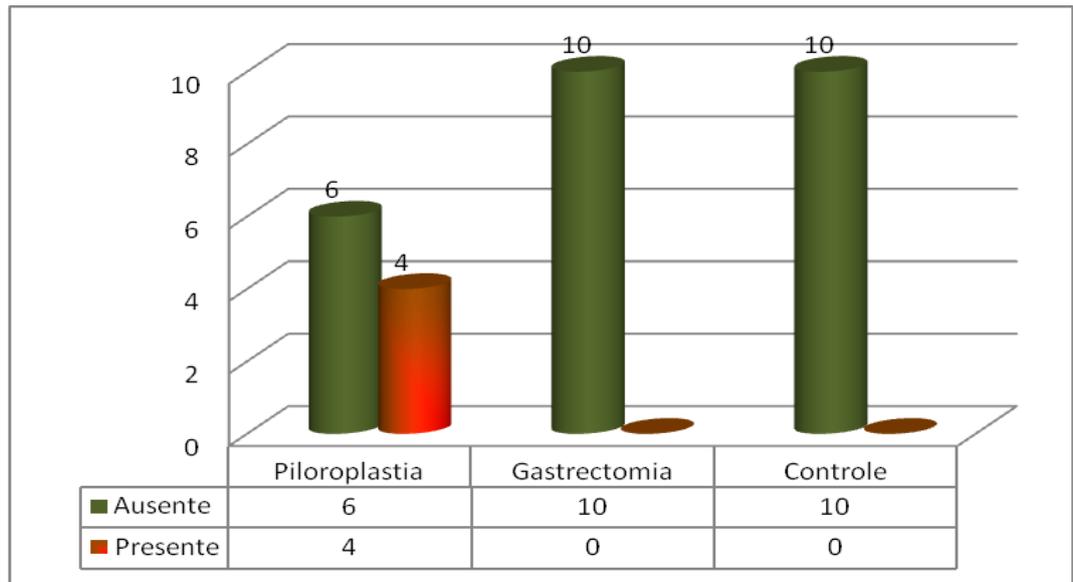


Gráfico 9 - Presença de neoplasia no antro gástrico nos grupos Píloroplastia, gastrectomia e controle

Nos estudos dos cortes histológicos realizados nos fragmentos do corpo e no fundo, não foram evidenciadas a presença de metaplasia, de displasia e de neoplasia.

A Figura 4 mostra presença de neoplasia, com: irregularidade das glândulas gástricas que não estão paralelas, diferenças no tamanho, e apresentação bifurcada. Corte histológico do antro do grupo submetido à píloroplastia.

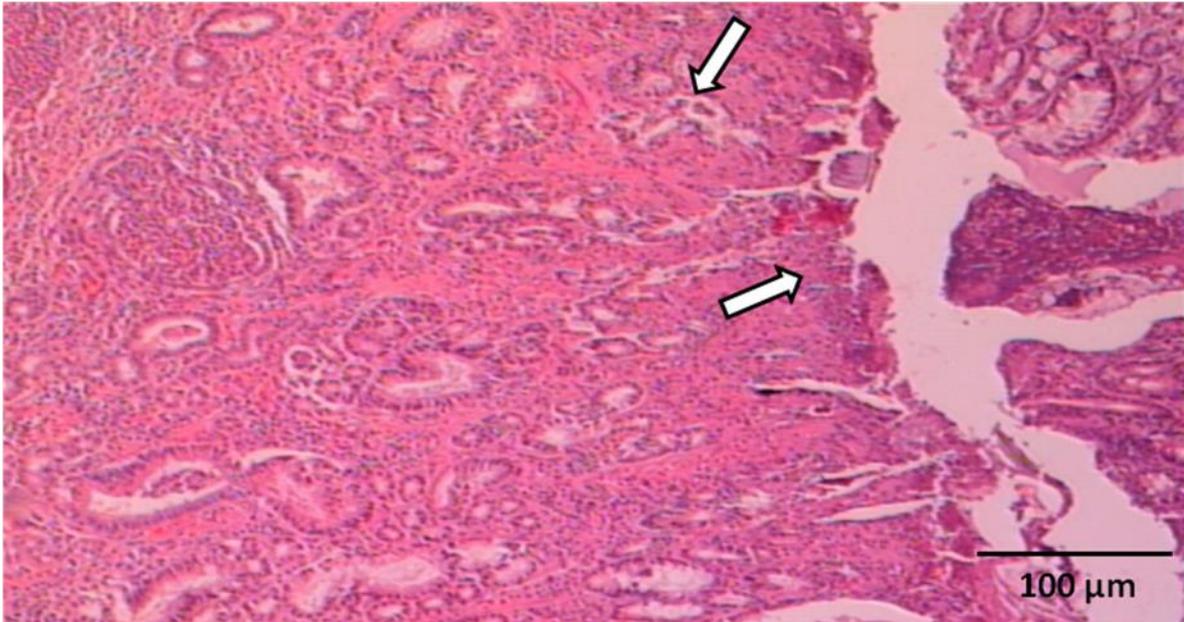


Figura 4 - Corte histológico do antro mostrando a presença de desarranjo estrutural extra-epitelial.

#### 4.6 Imunohistoquímica

Expressão do PCNA foi predominante na base das criptas das vilosidades da região antral do estômago. O grupo submetido à piloroplastia demonstrou maior expressão que no grupo submetido à gastrectomia, que demonstrou uma expressão moderada. Não foi verificada expressão do PCNA no grupo controle (Figura 5).

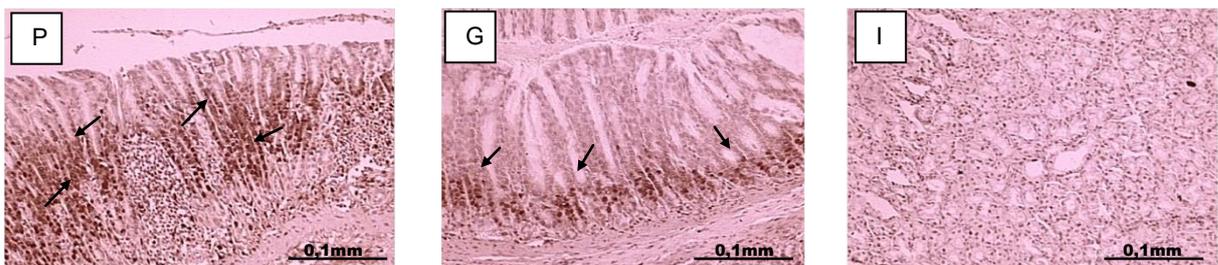


Figura 5 - Imunohistoquímica da expressão do PCNA do antro nos grupos estudados (seta): Piroplastia (P), Gastrectomia (G) e (I) Controle.

A expressão do TGF- $\beta$  (seta) foi positivada nas criptas das vilosidades da região antral do estômago. O grupo submetido à piloroplastia demonstrou maior expressão que grupo submetido à gastrectomia, que demonstrou uma expressão moderada. Não foi verificada expressão do TGF-beta no grupo controle (Figura 6).

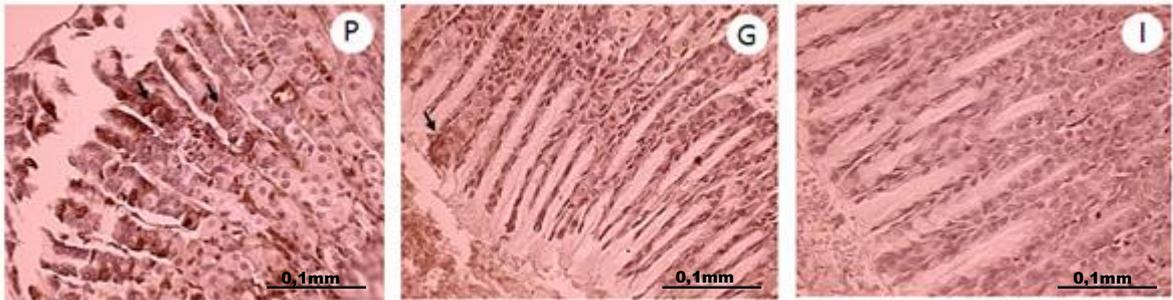


Figura 6 - Imunohistoquímica da expressão do TGF- $\beta$  do antro nos grupos estudados Piroplastia (P), Gastrectomia (G) e (I) Controle.

#### 4.7 Helicobacter pylori

Quando comparamos a população de *Helicobacter pylori* de acordo com o segmento gástrico estudado, independente do grupo, o antro foi o local em que se encontrou a maior quantidade da bactéria.

A mediana da quantidade de *Helicobacter pylori* encontrada nas 100 (cem) glândulas de cada segmento gástrico, quando comparada de acordo com os grupos, foi maior no antro dos animais submetidos à piloroplastia (mediana = 58,5), muito embora essa diferença com relação aos demais (gastrectomia = 16,5 e controle = 14,5), não tenha sido significativa (Teste de Kruskal Wallis  $p > 0,05$ ) conforme mostra a Tabela 1.

Localização	Total de animais	Mediana	Diferença interquartil
Antro	30	21	66
Corpo	30	2	5
Fundo	30	3,5	8

Tabela 1 - Quantidade de *Helicobacter pylori* nos diferentes segmentos gástricos independente dos grupos.

Houve correlação positiva entre quantidade de *Helicobacter pylori* presente nos fragmentos do antro e a ocorrência de gastrite crônica, de metaplasia, de displasia e de neoplasia. Não foram verificadas correlações entre essas variáveis estudadas nos fragmentos do corpo e do fundo (Tabela 2).

Localização	Mediana da quantidade Helicobacter. Pylori			Tese de Kruskal-Wallis (p valor)
	Piloro-plastia	Gastrectomia	Controle	
Antro	58,5	16,5	14,5	0,310
Corpo	4,0	1,5	1,5	0,560
Fundo	4,0	7,0	2,0	0,161

Tabela 2 - Quantidade de Helicobacter pylori nos diferentes segmentos gástricos de acordo com os grupos.

Variável	Localização					
	Antro		Corpo		Fundo	
	R	P	R	P	r	P
Gastrite crônica	0,5741	0,0009	0,1689	0,372	0,4065	0,258
Metaplasia	0,6886	<0,0001	-	-	-0,0653	0,7316
Displasia	0,6344	0,0002	-	-	-	-
Neoplasia	0,5283	0,0027	-	-	-	-

Tabela 3 - Correlação entre a quantidade de Helicobacter pylori e as alterações da mucosa gástrica considerando todos os grupos. Correlação de Spearman.

Variável	Localização					
	Antro		Corpo		Fundo	
	R	P	R	P	R	P
Gastrite crônica	0,5660	0,0881	0,3858	0,2709	0,6986	<b>0,0246</b>
Metaplasia	0,8730	<b>0,0010</b>	-	-	-	-
Displasia	0,8032	<b>0,0051</b>	-	-	-	-
Neoplasia	0,8554	<b>0,0016</b>	-	-	-	-

Tabela 4 - Correlação entre a quantidade de Helicobacter pylori e as alterações da mucosa gástrica do grupo dos ratos submetidos à piloro-plastia.

A Figura 7 mostra presença de bastonetes (*Helicobacter pylori*) na superfície foveolar no corte histológico do antro do grupo submetido à piloroplastia.

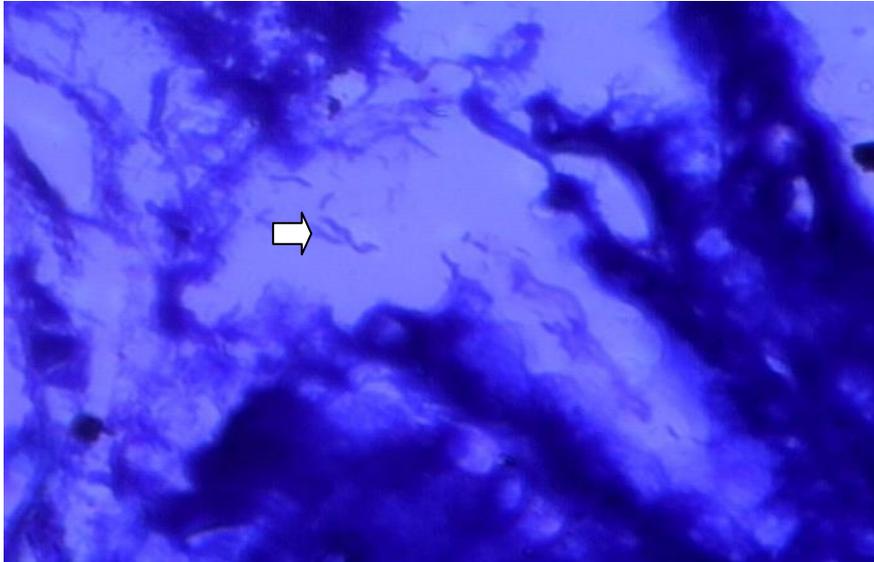


Figura 7 - Corte histológico do antro mostrando a presença de bastonetes (*Helicobacter pylori*) na superfície foveolar.

## 5 DISCUSSÃO

O carcinoma de estômago é um dos cânceres espontâneos mais raros em animais. O primeiro modelo que desenvolveu adenocarcinoma gástrico em ratos usava o carcinógeno N,N-2,7- fluorenylenebisacetamida (2,7-FAA) por (MORRIS et al., 1961). Sugimura e Fugimura (1967) relataram, que o N--N-N-nitro-Nitrosoquanidina (MNNG) é efetivo na produção de adenocarcinoma gástrico e este tem sido o carcinógeno mais amplamente utilizado na indução desses tumores para estudos do desenvolvimento hispatológico da carcinogênese (KAMINSKI; KRUEL, 2011).

No presente estudo histopatológico e imunohistoquímico, descrevemos as alterações da mucosa gástrica de ratos Wistar, infectados com *Helicobacter pylori*.

A infecção ocorreu por inoculação por gavagem orogástrica de 1ml de *Helicobacter pylori* e após 30 dias foram realizadas as cirurgias de gastrectomia parcial com a ressecção de 2/3 do antro e metade do corpo gástrico e piloroplastia realizada com uma incisão longitudinal de 01 cm no estômago e de 01 centímetro no duodeno, interessando todos os planos

Neste estudo, obteve-se predomínio de lesões proliferativas benignas, diagnosticando-se quatro neoplasias malignas, localizadas na região do antro gástrico na linha de sutura da piloroplastia. Essa localização é a mais comum nos trabalhos experimentais que executam gastrectomias parciais à Billroth II ou gastroenteroanastomose sem ressecção gástrica (MASON, 1986; CHAN et al., 2007; KAMINSKI; KRUEL, 2011).

O somatório de fatores, como o processo infeccioso, inflamação e piloroplastia, poderiam constituir um estímulo a proliferação celular. Sabe-se que o aumento da taxa de proliferação celular é um dos pré-requisitos para a carcinogênese. No presente estudo os cortes tratados com a técnica de imunoperoxidase para evidenciação de PCNA, identificador da proliferação celular, demonstraram que a maior imunomarcção se obteve na região da linha de sutura da piloroplastia no antro gástrico. Corroboram com tais afirmativas os trabalhos de Rodrigues et al. (2002) e Taylor et al. (1991).

Acredita-se que a região da anastomose possa ter características que facilitam o desenvolvimento de neoplasias, tais como processo inflamatório crônico, pela presença de corpo estranho (fio de sutura) e o contato contínuo com os

conteudos duodenogástricos. Os cortes imunomarcados com anticorpo anti TGF $\beta$  evidenciaram maior positividade na região do antro onde se encontra a linha de sutura. Whal et al. (1993) mostraram que o TGF $\beta$  é um potente quimiotático para leucócitos, incluindo neutrófilos, monócitos e mastócitos e está envolvido na formação do infiltrado inflamatório, especialmente na lesão inflamatória crônica. Nossos achados relativos a maior imunomarcação com o TGF $\beta$  na região do antro evidenciam a presença do infiltrado inflamatório que facilita o desenvolvimento de neoplasias.

Até o momento nenhum fator, isolado, pode ser implicado na carcinogênese gástrica. A associação de fatores, por outro lado, já se mostrou significativa no desenvolvimento desses tumores como refluxo duodenogástrico e infecção por *Helicobacter pylori*, ambos reconhecidamente fatores etiológicos da gastrite crônica, capaz de levar à gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e neoplasia. Esses eventos são presumivelmente sequência na cadeia de eventos da gênese do câncer gástrico, pois o estado proliferativo exacerbado nas suturas, como demonstraram em nosso trabalho, ou em lesões sem cirurgia, tornam-se alvos fáceis para a ação de carcinógenos formados endogenamente, como os compostos n-nitrosos que em estômagos hipoclorídricos seria colonizado por bactérias redutoras do nitrato em nitrito (THOMAZINI et al., 2006).

Em estudos experimentais, visando o conhecimento da etiopatogênica do câncer gástrico, diversos fatores já mostraram uma forte associação com a carcinogênese gástrica como: fatores ambientais, dietéticos, lesões pré-malignas, cirurgias gástricas e outras. Atualmente a tendência é avaliar a relação entre o refluxo duodenogástrico e a carcinogênese, que pode levar a esclarecimentos sobre os mecanismos de desenvolvimento e progressão do câncer gástrico, visto que, as incidências do adenocarcinoma são extremamente variáveis (0-71,4%). Porém, o fator negativo dessas pesquisas é a susceptibilidade heterogênea de ratos da linhagem Wistar à indução neoplásica (RODRIGUES et al., 2002).

Os resultados do presente estudo mostraram que qualquer situação que propicie maior concentração de *Helicobacter pylori* no estômago, entre eles cirurgias que tenha potencial indutor de refluxo duodenogástrico, apresentam forte paralelo entre a infecção por essa bactéria e o desenvolvimento de lesões pré-malignas e o carcinoma gástrico. Situação que ocorreria pela aumentada produção de polipeptídeos tróficos, como a gastrina, em resposta a hipocloridria, da metaplasia

intestinal e hiperplasia de células endócrinas. Confirmação, já feita por Miwa et al. (1992) e Calam (1996).

Em trabalho pioneiro, realizado por Langhans, induziu câncer gástrico em ratos sem administração de carcinógenos (LANGHANS et al., 1981). Mello et al. (2003) induziram 20% de câncer no coto gástrico em ratos submetidos a gastrectomia parcial com reconstituição a BII, também sem indução de carcinógenos em nove meses de observação.

Em estudo experimental em ratos utilizando a piloroplastia de Finney, em 50 semanas com uso de nitrito de sódio na água de beber (KAMINSKI; KRUEL, 2011) encontraram 55,1% de adenocarcinoma.

O *Helicobacter pylori* é importante nesse processo, pela maior produção de urease, enzima que forma a amônia no estômago, que é um fator de virulência, necessário para a ação patogênica. A amônia além de ser nutriente para as bactérias, causa lesões na mucosa gástrica e também estimula a liberação de mediadores inflamatórios como: interleucinas e o fator tumoral-alfa (VANDENPLAS; BADRIUL, 1999). Este estudo mostrou maior concentração de *Helicobacter pylori* na parte distal do estômago com a presença somente de câncer gástrico tipo intestinal. Thomazini et al. (2006) encontraram em ratos infectados com *Helicobacter pylori*, frequência similar em ambos os tipos histológicos de câncer gástrico (intestinal e difuso) de Laurén.

A gastrite crônica é uma inflamação inespecífica da mucosa gástrica definida por estudo histológico (WANG et al., 2008). Ocorre em qualquer região do globo terrestre, sua incidência aumenta com a idade e sua principal etiologia é de natureza microbiana, as custas do *Helicobacter pylori* (SIQUEIRA et al., 2007). Neste estudo com ratos Wistar infectados com *Helicobacter pylori* submetidos a piloroplastia, gastrectomia subtotal e ratos apenas infectados, foi encontrado predominante gastrite crônica discreta, independente do segmento gástrico ou grupo estudado, diferentemente do encontrado em vários estudos em ratos, que foram do tipo leve em todos os animais encontrado por Happonen et al. (1996), e que encontraram maior concentração de células inflamatórias nas regiões do corpo e fundo, talvez pela forma de classificação dos graus de gastrite variar de um estudo para outro devido à ausência de critérios fixos, para estudar a intensidade e distribuição da inflamação induzida pelo *Helicobacter pylori* (GEYER et al., 1993). No presente trabalho também a maioria do resultado da histopatologia de 100 glandulas

de cada segmento gástrico (antro, corpo e fundo ) estudados, mostrou a maior concentração de células na região do antro, seguidos das regiões do corpo e fundo, resultado igual ao já encontrado por (EATON et al., 1992).

O *Helicobacter pylori* é responsável pela infecção bacteriana crônica mais comum no mundo e o principal fator de risco para o câncer gástrico (CREW; NEUGUT, 2006). É considerado também como um indutor de um complexo processo, que evolui na mucosa, via gastrite crônica até gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e neoplasia, que está relacionando à sua capacidade de produzir uréase, enzima que produz amônia no estômago, com atuação independente de outros carcinógenos. Nosso estudo mostrou maior concentração de *Helicobacter Pylori* na região antropilórica que apresentou 40% de adenocarcinoma no antro gástrico, talvez pelo maior contato do material refluído com a mucosa gástrica, que favoreceria essa relação. Estudos divergentes na incidência de câncer gástrico por localização do tumor, sugerem que eles podem representar duas doenças com diferentes etiologias, pelo aumento na incidência de cânceres proximais em países desenvolvidos (CREW; NEUGUT, 2006).

Não existe consenso na literatura quanto as técnicas de reconstituição do trânsito alimentar, após cirurgias gástricas que propiciam o refluxo duodeno gástrico, favorecendo a carcinogênese do estômago remanescente. Isto ocorre devido os métodos de detecção deste refluxo, com medidas imprecisas, o caracter intermitente do refluxo ou falhas intrínsecas da metodologia empregada (MIWA et al., 1992; GIRELLI et al., 1996). Entretanto, estudando as relações do refluxo através do piloro, em ratos, e o desenvolvimento de câncer gástrico, após segmento de 50 semanas (KOBORI et al., 1984) encontraram prevalência de 41% de adenocarcinoma na mucosa do antro gástrico. Em estudo semelhante, com relação a mesma metodologia de indução do refluxo duodenogástrico através do piloro, mas com tempo diferente, de trinta semanas Kaminishi et al. (1995), não encontrou lesões malignas. Em nosso estudo, num segmento de 24 semanas, encontramos uma prevalência de 40% de adenocarcinoma de antro gástrico. Kamata (1993) não encontrou casos de carcinomas em cirurgias com reconstituição a Billroth I (gastroduodenostomia), mesmo com a retirada do piloro e obteve 20,8% de desenvolvimento de adenocarcinomas no grupo de ratos submetidos a reconstituição à Billroth II, sem indução de carcinógenos, mostrando que o importante não é apenas a relação com o refluxo, mas também sua relação com a quantidade

maior ou menor.

A associação do desenvolvimento de câncer gástrico com ressecção gástrica por patologia benigna vem sendo estudada desde 1919, por levar a perda de células produtoras de ácido e de enzimas. Essa condição se deve ao papel da hipocloridria, por citoredução que favoreceria a proliferação de bactérias, tornando também fácil a ação de carcinógenos formados endogenamente, como os compostos n-nitrosos. Pressupõe-se que a formação endógena de compostos n-nitrosos só ocorra em estômagos hipoclorídricos, facilitando a colonização de bactérias redutoras de nitrato e nitrito. Segundo a literatura, a incidência de câncer que ocorre em estômago remanescente, após a ressecção gástrica ter sido realizada por doença benigna, varia entre 0,8% a 8,9% dos pacientes gastrectomizados ( Safatle Ribeiro AV, et al 1996 ). No nosso estudo citoreductor (gastrectomia subtotal 2/3 de antro e metade do corpo gástrico com preservação do piloro e dos nervos vagos) a incidência de câncer mostrou-se negativa, já o grupo submetido a piloroplastia mostrou-se mais incidente no que tange a gastrite crônica, metaplasia, displasia e neoplasia. Correa et al. (1975) relataram que em 19 ratos operados de gastroenteroanastomose infectados com *Helicobacter pylori* por doze semanas, nove deles desenvolveram alterações displásicas e em sete foram classificadas como carcinomas. O autor acha que o baixo percentual de malignidade se deva a dificuldades metodológicas no estudo histológico em ratos.

## 6 CONCLUSÃO

A incidência de gastrite crônica, metaplasia, displasia e neoplasia aumentou com a colonização do *Helicobacter pylori*.

A região de maior colonização de *Helicobacter pylori*, foi a região do antro, independente do grupo estudado.

As imunomarcações com TGF $\beta$  e PCNA foram mais acentuadas na mucosa do antro no grupo submetido à piloroplastia, seguido do grupo gastrectomizado.

Houve confirmação entre o estudo histopatológico e a expressão imunohistoquímica do PCNA e TGF $\beta$ .

A cirurgia de piloroplastia em ratos infectados com *Helicobacter pylori*, mostrou-se está diretamente associado ao desenvolvimento do câncer gástrico.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAM, L.; KIERSZENBAUM, M. D. **Histologia e Biologia Celular: uma introdução a patologia**. 2. ed. [S.l.]: Elsevier, 2008.

ABRÃO, A.; FEIJÓ, W. Câncer gástrico: considerações sobre 342 casos operados. **Rev. Paul. Med.**, v. 79, p. 51-6, abr.1972.

ADVANCED. Gastric câncer. **Br. Med.**, v. 43, n. 11, Nov.1975. Editorial.

ARAUJO, M. G. et al. Chemical constituents of the methanolic extract of leaves of *leiothrix spiralis* ruhland and their antimicrobial activity. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 10479-9

BANKS, J. W. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole, 1992.

BAUER, M.; SCHUPPAN. TGFbeta1 in liver fibrosis: time to change paradigms? **FEBS Lett** **502**, v. 1, n. 2, p. 1-3, 2001.

BARTSCH, H. et al. Human exposure to endogenous N-nitroso compounds: quantitative estimates in subjects at high risk for cancer of the oral cavity, oesophagus, stomach and urinary bladder. **Cancer Surveys**, n. 8, p. 335-362, 1989.

BENNETT, N. T.; SCHULTZ, G. S. Growth factors and wound healing: role in normal and chronic wound healing. **Am J Surg**, v. 166, n. 1, p. 74-81, 1993.

CALAM, J. Yale. Helicobacter pylori e hormônios. **J Biol Med.**, v. 69, n. 1, p. 39-49, Jan./Feb. 1996.

CHAN, D. C. et al. Roux-en-y reconstruction after distal gastrectomy to reduce enterogastric reflux and helicobacter pylori infection. **J Gastrointest Surg**, v.11, n. 12, p. 1732-40, 2007.

CHOI, M. E. Mechanism of transforming growth factor-beta1 signaling. **Kidney Int Suppl**, v. 77, p. 53-8, 2000.

COELHO, L. G. V.; CASTRO, L. P. de. Helicobacter pylori: desafios de sua erradicação em países em desenvolvimento. In: ROSA, H.; DANI R; A. J. G. (Org). **Terapêutica em gastroenterologia**. São Paulo: Lemos, 2002. p. 51- 59.

CORREA, P. et al. A model for gastric cancer epidemiology. **Lancet**, n. 11, p. 58-60, 1975.

CREW, K. D.; NEUGUT, A. I. Epidemiology of gastric cancer. **R World J Gastroenterol**, v. 3, n. 12, p. 354-362, Jan. 2006.

DIXON, M. F. et al. Classification and grading of gastritis: the updated Sydney System – International Workshop on the histopathology of Gastritis. The updated Sydney System. **Am J Surg Pathol**, n. 20, p. 1161- 81, 1996.

EATON, K. A. et al. Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by helicobacter pylori. **J Med Microbiol**, v. 37, n. 2, p.123-7, 1992.

EPPLEIN, M. et al. Prospective study of helicobacter pylori biomarkers for gastric cancer risk among chinese men. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 2012.

FOSSMARK, R. et al. Gastric cancer: animal studies on the risk of hypoacidity and hypergastrinemia. **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 11, 1646-51, 2008.

GEYER, C. et al. Ocorrência de bactérias em forma de espiral em biópsias gástricas de cães e gatos. **Rec veterinário**, v. 133, n. 1, p. 18-9, jul. 1993.

GIRELLI, C. M. et al. Duodenogastric reflux: an update. **Am J Gastroenterol**, n. 91, p. 648-53, 1996.

GISBERT, J. P.; CALVET, X. Review article: common misconceptions in the management of helicobacter pylori-associated gastric malt-lymphoma. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 34 ,n .9, p. 1047-62, 2011.

HAPPONEN, I. et al. Ocorrência e mapeamento topográfico do gástrica Helicobacter organismos similares e sua associação com alterações histológicas em cães aparentemente saudáveis e gatos. **Zentralbl Veterinarmed**, v. 43, n. 5, p. 305-15, July, 1996.

HOWE, H. L. et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2003, featuring cancer among u.s. hispanic/latino populations. **Cancer**, v. 107, n. 8, p. 1711-42, 2006.

HU, B. et al. Gastric cancer: classification, histology and application of molecular pathology. **J Gastrointest Oncol**, v. 3, n. 3, p. 251-61, 2012.

IGARASHI, A., H. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. **Mol Biol Cell**, v. 6, n. 4, p. 637-45, 1993.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Incidência de Câncer no Brasil. 2012. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?id=5>>. Acesso em: 12 out. 2012.

KAMATA, T. Experimental studies on the development of residual stomach cancer. Comparison of Billroth I and Billroth II. **Nippon Geka Gakkai Zasshi**, v. 94, n. 2, p. 104-113, 1993.

KAMINSKI, Eliane de Marco Ferreira; KRUEL, Cleber Dario Pinto. Gastric carcinogenesis model using Finney pyloroplasty: experimental study in rats. **ABCD, arq. bras. cir. dig.**, v. 24, n. 4, p. 296-304, 2011.

KAMINISHI, M. M. et al. Etiology of gastric umnant câncer with especial reference to the effects of de nesvarion of the gostric mucosa. **Câncer supplement**, v. 75, p.1490-6, 1995.

KATSUBE, T. et al. The efficacy of endoscopic submucosal dissection compared with modified endoscopic aspiration mucosectomy by assessing the short-term therapeutic results for differentiated mucosal gastric cancer. **Anticancer Res**, v. 29, n.10, p. 4271-4, 2009.

KAWIORSKI, W. et al. Current diagnosis of gastroduodenal reflux and biliary gastritis. **Przeegl Lek**, v. 58, n. 2, p. 90-4, 2001.

KLAUSZ, G. et al. Effects of helicobacter pylori infection on gastric inflammation and local cytokine production in histamine-deficient (histidine decarboxylase knock-out) mice. **Immunol Lett**, n. 94, v. 3, p. 223-8, 2004.

KOBORI, O. et al. Enhancing effect of bile and bile acids on stomach tumorigenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. **J Natl Cancer Inst**, n. 73, p. 853-61, 1984.

KONTUREK, et al. Role of gastrin in gastric cancerogenesis in Helicobacter pylori infected humans. **J Physiol Pharmacol.**, v. 5, n. 50, p. 857-73, dez. 1999.

KRIENITZ, W. Auftreten von spirochäten verschiedener form in mageninhalt bei carcinoma ventriculi. **Dtsch Med Wochenschr**, v. 28, p. 872-889, 1906.

LADEIRA, M. S. P. et al. Biopatologia do Helicobacter pylori. **J Bras Patol.**, v. 39, n. 4, 2003.

LANGHANS, P. et al. Operation sequel carcinoma of the stomach. Experimental studies of surgical techniques with or without resection. **World Journal of Surgery**, v. 5, n. 4, p. 595-605, 1981.

LIU, X. et al. Prognostic significance of tumour markers in chinese patients with gastric cancer. **Anz J Surg**, 2012.

MARSHALL, B. J.; WARREN. J. R. Unidentified curved bacillus in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **Lancet**, p. 1331-1315, 1984.

MAGEE, P. N.; BARNES, J. M. The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. **Br J Cancer**, v. 10, n. 1, p. 114-22, 1956.

MASON, R.C. Duodenogastric reflex m sat gastric carcinoma B1. **Surg**, v. 10, n. 73, p. 801-803, 1986.

MATSUO, T. et al. Low prevalence of helicobacter pylori-negative gastric cancer among japanese. **Helicobacter**, v. 16, n. 6, p. 415-9, 2011.

MELLO, E. L. R. et al. Câncer de coto gástrico em ratos; papel da assaociação de Helicobacter pylori e refluxo ênterogástrico. **Rev.Col. Bras. Cir.**, v. 30, n. 6, p. 452-459, Nov./Dez. 2003.

MIWA, K. et al. Duodenal reflux through the pylory induces gastric adenocarcinoma in the rat. **Carcinogenesis**, n. 13, p. 2313-6, 1992.

- MOTOTSUGU, Kato. Research profile on Blemed Experts: helicobacter pylori, helecobactes infection. **World journal of gastroenterology**, v. 42, n.16, p. 5342-2, 2010.
- MORRIS, H. P. et al. Comparative study of cancer and other lesions of rats fed N.N-2,7 plurenylenebisacetamide or N-2 fluorenylene. **Nat Cancer Inst Monogr**, n. 5, p. 1-53, 1961.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Campylobacters e Helecobacters. In: *Microbiologia Médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 339-347.
- NAGINI, S. Carcinoma of the stomach: a review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. **World J Gastrointest Oncol** v. 4, n. 7, p. 156-69, 2012.
- NAKA, T. et al. The evaluation of surgical treatment for gastric cancer patients with noncurative resection. **Langenbecks Arch Surg**, 2012.
- NAKAJIMA, K. et al. Possible involvement of put a gene in helicobacter pylori colonization in the stomach and motility. **Biomed Res**, v. 29, n. 1, p. 9-18, 2008.
- OLIVARES, D. et al. Helicobacter pylori infection and gastric mucosal epithelial cell apoptosis. **Rev Esp Enferm Dig**, v. 97, n. 7, p. 505-20, 2005.
- PARKIN, D. M. et al. Global cancer statistics, 2002. **Ca Cancer J Clin**, v. 55, n. 2, p. 74-108, 2005.
- PEEK, R. M. et al. Helicobacter pylori caga+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. **J Natl Cancer Inst**, v. 89, n. 12, p. 863-8, 1997.
- RITCHIE, W. P. Alkaline reflux gastritis, an objective assessment of its diagnosis and the tratamento. **Ann Surg**, v. 192, n. 3, p. 288-98, Sep. 1980.
- RODRIGUES, Paulo Antonio et al. O refluxo duodeno-gástrico (RDG), através do piloro, induz lesões proliferativas gástricas em ratos?. **Acta Cir. Bras.**, v. 17, n.3, p.160-167, maio, 2002.
- ROSS, M. H.; ROMRELL, L. J. **Histologia**: texto e atlas. 2. ed. [S.I.]: Panamerica, 1 993.
- SAFATLE-RIBEIRO AV, RIBEIRO JUNIOR U, REYNOLDES JC, GAMA-RODRIGUES JJ, IRIYA K, KIM R et al. Morphologic, histologic and molecular similarites between adenocarcinoma arising in the gastric stump and the intact stomach. *Cancer*. 1966 Dec 1;78(11) 2288-99
- SANCHEZ-FAYOS, Calabuig et al. Gastrointestinal carcinoid tumors: cellular biology, molecular expression and physiopathological consequences of an enigmatic neoplasia. **Gastroenterol Hepatol**, v. 31, n. 6, p. 356-65, 2008.

SIQUEIRA, J. S. et al. Aspectos Gerais nas infecções pós helicobacter pylori, revisão. **RBA (C.S.I)**, v. 39, n.1, p. 9-13, 2007.

SKALERIC, U. et al. Changes in TGF-beta 1 levels in gingiva, crevicular fluid and serum associated with periodontal inflammation in humans and dogs. **Eur J Oral Sci**, v. 2, n. 105, p. 136-42, 1997.

STEINSVOLL, S. et al. Extensive expression of TGF-beta1 in chronically-inflamed periodontal tissue. **J Clin Periodontol**, v. 6, n. 26, 366-73, 1999.

STINSON, A. W.; CALHOUN, M. L. Sistema digestivo. In: DELLMANN, H. D.; BROWN, E. M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p. 171-182.

SUGANUMA, M. et al. Human gastric cancer development with tnf-alpha-inducing protein secreted from helicobacter pylori. **Cancer Lett**, v. 322, n. 2, p. 133-8, 2012.

SUGIMURA, T.; FUJIMURA, S. Tumor production in gladulas stomach of rat by n-methyl- n-nitro-n-nitrosoquanidine. **Nature**, v. 5118, n. 216, p. 943-4, Dec. 1967.

SUNG, C. O. et al. Twist1 is up-regulated in gastric cancer-associated fibroblasts with poor clinical outcomes. **Am J Pathol**, v. 179, n. 4, p. 1827-38, 2011.

TAYLOR, P. R. et al. Gastric Carcinogenesis in the rat induced by duodenogastric reflux without carcinogens: mosyohology, mucin histochemistry, polyamine metabolism and labeling index. **Gut**, v. 32, p. 1447-5, 1991.

TANIGAWA, N. et al. Current State of Gastric Stump Carcinoma in Japan: Based on the Results of a Nationwide Survey. **World J Surg**, v. 34, n. 7, p. 1540-1547, 2010.

THOMAZINI, C. M. et al. Infecção por Helicobacter pylori e câncer gástrico: frequência de cepas patogênicas cagA e vacA em pacientes com câncer gástrico. **Bras Patol Med Lab**, n. 46, p. 25-30, 2006.

TU, H. L. et al. Role of oxidative stress and thioredoxin in gastric cancer. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**, v. 31, n. 9, p. 1518-20, 2011.

VANDENPLAS, Y.; BADRIUL, H. A infecção pelo helicobacter pylori. **Acta Paediatr Taiwan**, v. 40, n. 4, p. 212-24, July/Aug.1999.

YOKOTA, S. et al. Helicobacter pylori Lipopolysaccharides Upregulate Toll-Like Receptor 4 Expression and Proliferation of Gastric Epithelial Cells via the MEK 1/2 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. **Infect Immun**, v. 78, n. 1, p. 468-476, 2010.

WAHL, S. M. et al. Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation. **J Periodontol**, v. 64, p. 450-5, 1993. 5 Suppl.

WANG, Y. F. et al. The relationship between dietary protein intake and blood pressure: results from the PREMIER study. **J Hum Hypertens**, v. 22, n. 11, p. 745-54, 2008.

WILLARD, M. D. Afecções do estômago. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. [S.l.]: Manole, 1997. p. 1583-1595.

WORKU, M. L. et al. The relationship between helicobacter pylori motility, morphology and phase of growth: implications for gastric colonization and pathology. **Microbiology**, v. 145, n. 10, p. 2803-11, 1999.

WOTHERSPOON, A.C. et al. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of Helicobacter pylori. **Lancet**, v. 342, n. 8871, p. 575-7, Sept. 1993.

**ANEXO - Comissão de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais**



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

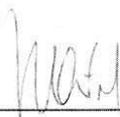
**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº **CEA/001/2010** sobre "*Influência do refluxo enterogástrico nas alterações histológicas da mucosa gástrica de ratos infectada por Helicobacter pylori: modelo experimental*", sob a responsabilidade de Luís Felipe Ribeiro Pinto (UERJ) e Adalgisa de Souza Paiva Ferreira (UFMA), 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 Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **15/01/2010**. Este certificado expira em **15/01/2014**.

Rio de Janeiro, 15 de Janeiro de 2010.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Patricia Cristina Lisboa  
CEA/IBRAG/UERJ

*Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva  
Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ  
Matricula 34765-8*

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Israel Felzenszwalb  
CEA/IBRAG/UERJ

*Israel Felzenszwalb  
IBRAG - UERJ  
Matr. 2887-8*

/ ass