

RESSALVA

Alertamos para ausência dos itens “Discussão, Conclusão, Referências e Apêndice”, do artigo original, não incluídos pela autora no arquivo original.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina de Botucatu

Thais França Bustamante

**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E
ULTRAESTRUTURAL DO ESÔFAGO DISTAL DE
RATOS COM LESÃO CÁUSTICA SUBMETIDOS À
APLICAÇÃO TÓPICA DE MITOMICINA C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Bases Gerais da Cirurgia da
Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP
para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.Dra. Erika V. Paiva Ortolan

Botucatu – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Bustamante, Thais França.

Análise histopatológica e ultraestrutural do esôfago distal de ratos com lesão cáustica submetidos à aplicação tópica de Mitomicina C / Thais França
Bustamante. – Botucatu : [s. n.], 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Érika Veruska Paiva Ortolan

Capes: 40102149

1. Esôfago – Estenose. 2. Soda cáustica. 3. Mitomicina C.

Palavras-chave: Dilatação esofágica; Estenose de esôfago; Ingestão de cáusticos; Mitomicina C; Soda cáustica.

Dedicatória

Aos meus pais, irmãos, esposo e filhos,

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos. "

Albert Einstein

Agradecimientos

A Professora Doutora Érika V. Paiva Ortolan, da Disciplina de Cirurgia Pediátrica do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pela confiança, apoio, orientação e amizade.

Ao Professor Doutor Bonifácio Katsunori Takegawa, da Disciplina de Cirurgia Pediátrica do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pelo exemplo de dedicação à ciência e ensino.

Às ex-alunas da Graduação Kátia Higa (bolsista de iniciação científica FAPESP processo 08/53115-1) e Amanda Pinter Carvalheiro da Silva, pela participação em várias fases do projeto.

Aos funcionários do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia, da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, em especial ao técnico Luís Carlos Bardella pela ajuda em todos os momentos do cronograma experimental deste trabalho.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, pela amizade e paciência nas orientações.

Agradeço aos seguintes setores :

Secretaria do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, em especial os funcionários Simone Barroso Corvino de Camargo, Douglas de Jesus J. Pinto e Marinede Ribeiro Jorge.

Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - UNESP - Botucatu, na pessoa do Professor Doutor Sérgio Felisbino.

Unidade Auxiliar "Centro de Microscopia Eletrônica" do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - UNESP - Botucatu, nas pessoas da Professora Titular Elisa Aparecida Gregório e Nivalde Antônio Basso.

Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências Universidade Estadual Paulista - UNESP - Botucatu, na pessoa da Professora Doutora Lídia Raquel de Carvalho.

Agradeço,

Aos meus pais, Albinha e João, pelo carinho, dedicação, cuidado e amor imensurável;

Aos meus irmãos, Henrique e Thiago, pela presença constante em minha vida;

Ao meu esposo, Fábio, meu amigo e companheiro, obrigado pela paciência e apoio incondicional;

E aos meus filhos, Arthur e Raquel, amores da minha vida, por me fazerem a mãe mais feliz do mundo.

Lista de abreviaturas e siglas

cm	centímetro
D0	dia da indução da lesão cáustica
D7	7º dia após lesão cáustica (momento 1)
D14	14º dia após lesão cáustica (momento 2)
D21	21º dia após lesão cáustica (momento 3)
D28	28º dia após lesão cáustica (momento 4)
Fr	French (unidade de medida = 0,3cm)
NaOH	hidróxido de sódio ou soda cáustica
g	gramas
Gc	grupo controle
Gdil+mmcD14	grupo dilatação + MMC D14
GmmcD0	grupo MMC D0
GmmcD14	grupo MMC D14
Gnt	grupo não tratado
Gs	grupo <i>sham</i>
h	horas
IE	índice de estenose
Kg	quilograma
Kv	quilovats
µm	micrômetro
mg	miligrama
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
MMC	Mitomicina C
nm	nanômetro
PO	pós operatório
SF0,9%	soro fisiológico a 0,9%

Sumário

Artigo de revisão	
A ingestão de cáusticos.....	12
Artigo original	
Análise histopatológica e ultraestrutural do esôfago distal de ratos com lesão cáustica submetidos à aplicação tópica de Mitomicina C	
Resumo.....	20
Abstract.....	23
Introdução.....	26
Objetivo.....	27
Material e Método.....	28
Resultados.....	39
1. Peso Corporal.....	39
2. Taxa de mortalidade.....	40
3. Estudo radiológico contrastado do esôfago.....	41
4. Análise histopatológica.....	45
5. Análise morfométrica e do índice de estenose.....	50
6. Análise ultraestrutural.....	54
Discussão.....	58
Conclusão.....	64
Referências bibliográficas.....	65
Apêndice	
1. Peso.....	79
2. Análise histopatológica.....	81
3. Índice de estenose e área preenchida por colágeno.....	83

Artigo de Revisão

A ingestão de cáusticos

A ingestão de cáusticos

A ingestão de substâncias cáusticas, acidental na maioria dos casos, constitui um sério problema de saúde pública com uma frequência mais elevada nos primeiros anos de vida, podendo causar graves consequências. Cerca de 80% dos pacientes avaliados por ingestão de agentes corrosivos são menores de 5 anos de idade e, destes, 20% apresentam lesões no esôfago. A prevalência é bimodal, com o segundo pico entre 20 e 30 anos de idade, secundário às tentativas de suicídio (Goldman, 1984; Broto, 1999).

Vários agentes químicos causam lesões na mucosa do trato digestivo, com destaque para dois grandes grupos: álcalis (hidróxido de sódio ou soda cáustica e hidróxido de potássio) e ácidos (clorídrico, sulfídrico, nítrico, fosfórico e acético). Os álcalis fortes são responsáveis por 90% das lesões esofágicas, sendo o restante das lesões atribuídas aos ácidos (Loomis, 1982).

Os álcalis estão enquadrados na categoria das substâncias básicas inorgânicas. Apesar de não serem destinados ao consumo humano e de possuírem uma legislação para garantir a segurança de sua utilização por meio de uma adequada rotulagem, acondicionamento e transporte dos produtos sólidos e líquidos, ainda são muitos os casos de intoxicações registrados pelas agências reguladoras e notificadoras no Brasil (Loomis, 1982).

Os álcalis, além da ação química irritante direta sobre os tecidos, também provocam destruição decorrente da alta temperatura das reações químicas exotérmicas ao reagirem com

os produtos essenciais das células (água, proteínas e lipídios) chegando a atingir até 100 graus centígrados (Mamede et al., 2000). Os danos teciduais são produzidos por necrose de liquefação através da saponificação das gorduras e solubilização das proteínas, permitindo a penetração profunda dos xenobióticos nos tecidos (Corsi et al., 2000). O processo de saponificação consome os lipídios que entram na constituição das mucosas e dos tegumentos, além de dissolver as matérias protéicas formando os proteínatos (Plunkett & Muñoz, 1974).

Dentre os álcalis fortes capazes de produzir lesões importantes, destaca-se por sua frequência a soda cáustica (hidróxido de sódio) que é componente fundamental da maioria dos detergentes industriais, e bastante utilizada para a fabricação caseira de sabão.

A soda cáustica ou hidróxido de sódio (NaOH) é um sólido esbranquiçado, podendo se apresentar na forma sólida (em barra, escamas, pérolas, flocos, grânulos, lentilhas, pó, massa fundida, pastilhas ou cilindros brancos secos, duros, quebradiços, de fratura cristalina, inodoros e de sabor ardente) ou na forma líquida. Apresenta grande solubilidade em água (1:1) e álcool. Na forma sólida, apresenta uma concentração de 96% a 99%, enquanto na forma líquida esta concentração está na ordem de 49% (Trikem, 2002).

O hidróxido de sódio não tem absorção sistêmica, os efeitos ou complicações sistêmicas são decorrentes de sua ação direta nos tecidos de contato. Também não tem poder carcinogênico direto, estando o surgimento de carcinoma relacionado com o grau de destruição tecidual e o grau de formação de estenoses (Brito Filho, 1988).

No processo fisiopatológico da ação do NaOH sobre os tecidos, há uma relação direta entre o tempo de exposição, a concentração do agente e o seu pH. Outros fatores incluem o tipo de agente agressor, a apresentação (sólida ou líquida), o volume de ingestão e a viscosidade do agente alcalino (Ellenhorn, 1997). Quantidades menores, em concentrações mais baixas, resultam em menor lesão da mucosa (Rothstein, 1986; Dantas & Mamede, 1996).

Estudos experimentais permitiram evidenciar três fases nas lesões causadas por álcalis:

- Fase 1, inicia-se com a lesão e perdura até o quinto dia, quando ocorre a destruição dos tecidos por necrose de liquefação, trombose vascular, invasão de bactérias e leucócitos;
- Fase 2, ou reparadora, estende-se do quinto dia até o final da segunda semana, e se caracteriza pela formação de tecido de granulação e início da deposição do colágeno. Este processo de deposição do colágeno persiste até vários meses após o contato com o agente agressor, ou seja, até o final da fase 3.
- Fase 3, também chamada de fase de cicatrização, começa no final da segunda semana e, pela deposição de colágeno, pode levar à estenose e encurtamento do esôfago (Corsi et al., 2000). A ocorrência da estenose fica na dependência da profundidade, extensão e acometimento circunferencial da lesão corrosiva.

A estenose de esôfago é uma complicação frequente da cicatrização após a lesão cáustica, ocorrendo em 20% dos pacientes. A estenose ocorre como consequência da substituição do tecido normal por tecido conjuntivo denso, que apresenta

propriedades físicas diversas, provocando a disfunção do órgão (Moura et al., 2005).

A dilatação endoscópica constitui-se no tratamento primário das estenoses cáusticas de esôfago. Contudo, estas tendem a ser multissegmentares, rígidas, tortuosas, extensas e, portanto, mais difíceis de dilatar endoscopicamente, sendo mais susceptíveis à perfuração esofágica, com maior taxa de recorrência e com menores índices de alta do tratamento endoscópico, se comparadas às estenoses de outras etiologias (Broor, 1996; Poddar, 2001; Ferreira, 2003). Sabe-se, ainda, que cada sessão de dilatação atenua a disfagia com a melhora do calibre do esôfago, mas não previne a re-estenose, pois com a ruptura do anel fibrótico forma-se uma área cruenta que irá cicatrizar pela síntese e deposição de nova proteína fibrosa.

Diante desta limitação da terapia dilatadora, passou-se a procurar maneiras de atuar no processo de cicatrização, que compreende três etapas: síntese, deposição e remodelação do colágeno. Deste modo, se a síntese do colágeno e sua deposição puderem ser prevenidas ou se as propriedades físicas do produto final puderem ser controladas, a estenose estará, em teoria, resolvida.

Com o objetivo de atenuar a re-estenose pós dilatação, os corticosteróides foram as primeiras substâncias a serem testadas: o acetato de hidrocortisona ou triamcinolona (Ashcraft & Holder, 1969), a prednisolona (Anderson, 1990), a dexametasona (Cadranel, 1993), e a betametasona (Gallardo, 1995). Atualmente, o acetato de triamcinolona, um corticosteróide análogo sintético com marcada ação antiinflamatória tem sido a substância mais comumente utilizada devido ao seu efeito farmacológico na

inibição da síntese do colágeno e no aumento da sua quebra. Porém, seu efeito é apenas temporário (Lee, 1995) e parcialmente efetivo, o que tem motivado a investigação experimental, por parte de vários autores, de outras substâncias também capazes de prevenir a estenose esofágica. Inúmeras substâncias já foram testadas experimentalmente, dentre elas a penicilamina (Gehanno, 1981), o estradiol e a progesterona (Demirbilek, 1994), a N-acetilcisteína (Liu, 1985), a heparina (Bingol-Kologlu, 1999), o fenilester de ácido caféico e o fator de crescimento da epiderme (Koltuksuz, 2001), a pentoxifilina e o interferon alfa (Apaydin, 2001), a vitamina E (Gunel, 2002), a halofuginona (Oscelik, 2004; Arbell, 2005), o cetotifeno (Yukselen, 2004), a esfingosilfosforilcolina (Yagmurlu, 2004), o sucralfato (Temir, 2005), o iloprost – análogo da prostaciclina (Ekingen, 2005), a melatonina (Larios-Arceo, 2008), o omeprazol (Topaloglu, 2008), a eritropoítina (Bakan, 2010), o ibuprofeno (Herek, 2010) e até mesmo o uso da oxigenioterapia hiperbárica (Kiyani, 2004). Todas elas mostraram, experimentalmente, ser capazes de prevenir a estenose esofágica em graus diferentes, porém não alcançaram aplicação clínica devido às suas limitações de uso em humanos.

A mitomicina C é um agente antineoplásico, extraído do *Streptomyces caespitosus*, que interfere no estágio G2 da síntese do RNA, inibindo a síntese protéica e a proliferação de fibroblastos. Estas propriedades despertaram o interesse dos pesquisadores para seu uso em procedimentos nos quais o processo cicatricial intenso poderia prejudicar o tratamento.

Em 1967, Kunitomo e Mori relataram pela primeira vez o uso da mitomicina C (MMC), uma droga quimioterápica, em cirurgias oftalmológicas para o tratamento do pterígio, como modulador

do processo de cicatrização. Chen, em 1990, descreveu seu uso para prevenir re-estenoses em cirurgias de glaucoma, sendo este uso consagrado por vários outros autores (Kitazawa et al., 1991; Hong et al., 1993; Mietz et al., 1994) e amplamente utilizado pelos oftalmologistas nos dias de hoje. Vem sendo empregada também nas cirurgias de estrabismo e de estenose de canal lacrimal (Cruz, 1996; Lam et al., 1993; Maluf et al., 2002).

Em 1998, Ward et al. publicaram um artigo relatando o sucesso obtido com o uso da MMC em pacientes pediátricos com estenoses traqueais refratárias às dilatações. Após esta descrição, alguns autores testaram o uso da MMC em modelos animais (Eliashar, 1999; Correa, 1999; Coppit, 2000) e com os bons resultados obtidos, seu uso foi difundido no tratamento das estenoses subglóticas e laringotraqueais em humanos (Rahbar, 2001, 2002; Senders, 2004; Ubell, 2006).

A primeira descrição do uso da MMC na estenose cáustica de esôfago foi realizada por Afzal et al. (2002) quando foi relatado o caso de um paciente pediátrico com estenose cáustica refratária às dilatações endoscópicas, e que foi resolvida após 2 aplicações tópicas da MMC.

Em 2005, Turkyilmaz et al. publicaram trabalho experimental em ratos com lesão cáustica de esôfago induzida com NaOH10%, onde foi investigada a eficácia da MMC na prevenção da estenose cáustica de esôfago, aplicando-se a droga em duas concentrações diferentes, imediatamente após a indução da lesão no esôfago. Concluiu-se neste trabalho que a MMC foi eficaz na prevenção da estenose esofágica, porém seu uso logo a seguir à queimadura do esôfago nem sempre é possível na clínica diária, uma vez que muitos pacientes chegam tardiamente para o

tratamento, já com a estenose instalada e, por isso, não é possível transpor estes resultados para as situações em humanos, necessitando-se de mais investigações.

Outros trabalhos também relatam o uso da MMC nas estenoses cáusticas de esôfago em pacientes pediátricos, com excelentes resultados (Uhlen, 2005, 2006; Olotoye, 2006), incluindo os autores desta revisão (Ortolan et al., 2008).

Apesar da MMC já ter sido utilizada em humanos nos casos graves refratários às dilatações, seu uso ainda necessita de padronização, principalmente quanto ao melhor momento para sua aplicação, e se deve ser aplicada associada ou não à dilatação esofágica.

Artigo Original

Análise histopatológica e ultraestrutural do esôfago distal de ratos com lesão cáustica submetidos à aplicação tópica de Mitomicina C

Análise histopatológica e ultraestrutural do esôfago distal de ratos com lesão cáustica submetidos à aplicação tópica de mitomicina C

Histopathological and ultrastructural analysis of rats distal esophagus with caustic injury treated with topic mitomycin C

Resumo

A ingestão acidental de substâncias cáusticas constitui um grave problema de saúde pública, ocorrendo principalmente na faixa etária pediátrica, sendo a estenose do esôfago uma complicação frequente. A dilatação esofágica é o tratamento de escolha para estes casos. Várias substâncias já foram testadas nos casos refratários à dilatação, porém com resultados insatisfatórios. A mitomicina C, agente quimioterápico capaz de inibir a síntese protéica e a proliferação de fibroblastos, tem sido usada com sucesso em estenoses esofágicas refratárias às dilatações. No entanto, há poucos estudos experimentais descrevendo como a mitomicina C interage com o tecido lesado e qual o melhor momento para o seu uso após a lesão cáustica.

Objetivo: Avaliar os efeitos do uso tópico da mitomicina C, associada ou não à dilatação esofágica, aplicada em diferentes momentos após a lesão cáustica do esôfago de ratos com soda cáustica (NAOH 10%). Para efeito de comparação, utilizou-se ratos nos quais se infundiu solução salina (SF0,9%) no esôfago.

Método: Quarenta e oito ratos foram divididos em 6 grupos com 8 ratos cada: grupo manipulado ou *sham* (Gs), grupo controle (Gc), grupo com lesão cáustica e não tratado (Gnt), grupo com lesão cáustica e aplicação de mitomicina C (MMC) logo após a lesão (GmmcD0), grupo com lesão cáustica e aplicação de MMC 14 dias após a lesão (GmmcD14) e grupo com lesão cáustica seguido de dilatação e aplicação de MMC 14 dias após a lesão (Gdil+mmcD14). A lesão cáustica foi produzida seguindo o modelo descrito por Gehanno & Guedon modificado pelo nosso grupo de pesquisa, com NaOH10%. Em 4 momentos de avaliação (7º, 14º, 21º, e 28º dias de pós operatório - PO), todos os animais foram pesados. No 7º e 21º dias de PO, 4 ratos de cada grupo foram submetidos ao exame contrastado de esôfago. No 28º dia de PO, todos os ratos foram sacrificados e os espécimes esofágicos foram encaminhados para análise morfológica e histopatológica, além da análise ultraestrutural pela microscopia eletrônica de varredura.

Resultados: Os esofagogramas mostraram ausência de estenose nos ratos do Gs, uma leve estenose com alteração da motilidade nos animais do Gc, e estenose total nos ratos dos Gnt e GmmcD0, com evolução para estenose parcial nos ratos do GmmcD0 e manutenção da estenose nos ratos do Gnt. Nos ratos do GmmcD14, 2 animais com estenose parcial mostraram melhora, enquanto os outros 2 mantiveram a estenose total. Nos ratos do Gdil+mmcD14, 2 dos 4 animais com estenose total progrediram para estenose parcial. Na análise histopatológica, os animais dos Gs e Gc não mostraram nenhum dano

histopatológico. Nos Gnt e GmmcD14 o dano foi intermediário enquanto nos GmmcD0 e Gdil+mmcD14 o dano histopatológico foi intenso. Na análise morfológica, não houve diferença na área preenchida por colágeno na submucosa dos animais nos diferentes momentos quando comparado aos ratos do Gc. A análise ultraestrutural mostrou esôfago normal nos Gs e Gc. No Gnt observou-se uma retração intensa da parede esofágica, assim como no Gdil+mmcD14, no qual a dilatação parece ter exercido uma maior dano tecidual. Os GmmcD0 e GmmcD14 mostraram uma melhora do padrão de retração, evidenciado pela presença de fracas cicatrizes.

Conclusão: O uso da MMC teve efeitos benéficos principalmente quando aplicada logo após a lesão, enquanto a dilatação esofágica foi prejudicial ao esôfago.

Palavras-chave: ingestão de cáusticos, estenose de esôfago, soda cáustica, mitomicina C, dilatação esofágica.

Abstract

Background: The accidental ingestion of caustic substances is an important problem of public health, occurring mainly in childhood. The esophageal stricture is a frequent complication and esophageal dilation is the treatment of choice. Many agents have been tested when esophageal dilation is unsatisfactory, although with poor results. Mitomycin C, a chemotherapeutic agent that inhibits protein synthesis and the proliferation of fibroblasts, has been used successfully in cases of esophageal stricture that are refractory to dilation. However, there are few experimental studies describing how this substance interacts with damaged tissue and the best time window for its use after caustic injury.

Objective: The purpose of this study was to evaluate the effects of the topical application of MMC in rats, with or without associated esophageal dilatation, at different moments after the induction of a caustic esophageal lesion by NaOH10%.

Methods: 48 Wistar rats were divided into 6 groups of 8 animals each: sham group (SG), control group (CG), injured group but not treated (NTG), injured group with mitomycin C application immediately after the caustic lesion (MMCD0G), injured group with MMC application 14 days after induction of caustic lesion (MMCD14G) and injured group with esophageal dilation and application 14 days after caustic lesion (MMCD14+DILG). The caustic injury was produced as described by Gehanno & Guedon, modified by our group, with NaOH10%.

There were 4 moments of evaluation: 7°, 14°, 21° and 28° days after caustic injury, when rats were weighted. At 7° and 21° days after injury, it was performed the esophagograms of 4 rats of each group. On day 28 after caustic injury, all animals were sacrificed, and morphological and histopathological analyses were performed on the esophageal specimens, besides the ultrastructural analysis using scanning electron microscopy.

Results: The contrast images of the esophagus showed no stricture in SG rats, mild stricture with impaired motility in CG animals, and total stricture in NTG and MMCD0G rats, progressing to partial stricture in MMCD0G rats. In MMCD14G rats, 2 animals with partial stricture showed improvement, while the other 2 animals maintained total stricture. In MMCD14+DILG rats, 2 out of 4 animals with total stricture progressed to partial stricture. By histopathological analysis, the animals in SG and CG did not show any histopathological damage. In NTG and MMCD14G, damage was intermediate, while there was considerable histopathological damage in the rats in groups MMCD0G and MMCD14+DILG. Morphological analysis showed no differences in the area filled by collagen in the submucosa at any time in any of the groups, when compared to CG rats. Ultrastructural analysis showed that the esophagus were normal in SG and CG. In NTG there was marked retraction of the esophageal wall, as in the MMCD14+DILG, where the dilation seemed to have damaged the tissue. Groups MMCD0 and MMCD14 showed an improvement in the retraction pattern, as evidenced by the presence of faint scars.

Conclusion: The use of MMC had beneficial effects when applied immediately after the induction of esophageal lesions.

Keywords: caustic ingestion, esophageal stricture, lye, mitomycin C, esophageal dilation

Introdução

A ingestão acidental de substâncias cáusticas constitui um grave problema de saúde pública, ocorrendo principalmente na faixa etária pediátrica, sendo a estenose do esôfago uma complicação frequente. A dilatação esofágica é o tratamento de escolha para estes casos. Várias substâncias já foram testadas nos casos refratários à dilatação, porém com resultados insatisfatórios. A mitomicina C (MMC), agente quimioterápico capaz de inibir a síntese protéica e a proliferação de fibroblastos, tem sido usada com sucesso em estenoses esofágicas refratárias às dilatações (Uhlen, 2005, 2006; Olotoye, 2006), incluindo o serviço de Endoscopia Digestiva Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (Ortolan et al., 2008).

Apesar destes bons resultados obtidos na prática clínica com o uso da MMC nas estenoses cáusticas de esôfago, existem poucos estudos experimentais (Turkyilmaz et al., 2005, 2009), e que ainda deixam lacunas que precisam ser respondidas, principalmente quanto ao melhor momento para sua aplicação. Por isso, sentimo-nos impulsionados a investigar, experimentalmente, seus efeitos nas diversas camadas da parede esofágica após a lesão cáustica induzida em períodos diferentes da cicatrização, analisando, através do estudo histopatológico e ultraestrutural, as fibras de colágeno neoformadas, de forma qualitativa e quantitativa.

Objetivo

Avaliar os efeitos do uso tópico da mitomicina C, associada ou não à dilatação esofágica, aplicada em diferentes momentos após a lesão cáustica do esôfago em ratos. Animais com e sem lesão cáustica esofágica induzida, com iguais períodos de seguimento e sem nenhum tipo de tratamento foram utilizados como controles.

Material e Método

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (protocolo 610/2007) e obteve apoio regular à pesquisa FAPESP (2007/55553-3). Foram utilizados 48 ratos da raça Wistar, machos, adultos, sadios ao exame clínico, pesando entre 250 e 450 gramas, com aproximadamente três meses de idade, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu – Unesp.

Os animais foram distribuídos por sorteio em seis grupos experimentais, com 8 animais cada:

- Grupo Manipulado ou *Sham* (**Gs**): submetidos à infusão de solução salina no esôfago distal, sem manipulação cirúrgica do mesmo;

- Grupo Controle (**Gc**): realizada a instilação de solução salina no esôfago distal, através de uma sonda de Levine, com manipulação cirúrgica do mesmo;

- Grupo não tratado (**Gnt**): submetidos à infusão de NaOH10% no esôfago distal, sem nenhum tipo de tratamento;

- Grupo MMC D0 (**GmmcD0**): a mitomicina C foi aplicada imediatamente após a instilação de NaOH10% no esôfago distal;

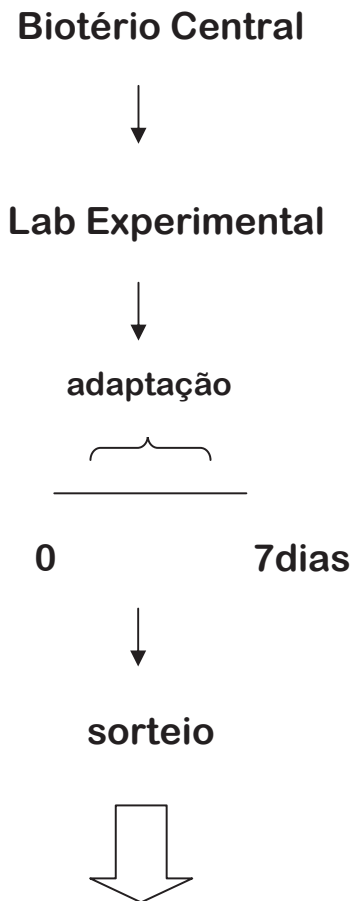
- Grupo MMC D14 (**GmmcD14**): submetidos à aplicação da MMC 14 dias após a lesão cáustica do esôfago com NaOH 10%;

- Grupo Dilatação + MMC D14 (**Gdil+mmcD14**): a dilatação esofágica e a aplicação da MMC foram realizadas 14 dias após a lesão cáustica do esôfago.

Os animais que evoluíram para o óbito foram repostos, de forma que cada grupo terminou o experimento com 8 animais .

Foram analisados parâmetros relacionados à lesão cáustica do esôfago (peso corporal, taxa de mortalidade e estudo radiológico contrastado do esôfago) e ao arranjo estrutural do tecido esofágico lesado (análise histopatológica com o cálculo do índice de estenose e análise ultraestrutural à microscopia eletrônica de varredura).

Oriundos do Biotério Central da Unesp, os animais foram inicialmente acomodados no Laboratório de Cirurgia Experimental em caixas de poliuretano, em grupos de 4 animais por caixa, sendo oferecidas ração e água *ad libitum*, onde passaram por um período de adaptação de 7 dias, quando foram tratados profilaticamente, por três dias, de verminoses, com mebendazol (25mg/kg de peso/dia), adicionado à água de beber. Terminado o período de adaptação, os animais foram sorteados em seis grupos experimentais conforme descrito anteriormente (Figura 1).



Definição dos grupos:

Grupo *sham* (Gs)

Grupo controle (Gc)

Grupo não tratado (Gnt)

Grupo MMC D0 (GmmcD0)

Grupo MMC D14 (GmmcD14)

Grupo dilatação + MMC D14 (Gdil+mmcD14)

Figura 1. Sequência inicial dos procedimentos executados com os animais.

Em 4 momentos de avaliação, 7º, 14º, 21º, e 28º dias de pós operatório, todos os animais foram pesados. No 7º e 21º dias de pós operatório, 4 ratos de cada grupo foram submetidos ao exame contrastado de esôfago. Todos os animais de todos os grupos foram sacrificados por punção cardíaca no 28º dia após a infusão de solução salina ou indução da lesão esofágica com NaOH10% e fragmentos do esôfago foram retirados e divididos em dois cortes transversais, sendo um encaminhado para o estudo à microscopia eletrônica de varredura e o outro para avaliação histopatológica.

Para o procedimento de indução da lesão cáustica, os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina e xilasina, ambos na dose de 100mg/Kg de peso corporal por via intraperitoneal. Para o sacrifício dos animais foi realizada a anestesia dos mesmos e administrado KCl 19,1% através de punção cardíaca.

A lesão cáustica do esôfago foi produzida segundo o modelo descrito por Gehanno & Guedon (1981) modificado pelo nosso grupo de pesquisa (Figuras 2, 3, 4 e 5).

Após jejum alimentar de 12 horas, todos os animais foram submetidos a laparotomia mediana, com dissecação de um segmento de 1,5 cm de esôfago abdominal, o qual foi isolado. Uma sonda de Levine número 10, introduzida pela boca do animal, foi progredida até o esôfago abdominal dissecado. Um fio de algodão 2.0 foi amarrado em torno da junção esofagogástrica, para prevenir que a substância alcalina extravasasse para o estômago. Um outro fio de algodão 2.0 foi amarrado em torno do esôfago, logo abaixo do diafragma, de modo a prevenir o extravasamento da substância corrosiva para o restante do esôfago e também a sua aspiração para o sistema respiratório. Desta forma, isolou-se

um segmento de esôfago abdominal de aproximadamente 1,5 a 2,0 cm de comprimento.

Pela sonda de Levine, foi injetado 0,2ml da solução de NaOH 10%, a qual permaneceu em contato com a parede esofágica durante 3 minutos, como preconizado pelo modelo de Gehanno & Guedon. Em seguida, a solução cáustica foi aspirada e o segmento esofágico lesado foi lavado com água destilada durante 1 minuto.

Os fios de algodão foram soltos, liberando o lúmen esofágico. A sonda de Levine foi retirada e a incisão da laparotomia suturada. Nos animais do GmmcD0, após a retirada da sonda de Levine, um cateter 4Fr duplo lúmen contendo algodão na sua extremidade distal foi passado pela boca do animal, e foi locado no segmento esofágico lesado. Injetou-se, então, no lúmen proximal do cateter 4Fr, 0,4ml de MMC 0,1mg/ml, quantidade suficiente para umedecer o algodão preso à extremidade distal do cateter (Figura 6). A MMC permaneceu em contato com a parede esofágica lesada por 2 min. Em seguida, o cateter 4Fr foi retirado e a incisão laparotômica suturada.



Figura 2: Frasco de soda cáustica

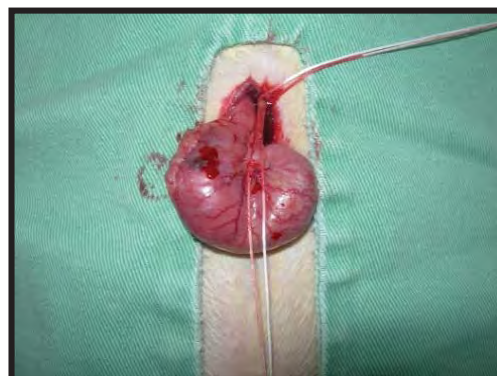


Figura 3: Esôfago distal isolado



Figura 4: Sonda de Levine contendo NaOH10%

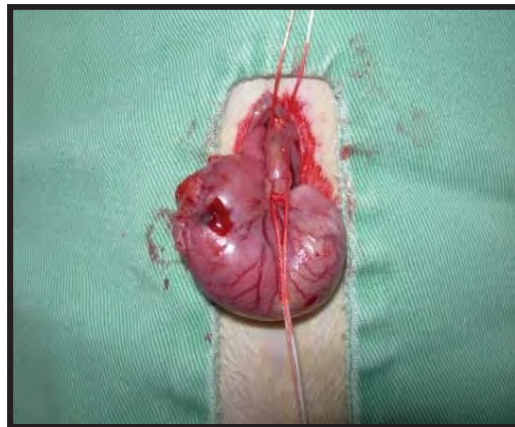


Figura 5: Esôfago distal isolado contendo NaOH10%

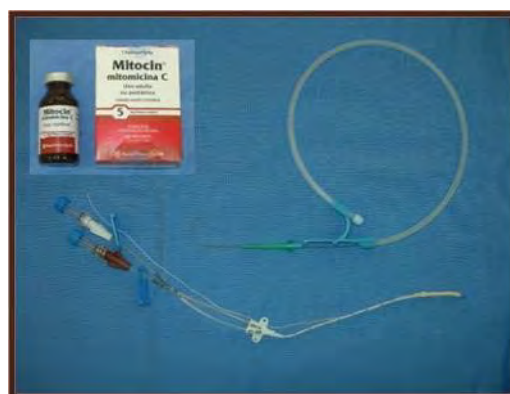
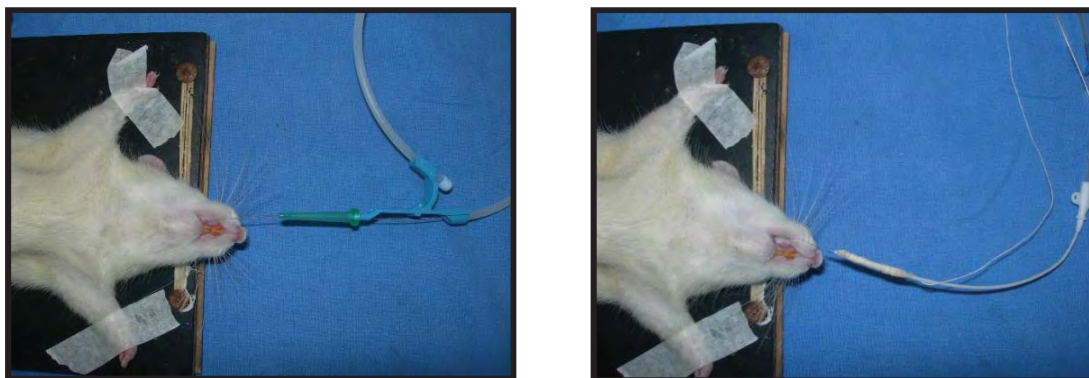


Figura 6: Fio guia e cateter de duplo lúmen 4Fr com algodão na extremidade distal contendo MMC

Os Após a cirurgia para lesão cáustica, os animais receberam 10ml de solução fisiológica administrada via intraperitoneal, e permaneceram em jejum por mais 24h. Após o 1º dia de pós-operatório, os animais foram alimentados *ad libitum*.

Nos animais do GmmcD14, a inserção do cateter 4Fr duplo lúmen contendo algodão na extremidade distal ocorreu 14 dias após a lesão cáustica induzida, e foi realizada sob escopia, após a passagem prévia de um fio guia pela boca dos ratos (Figuras 7 e 8). A umidificação do algodão com MMC e o tempo de contato da droga com a parede esofágica ocorreu da mesma forma descrita para o GmmcD0. Nos ratos do Gdil+mmcD14, antes da inserção do cateter duplo lúmen, foi realizada a dilatação esofágica com dilatador 5Fr, sob escopia, com auxílio do fio guia (Figuras 9, 10 e 11).



Figuras 7 e 8: Passagem do fio guia e inserção do cateter duplo lúmen 4Fr sobre o mesmo



Figura 9: Passagem do dilatador 5Fr sobre o fio guia



Figura 10 e 11: Aparelho de Raio X Phillips BV300 para realização das escopias

Na véspera dos sacrifícios, todos os animais foram submetidos a jejum de 12 horas com fornecimento de água *ad libitum*.

Para a análise histopatológica, foram retirados segmentos do esôfago distal, medindo aproximadamente 1,0 cm de comprimento. Estes segmentos foram preparados para a análise histopatológica, da seguinte forma:

- amostras de esôfago 1x1cm contendo a área queimada foram fixadas em formaldeído 10% e integradas à cera de parafina.
- quatro cortes, cada um com 4 μ m de espessura, foram corados com hematoxilina-eosina e coloração de tricromio de Masson.

Todas as amostras foram avaliadas por um único examinador, que desconhecia o grupo ao qual o animal pertencia, utilizando-se a microscopia óptica milimétrica.

A espessura da parede esofágica e o diâmetro do seu lúmen foram mensurados para o cálculo do Índice de Estenose (IE), seguindo a fórmula abaixo (Turkyilmaz et al., 2005).

$$\text{Índice de Estenose (IE)} = \text{Espessura parede} / \text{Lúmen esofágico}$$

A avaliação histopatológica foi realizada de acordo com o critério descrito por Demirbilek et al. (1994), com escore variando de 0 a 5 pontos (Tabela 1).

Tabela 1: Critério de avaliação histopatológica segundo Demirbilek et al. (1994)

Variáveis	Escore
Aumento de colágeno na submucosa	
Nenhum	0
Pouco (colágeno da submucosa \leq 2x a espessura da muscular da mucosa)	1
Significativo (colágeno da submucosa \geq 2x a espessura da muscular da mucosa)	2
Dano à muscular da mucosa	
Nenhum	0
Presente	1
Dano e deposição de colágeno na túnica muscular	
Nenhum	0
Pouco (depósito de colágeno ao redor das fibras musculares lisas)	1
Significativo (depósito de colágeno + substituição de algumas fibras musculares lisas)	2

Para a análise ultraestrutural, foram retirados segmentos do esôfago lesado, medindo aproximadamente 1,0 cm de comprimento. Estes segmentos foram inicialmente imersos em soro fisiológico, em seguida encaminhados para o preparo das amostras para análise à microscopia eletrônica de varredura, conforme a seguinte padronização:

- Amostras de esôfago 1x1cm contendo a área queimada foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato, pH 7,3, por um período de 7 a 15 dias;
- Digestão em NaOH 10% por 48 horas (tempo estabelecido após projeto piloto);
- Lavagem em água destilada (10 vezes de 10 minutos cada);
- Pós fixação em tetróxido de ósmio 0,5% em água destilada por 30 minutos;
- Desidratação em série crescente de etanol (7,5% a 100%);
- Secagem das peças em aparelho de ponto crítico Balzers CPD-020, utilizando o dióxido de carbono líquido;
- Montagem das amostras em suportes apropriados;
- Cobertura das amostras com 10nm de ouro em metalizador MED-010 da Balzers;
- Análise das amostras em microscópio eletrônico de varredura QUANTA 200 da Fei Company, sob tensão de 15 kv, em aumentos de 90 a 3000 vezes, cujas imagens foram digitalizadas por computador (processador Pentium-Pró, sistema Windows NT).

O tamanho amostral foi determinado utilizando-se valores da literatura do índice de estenose, considerando-se uma diferença mínima esperada entre as médias dos grupos em torno de 0,11 com desvio-padrão de 0,08 , ao nível de 5% de significância e poder do teste de 80%, ficando determinado em 8 animais por grupo.

Para as variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias foi utilizada a Análise de Variância, seguida do Método de TuKey, quando necessário; nos outros casos, foi utilizado o teste Não-Paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas. O nível de significância foi de 5%.

Resultados

1. Peso Corporal

A tabela 2 mostra a média e o desvio padrão dos pesos dos animais segundo grupos e momentos.

Tabela 2: Médias e desvios-padrão referentes ao peso dos animais segundo grupos e momentos

Grupo	Momento				
	D0	D7	D14	D21	D28
Gs	285±10,6b B	301,1±29,1b A	352,0±22,3a A	348,9±17,3a A	365,3±24,6a A
Gc	348,5±69 ^a A	308,5±61,7b A	333,4±55,8ab A	345,4±61,7a A	358,3±61,7a AB
Gnt	310,9±44,5bc B	304,5±39,6c A	339,5±41ab A	343,6±23,8a A	363,8±40,2a A
GmmcD0	306,1±26,4abc B	290,0±32,3c A	302,5±43,3b B	330,8±39,2ab AB	342,9±32,7a BC
GmmcD14	297,6±17,3ab B	296,3±16,7ab A	289,8±28,1b B	307,1±26,3ab B	320,3±22,3a C
Gdil+ mmcD14	291,8±25,7ab B	283,6±35,3b A	299,1±45,2ab B	307,5±35,3ab B	315,4±32,8a C

P=0,14 para grupos, p<0,0001 para momentos e para a interação momentos x grupos

Letras minúsculas comparam médias de momentos em cada grupo.

Letras maiúsculas comparam médias de grupos em cada momento.

Não houve diferença significativa entre as variações de peso entre os grupos *sham* (Gs), controle (Gc) e grupo não tratado (Gnt) em todos os momentos estudados. Os grupos GmmcD0 e GmmcD14 não tiveram diferenças em relação aos Gs, Gc e Gnt no D7, mas apresentaram valores menores no D14, com tendência à recuperação nos D21 e D28. O grupo Gdil+mmcD14 não

apresentou diferenças no D7 em relação aos demais grupos, com valores menores nos D14 e D21, tendendo a recuperação no D28, mas com valores ainda menores que os demais grupos. Ao serem analisados os valores dos pesos entre os momentos de um mesmo grupo, observou-se que em todos os grupos houve recuperação do peso inicial, no momento final (D28).

2. Taxa de mortalidade

Os ratos dos grupos *sham* e controle permaneceram vivos até o D28. No entanto, nos grupos submetidos à infusão de soda cáustica, a mortalidade foi maior, como se observa na tabela 3.

Tabela 3: Número de óbitos e taxa de mortalidade dos diferentes grupos.

GRUPOS	Nº de óbitos	%
Gs	0	0
Gc	0	0
Gnt	3	6,25
GmmcD0	4	8,3
GmmcD14	3	6,25
Gdil+mmcD14	5	10,4

3. Estudo radiológico contrastado de esôfago

O estudo radiológico do esôfago foi realizado em dois momentos: 7º dia e 21º dias de pós-operatório em quatro animais por grupo. Nesse estudo observou-se que os ratos do Gs, que não sofreram nenhum tipo de procedimento cirúrgico, não apresentaram estenose esofágica, nem disfunção de motilidade. (Figuras 12 e 13). Já os ratos do grupo Gc submetidos à ligadura proximal do esôfago distal, apresentaram estenose leve no 7º PO e disfunção de motilidade (lentificação do clareamento esofágico) no 21º dia de PO (Figuras 14 e 15).

O Gnt que recebeu soda cáustica sem nenhum tipo de tratamento apresentou estenose grave já no primeiro momento, uma vez que o esôfago distal apresentava-se com menor diâmetro e não permitia a passagem do contraste para o estômago. A estenose se manteve, e em alguns casos até se agravou com o decorrer do tempo (Figuras 16 e 17).

No GmmcD0, que recebeu MMC no mesmo momento da lesão cáustica, todos os animais estavam com estenose total no 7º dia (Figura 18), com melhora da estenose, que se tornou parcial no 21º dia (Figura 19).

No GmmcD14, onde foi aplicada a MMC no 14º dia após a lesão cáustica, dos 4 animais estudados, 2 apresentaram estenose parcial no 7º dia (Figura 20), com melhora desta estenose no exame do 21º dia (figura 21). Os outros 2 animais que estavam com estenose total no primeiro exame, mantiveram-se assim no segundo contrastado.

No Gdil+mmcD14, onde foi aplicada a MMC após dilatação esofágica no 14º dia após a lesão cáustica, os 4 animais

apresentaram estenose total no primeiro exame (Figura 22). Desses, 2 evoluíram para estenose parcial (Figura 23), e 2 não apresentaram alterações em relação ao exame do 7º dia.

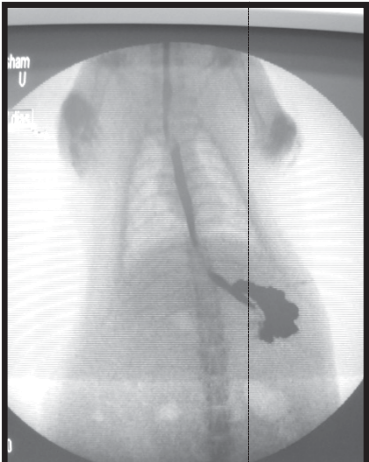


Figura 12 – Esofagograma animal Gs / D7

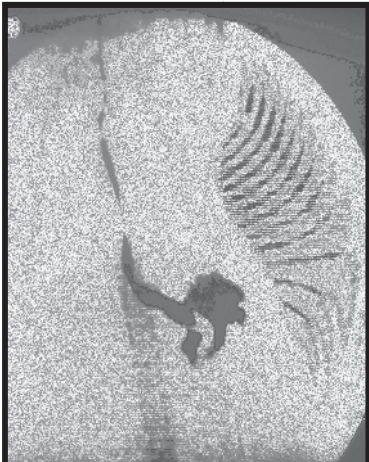


Figura 13– Esofagograma animal Gs / D21

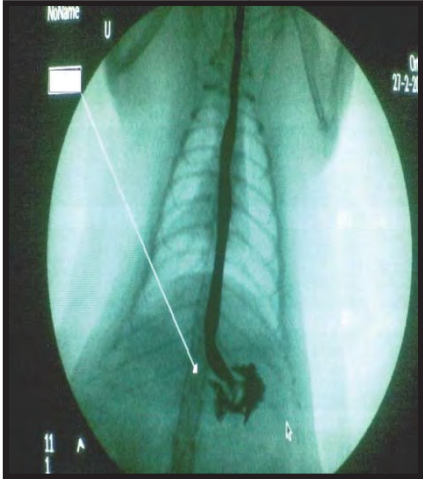


Figura 14 – Esofagograma animal Gc / D7

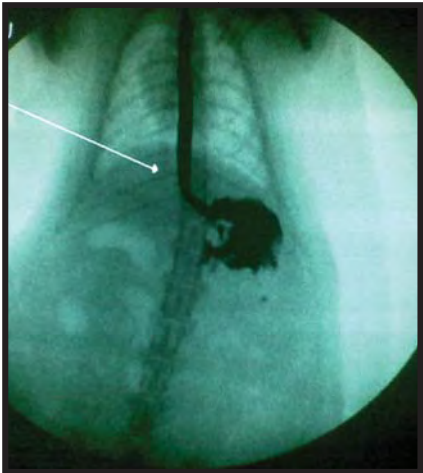


Figura 15 – Esofagograma animal Gc / D21

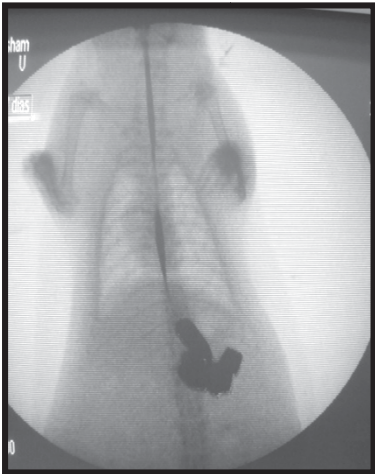


Figura 16 – Esofagograma animal Gnt / D7

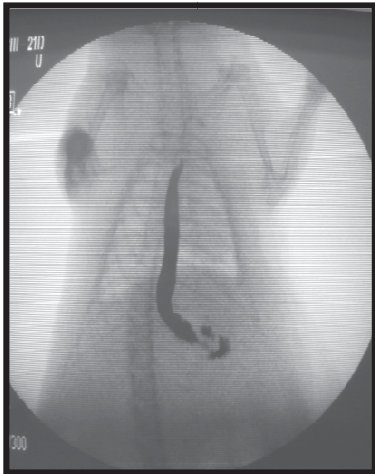


Figura 17 – Esofagograma animal Gnt / D21

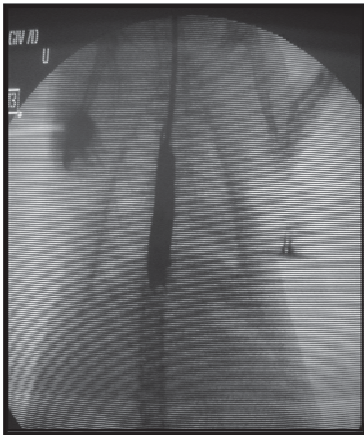


Figura 18 – Esófagograma animal GmmcD0 / D7

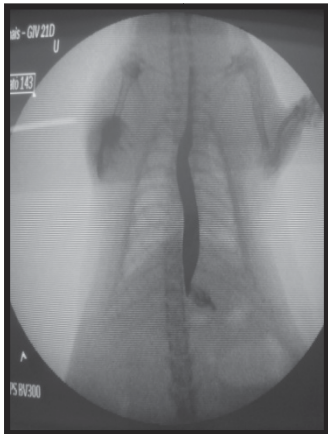


Figura 19 – Esófagograma animal GmmcD0 / D21

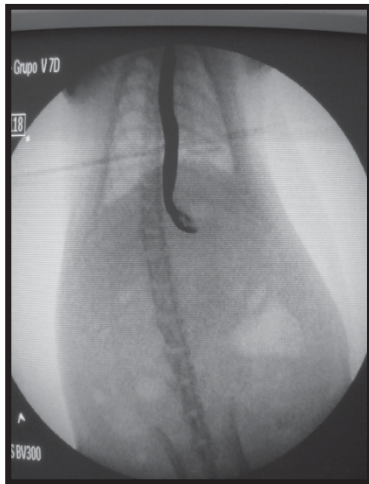


Figura 20 – Esófagograma animal GmmcD14 / D7

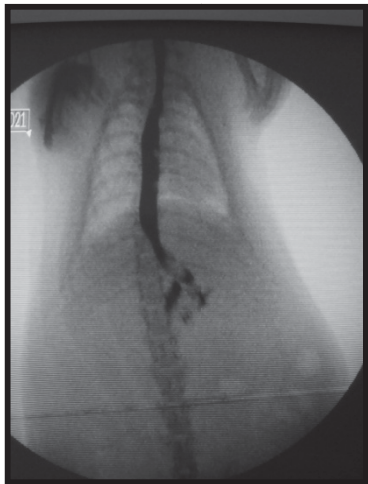


Figura 21 – Esófagograma animal GmmcD14 / D21

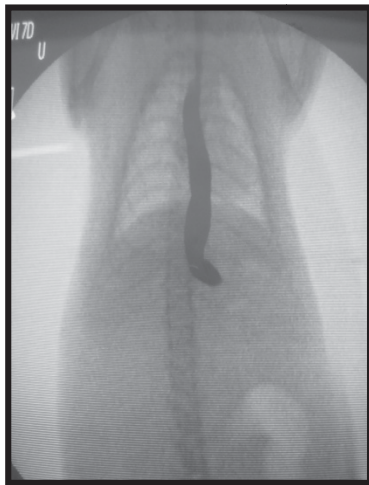


Figura 22 – Esófagograma animal Gdil+mmcD14 / D7

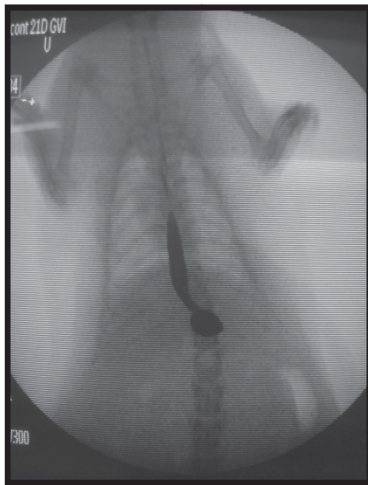


Figura 23 – Esófagograma animal Gdil+mmcD14 / D21

4. Análise histopatológica

A análise histopatológica foi realizada de acordo com os seguintes critérios: aumento do colágeno na submucosa, dano à muscular da mucosa e dano e deposição de colágeno na túnica muscular segundo critérios descrito por Demirbilek et al (1994). Para cada critério foi dado uma pontuação diferente, com o escore total variando de zero a cinco, sendo possível determinar o dano histopatológico do esôfago nos diferentes grupos de estudo: nenhum dano (resultado igual a zero); dano intermediário (1+) e dano intenso (2+).

Ao avaliar os critérios de Demirbilek isoladamente, notamos que houve um intenso aumento de colágeno na submucosa dos ratos do Gdil+mmcD14, seguido em menor intensidade pelos ratos dos GmmcD14 e GmmcD0. Os ratos do Gc não apresentaram modificações na submucosa (Figura 24).

Ao avaliar-se somente o dano à muscular da mucosa, os ratos dos Gs e Gc não apresentaram nenhum dano. Já os ratos do Gnt e Gdil+mmcD14 apresentaram resultados muito semelhantes, ambos com dano intenso da muscular, seguidos dos ratos dos GmmcD0 e GmmcD14, nos quais a lesão da muscular foi intermediária (Figura 25).

Na avaliação do dano e deposição de colágeno na túnica muscular, mais uma vez os ratos dos Gs e Gc não demonstraram lesão. Os ratos dos GmmcD0 e Gdil+mmcD14 evidenciaram uma alteração intensa na túnica muscular, enquanto os ratos dos Gnt e GmmcD14 apresentaram dano leve (Figura 26).

A Figura 27 mostra a classificação total do dano segundo critério de Demirbilek, evidenciando uma lesão histopatológica

grave nos animais do Gdil+mmcD14, intermediária nos ratos do GmmcD0, leve nos animais dos Gnt e gmmcD14, e ausência de dano nos animais dos Gs e Gc.

Na Figura 28 (Gc) é possível observar as camadas da parede esofágica sem alterações histopatológicas. O mesmo não acontece nas Figuras 29 (Gnt), 30 (GmmcD0) e 31 (Gdil+mmcD14), onde se observa dano à muscular da mucosa e dano e deposição de colágeno na túnica muscular em diferentes proporções.

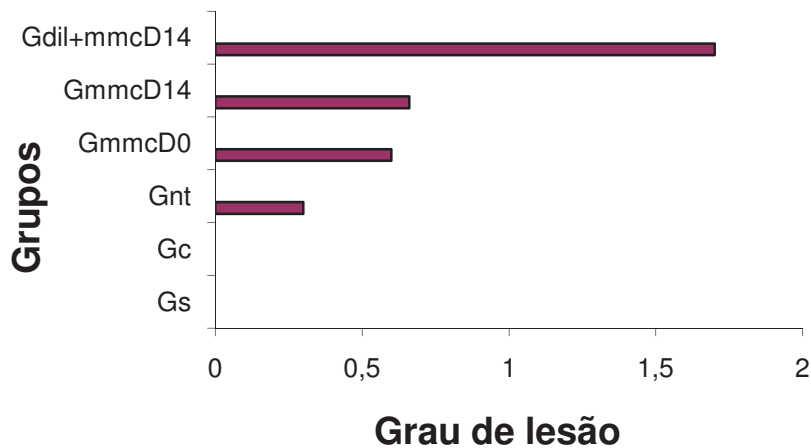


Figura 24: Gráfico da avaliação do aumento de colágeno na submucosa nos diferentes grupos de estudo

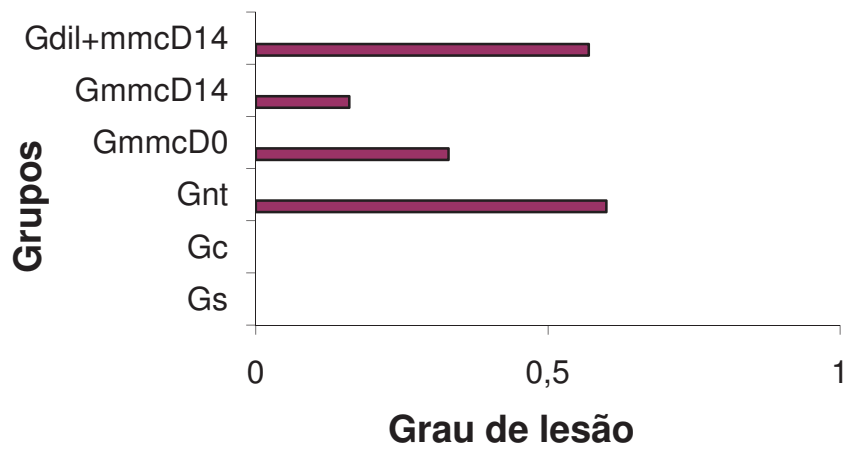


Figura 25: Gráfico da avaliação do dano à muscular da mucosa

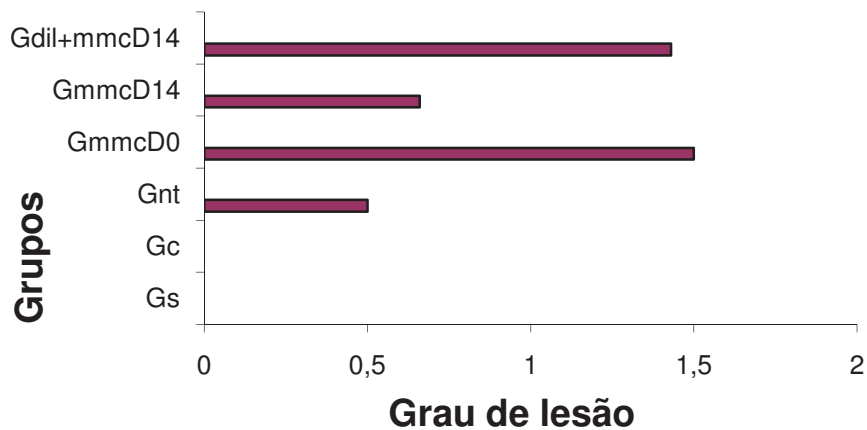


Figura 26: Gráfico da avaliação do dano e deposição de colágeno na túnica muscular

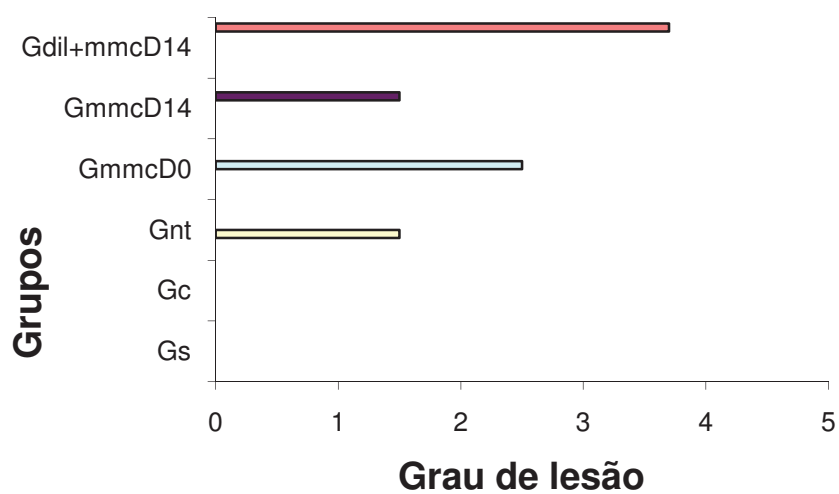


Figura 27: Gráfico da classificação total do dano segundo critério de Demirbileck et al.



Figura 28: Rato do Gc - ausência de alterações histopatológicas.



Figura 29: Rato do Gnt - observa-se o dano à muscular da mucosa com pouco aumento de colágeno na submucosa.



Figura 30: Rato do GmmcD0 - intenso dano à muscular da mucosa e significativo dano e deposição de colágeno na túnica muscular.

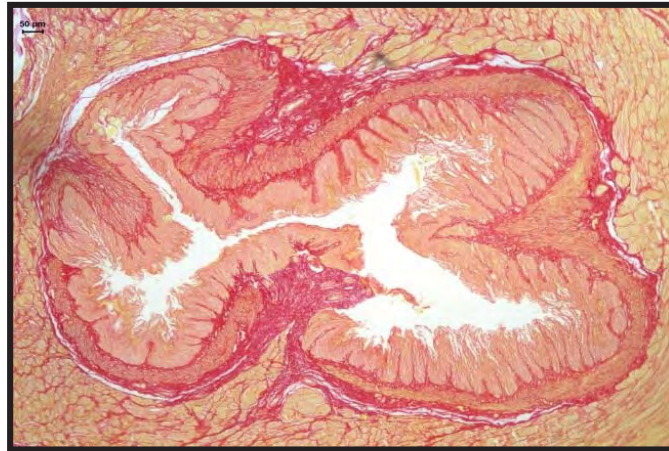


Figura 31: Rato do Gdil+mmcD14 - significativo aumento do colágeno na submucosa e na túnica muscular e intenso dano à muscular da mucosa.

5. Análise morfométrica e do índice de estenose

A análise morfométrica obtida por meio da medida da área ocupada pelo colágeno na submucosa do esôfago e os índices de estenose dos ratos foram aferidos e analisados nos seis diferentes grupos de estudo. Os dados e análises estatísticas destes grupos encontram-se representados na Tabela 4.

Não houve diferenças estatisticamente significativas tanto da área preenchida pelo colágeno na submucosa, quanto do índice de estenose, em nenhum momento, em nenhum dos grupos. No entanto, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, existiu tendência do Gnt de maior índice de estenose (Figura 32).

Na análise qualitativa, semelhante ao que ocorreu na aplicação do escore de lesão tecidual, nota-se, em relação aos animais do Gc (Figura 33), aumento da estenose nos animais do Gnt (Figura 34), com melhora da mesma nos animais dos GmmcD0 e GmmcD14 (Figura 35). Entretanto, há maior lesão muscular nos animais do Gdil+mmcD14 (Figura 36).

Tabela 4. Médias e desvios-padrão referentes à área (mm²) e ao IE segundo grupos

	Área		IE	
	Média	DP	Média	DP
Gc	13,79	2,73	13,98	14,66
Gs	14,28	2,95	3,78	4,67
Gnt	14,95	3,47	9,91	8,41
GmmcD0	13,80	1,62	4,93	6,42
GmmcD14	12,18	3,42	8,19	8,44
Gdil+mmcD14	14,77	2,32	5,92	8,43
Valor de p	0,53		0,29	

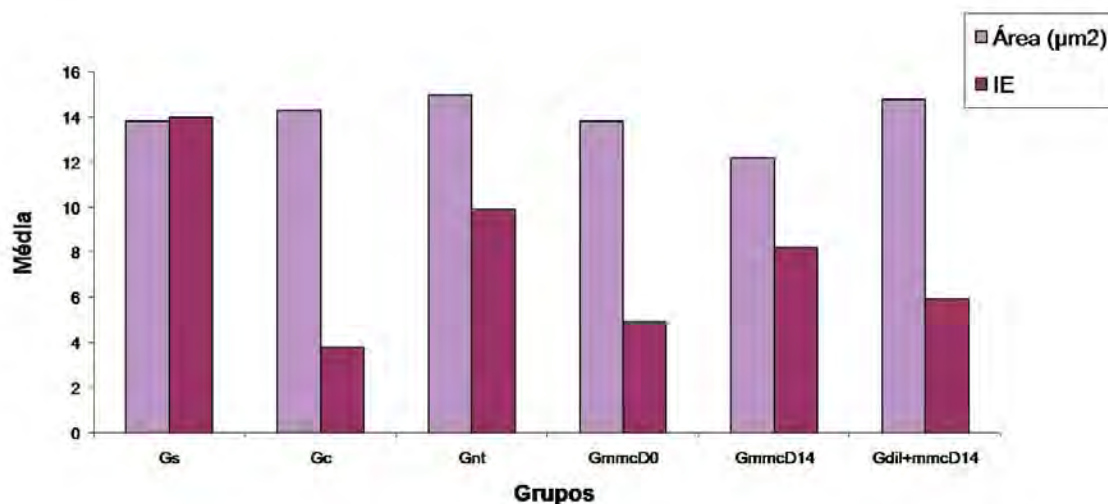


Figura 32: Comparação entre o índice de estenose e área preenchida por colágeno na submucosa nos diferentes grupos

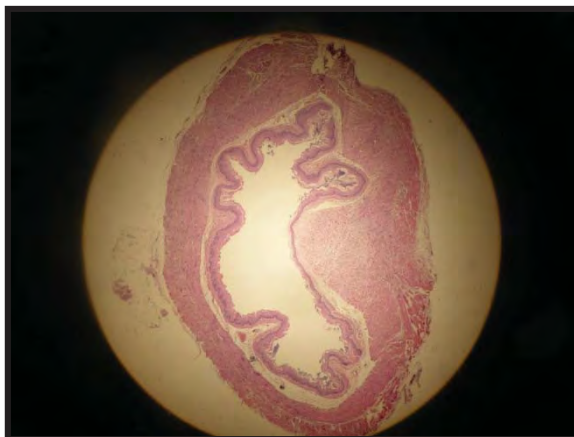


Figura 33: Lâmina do Gc - parede e lúmen esofágico sem alterações (aumento 4x).



Figura 34: Lâmina do Gnt - estenose intensa e aumento da espessura da camada muscular (aumento 4x).



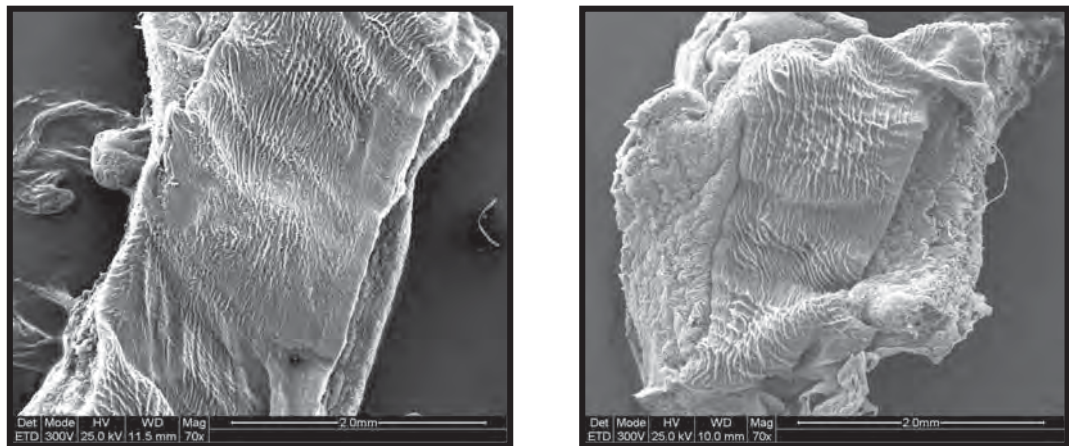
Figura 35: Lâmina do GmmcD14 - menor estenose quando comparada ao Gnt, em análise qualitativa (aumento 4x).



Figura 36: Lâmina do Gdil+mmcD14 - aumento do lúmen esofágico após dilatação, com grande dano à mucosa (aumento 4x).

6. Análise ultraestrutural

No menor aumento (70x), onde foi possível uma visão panorâmica do esôfago, observou-se que entre os Gs e Gc não houve diferenças, com padrões normais de distribuição de colágeno (Figura 37 e 38). No Gnt, nota-se acentuada retração da parede esofágica, o que indica intensa estenose (Figura 39). O mesmo aconteceu nos animais do grupo Gdil+mmmcD14, onde a dilatação exerceu efeito lesivo sobre o tecido (Figura 40). Nos grupos GmmcD0 e GmmcD14, houve grande melhora do padrão da retração, com presença de cicatrizes tênues (Figuras 41 e 42).



Figuras 37 e 38: Microscopia eletrônica de varredura (aumento 70 x) de rato do Gs e Gc - esôfago dentro dos padrões de normalidade.

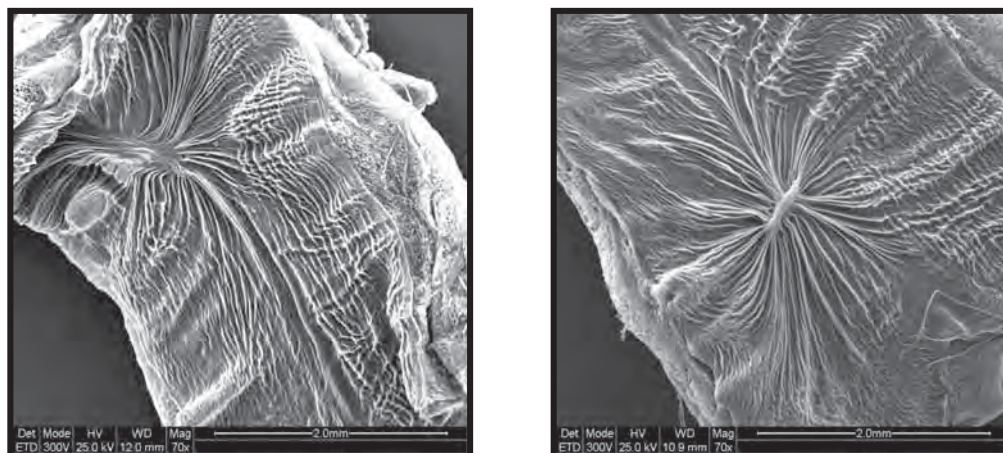
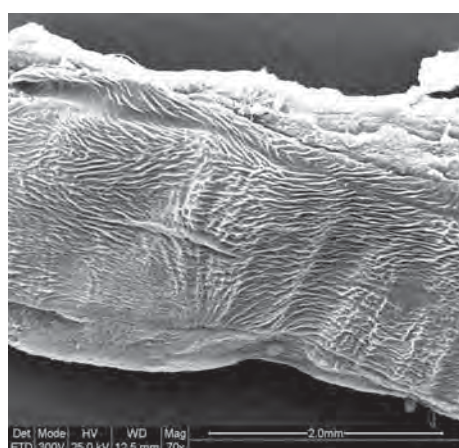


Figura 39 e 40: Microscopia eletrônica de varredura (aumento 70 x) de rato do Gnt e Gdil+mmcD0 - intensa retração esofágica.



Figuras 41 e 42: Microscopia eletrônica de varredura (aumento 70 x) de rato do GmmcD0 e do GmmcD14 - observa-se melhora da retração e cicatrizes tênues.

ERROR: stackunderflow
OFFENDING COMMAND: ~

STACK: