

A BIOMICROSCOPIA ULTRASSÔNICA ENDOLUMINAL ASSOCIADA COM A ENDOSCOPIA CONVENCIONAL NA DETECÇÃO DO TUMOR ESOFÁGICO EM RATOS. ESTUDO MULTICÊNTRICO

ENDOLUMINAL ULTRASONIC BIOMICROSCOPY ASSOCIATED WITH CONVENTIONAL ENDOSCOPY IN THE DETECTION OF ESOPHAGEAL TUMOR IN RATS. MULTICENTRIC STUDY

Marcel Vasconcellos, Liara Carolina Archanjo Rocha, Amanda Gonçalves de Faria, Natan Amaral de Souza, Flora Maria Costa de Carvalho, Ana Luísa Barroso Ouverney, Camila Fernandes de Araújo Santos, Fernanda Rodrigues Dias, Valéria Cristina Lopes Marques, João Carlos Machado

RESUMO

Introdução: O Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima para o triênio 2023–2025, o surgimento de 11.000 novos casos/ano de câncer esofágico. Segundo o INCA, a taxa de sobrevivência global em 5 anos é de apenas 20%, e na maioria dos pacientes a doença é assintomática em seus estágios iniciais. Portanto, para um tratamento eficaz torna-se crucial o diagnóstico precoce. A endoscopia convencional, considerada padrão ouro, apresenta falhas na detecção precoce do câncer esofágico, haja vista a distribuição esparsa das lesões neoplásicas e suas discretas alterações macroscópicas. Apesar dos avanços alcançados com as técnicas diagnósticas de câncer de esôfago, há espaço para o aprimoramento e desenvolvimento de tecnologias/procedimentos e quanto a isso, os modelos animais são importantes na realização de testes iniciais. **Objetivos:** Detectar tumor esofágico em ratos (*Rattus norvegicus*) por imagens de biomicroscopia ultrassônica endoluminal (BMUe) associada com a endoscopia convencional. **Métodos:** Serão estabelecidos dois modelos de tumor esofágico. O primeiro baseia-se na inoculação de uma suspensão contendo 106 células/ml do tumor de Walker-256 na camada muscular esofágica e um segundo na indução cirúrgica da doença do refluxo gastroesofágico (DRGE). **Resultados:** O estudo piloto obteve êxito em mimetizar cirurgicamente a DRGE em seis ratos, no entanto, observou-se falha na indução tumoral, associada à baixa viabilidade celular da amostra. **Conclusões preliminares:** Devido à falha na replicagem do tumor, com uso da suspensão criopreservada obtida a partir de um fragmento sólido, optou-se pela aquisição da cultura LLC WRC-256, fornecida pela American Type Culture Collection (ATCC). Quanto ao estudo piloto de indução da DRGE, este mostrou ser viável, mas, devido à alta mortalidade (33%), optou-se no estudo definitivo por uma ressecção de menor extensão da camada muscular esofágica.

Palavras-chave: Neoplasias esofágicas; Ultrassom; Diagnóstico por Imagem; Ratos Wistar.

ABSTRACT

Background: The National Cancer Institute (INCA) estimates for the three-year period 2023–2025, the emergence of 11,000 new cases/year of esophageal cancer. According to INCA, the 5-year overall survival rate is only 20%, and in most patients the disease is asymptomatic in its early stages. Therefore, for effective treatment, early diagnosis is crucial. Conventional endoscopy, considered the gold standard, presents flaws in the early detection of esophageal cancer, given the sparse distribution of neoplastic lesions and their discrete macroscopic changes. Despite the advances achieved with diagnostic techniques for esophageal cancer, there is room for improvement and development of technologies/procedures and in this regard, animal models are study was successful in surgically mimicking GERD in six rats, however, failure in tumor induction important in carrying out initial tests. **Aims:** Detect esophageal tumor in rats (*Rattus norvegicus*) using endoluminal ultrasonic biomicroscopy (eUBM) images associated with conventional endoscopy. **Methods:** Two esophageal tumor models will be established. The first is based on the inoculation of a suspension containing 106 cells/ml of the Walker-256 tumor in the esophageal muscular layer and a second on the surgical induction of gastroesophageal reflux disease (GERD). **Results:** The pilot was observed, associated with the low cell viability of

the sample. **Preliminary conclusions:** Due to failure in tumor subculture using the cryopreserved suspension obtained from a solid fragment, we opted to acquire the LLC WRC-256 culture, supplied by the American Type Culture Collection (ATCC). Regarding the pilot study of GERD induction, this proved to be viable, but due to the high mortality rate (33%), we opted for a smaller resection of the esophageal muscle layer in the definitive study.

Keywords: *Esophageal neoplasms; Ultrasound; Imaging Diagnosis; Wistar Rats.*

INTRODUÇÃO

O Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima para cada ano do triênio 2023–2025, o surgimento de 11.000 novos casos de câncer esofágico. Segundo o INCA, a taxa de sobrevivência global em 5 anos é de apenas 20% e na maioria dos pacientes a doença é assintomática em seus estágios iniciais. Portanto, para um tratamento eficaz torna-se crucial o diagnóstico precoce, uma vez que a sobrevivência do paciente se relaciona ao grau de invasão tumoral. Em 96% dos casos diagnosticados, o tipo histológico prevalente é o carcinoma escamocelular, o qual se encontra entre os tipos mais agressivos de câncer e de pior prognóstico, seguido do adenocarcinoma esofágico (ADE), cuja incidência aumentou a partir da última década.¹

Embora a endoscopia convencional seja considerada padrão ouro, ela apresenta falhas na detecção precoce do câncer esofágico, haja vista a distribuição esparsa das lesões neoplásicas e suas discretas alterações macroscópicas². Desta forma, considerando-se que fatores clínicos e endoscópicos não apresentam sensibilidade e especificidade necessárias à estratificação de risco para o câncer esofágico, novos sistemas de imagem passaram a ser investigados, a exemplo da endoscopia com magnificação, cromoendoscopia digital (sistemas FICE®, iSCAN®, Narrow Band Image®), e endomicroscopia confocal a laser³.

Com relação ao emprego da ultrassonografia, Murata et al.⁴, aduziram, que embora a ultrassonografia endoscópica (UE) de alta frequência pudesse apresentar limitações quanto à precisão em detectar cânceres com invasão da camada submucosa, sua acurácia se mostrou satisfatória em determinar a profundidade da invasão neoplásica. Desta forma, os pesquisadores propugnaram a combinação de diagnósticos endoscópicos e ultrassonográficos no estadiamento do câncer esofágico⁴. Em 2012, Yoshinaga et al.⁵ relataram a elevada acurácia da UE, em 20 MHz, na determinação da profundidade de invasão maligna no câncer precoce de esôfago.

Apesar dos avanços alcançados com as técnicas diagnósticas de câncer de esôfago, há espaço para o aprimoramento e desenvolvimento de tecnologias/procedimentos e quanto a isso, os modelos animais são importantes na realização de testes iniciais. Mesmo considerando que nenhum modelo animal vislumbra a complexidade genética, biológica e molecular do câncer esofágico humano, avanços na ciência básica e translacional se fazem necessários.

Pretende-se, no presente projeto, estabelecer um modelo em ratos (*Rattus norvegicus*) de tumor esofágico. Dois modelos de carcinogênese esofágica serão abordados, um deles baseia-se na inoculação de uma solução contendo 106 células/ml do carcinosarcoma de Walker-256 na camada muscular esofágica e o outro na mimetização cirúrgica da doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), a qual participa dos complexos eventos fisiopatológicos da carcinogênese esofágica humana.

A primeira abordagem irá partir da obtenção de uma amostra do tumor de Walker-256 cedida pelo Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LOE) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Com isso, o desenvolvimento de um modelo murino de câncer esofágico torna-se factível, considerando que tumores espontâneos são extremamente raros nesta espécie. Já a segunda abordagem refere-se à mimetização da doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), etapa primária e essencial na fisiopatologia da doença.

O acompanhamento das alterações morfológicas do esôfago, associadas aos dois modelos propostos de carcinogênese esofágica, será realizado por meio de imagens de endoscopia e de BMUe, considerando-se a

experiência do grupo do Laboratório de Ultrassom (LUS) quanto ao desenvolvimento da instrumentação de BMUe como também na utilização dela, conjugada à endoscopia, para a aquisição de imagens do trato gastrointestinal de ratos (*Rattus norvegicus*) e camundongos (*Mus musculus*).

JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que a grande maioria dos pacientes com câncer esofágico procuram assistência médica em estágios avançados da doença, a validação de um sistema ultrassônico que produza imagens, em tempo real, com resoluções compatíveis com a da microscopia óptica panorâmica, como no caso da BMUe, permitirá ao médico endoscopista diagnosticar com maior precisão a doença, reduzindo o tempo para início do tratamento. Desta forma, é imperativo testar o potencial de diagnóstico da BMUe em modelos animais de carcinogênese esofágica para futuramente realizar-se um trabalho translacional para o emprego da técnica em humanos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em 2006, Buttar et al.⁶, utilizaram a ultrassonografia endoluminal para identificar a presença de tumor no esôfago de ratos submetidos a esofagojejunostomia. No entanto, o estudo apresentou limitações por não associar a endoscopia digestiva, o que impediu a visualização da mucosa esofágica. Ademais, o método aumentou o risco de broncoaspiração, e desse modo, os exames necessitaram ser realizados em tempo exíguo.

Mais recentemente em 2016, de Magalhães et al.⁷ classificaram e correlacionaram, com sucesso, a gravidade das lesões na esofagite cáustica com achados ultrassonográficos obtidos pelo uso combinado da endoscopia digestiva e o sistema de biomicroscopia ultrassônica endoluminal (BMUe) operando em 40 MHz. Nesse caso, a possibilidade de broncoaspiração durante o exame foi prevenida ao se intubar o animal. É oportuno relatar que o Laboratório de Ultrassom (LUS) do Programa de Engenharia Biomédica do Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE), possui grande experiência no uso da BMUe conjugada à endoscopia, tanto para a obtenção de imagens de esôfago como de cólon em ratos⁷⁻⁹. Em ambos os trabalhos, a conjugação da endoscopia com a BMUe mostrou-se crucial na obtenção das imagens.

Por sua vez, no tumor de Walker-256, é possível observar os três estágios da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão em um período de 12–16 dias. Ademais, o tumor apresenta comportamento biológico agressivo, é localmente invasivo e com alta capacidade metastática. Este tumor tem crescimento acelerado, causando caquexia e estresse oxidativo, e ainda apresenta elevada demanda metabólica, semelhante ao que ocorre em pacientes com câncer.¹⁰

Com base nos estudos de Gaia Filho et al.¹¹ e Castro Jr. et al.¹², optou-se pela técnica operatória da miectomia total associada a vagotomia troncular, a qual produz refluxo gastroduodeno-esofágico moderado¹³ e pode de reduzir a probabilidade de óbitos por broncoaspiração.

Histologicamente, o epitélio do esôfago no rato consiste em um epitélio escamoso estratificado queratinizado que se estende até o estômago anterior. Em *anima nobile*, o esôfago é revestido por epitélio escamoso estratificado não queratinizado que se estende até a junção gastroesofágica, onde se transforma em epitélio colunar. As alterações histológicas relatadas no esôfago distal de ratos após o refluxo cirurgicamente induzido são semelhantes às alterações observadas em humanos. Com exceção da hiperkeratose, o esôfago do rato passa a ter hiperplasia escamosa e hiperplasia das células basais com inflamação severa de toda a espessura da parede esofágica¹⁴.

Quando confrontado aos demais modelos de DRGE, a miectomia total traz a expectativa de menor morbimortalidade, considerando que aqueles que promovem o refluxo gástrico (por ligadura pilórica, constrição pilórica com ligadura pré-estomacal, cardioplastia de Wendel e anastomose esofagogástrica), refluxo misto (anastomose esofagogastroduodenal, esofagoduodenostomia ou esofagojejunostomia), refluxo duodenal

(anastomose esofagogastroduodenal com gastrectomia), refluxo de componentes químicos (refluxo bilioso, refluxo pancreático, perfusão esofágica), ou mesmo transplante do órgão, apresentam modificações anatômicas por demais acentuadas, principalmente por meio de anastomoses no sistema digestório, o que aumentam sobremaneira, a mortalidade pós-operatória.15-24

OBJETIVOS

Objetivo primário:

- Detectar tumor esofágico em ratos por imagens de biomicroscopia ultrassônica endoluminal (BMUe), associada com a endoscopia convencional.

Objetivos secundários:

- Proceder à manutenção do carcinossarcoma de Walker-256, cedido pelo Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará (UFC), por meio de sua criopreservação em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ e repicagem celular em tecido muscular *in vivo*;
- Induzir a geração de tumor de esôfago em ratos com o implante de 106 células/ml tumorais na camada muscular;
- Induzir a geração de tumor de esôfago em ratos através da mimetização DRGE, com base na técnica operatória da miectomia total associada a vagotomia troncular;
- Realizar um acompanhamento da evolução tumoral esofágica por meio de imagens de BMUe e de endoscopia adquirida *in vivo*;
- Comparar os achados nas imagens, com aqueles obtidos por exame histopatológico e imunohistoquímica das peças de esôfago.

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização da amostra e desenho do estudo experimental

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro Universitário Serra dos Órgãos (UNIFESO), sob o n.º de referência 525/2021 e encontra-se conforme a Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, bem como segundo os princípios adotados internacionalmente, sobre a utilização, manutenção e proteção de animais de laboratório.

Amostra

Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 60 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia *mammalia* — Berkenhaout, 1769), machos, com média de idade de três meses e peso de 300 ± 20 g, procedentes de criatório convencional de animais heterogênicos (Instalação de Ciência Animal do UNIFESO, Campus Quinta do Paraíso, Teresópolis-RJ).

Os animais serão mantidos em gaiolas, com lotação máxima de 4 animais/gaiola, iluminação em conformidade com o ciclo circadiano (12h claro/12h escuro), controle de temperatura ($22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), umidade ($50 \pm 5\%$), além de cuidados padronizados de higiene. A alimentação (Ração Nuvilab®) e água foram fornecidos *ad libitum*. O microambiente dos animais possui tubo para refúgio dos animais e maravalha autoclavada.

Desenho do estudo experimental

A randomização simples ocorrerá por meio do editor Excel (Microsoft Corporation®, Washington D.C., EUA), sendo formado cinco grupos:

Controle (GC, n = 12); sem procedimento cirúrgico. Aquisição de imagens *in vivo* e *ex vivo* esofágicas por BMUe e endoscopia digestiva, aos 10 (n = 6) e 20 dias (n = 6);

II) Simulação (GS, n = 12); simulação do procedimento cirúrgico de miectomia total, seguida da aquisição de imagens esofágicas por BMUe e endoscopia digestiva, após 10 (n = 6) e 20 dias (n = 6);

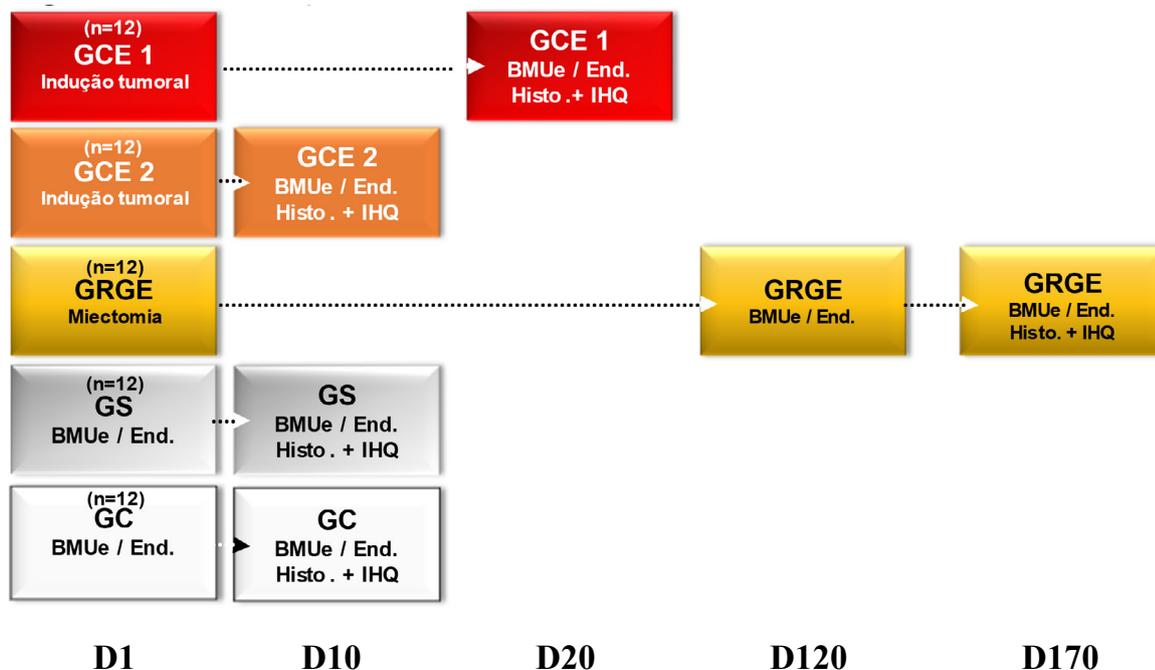
Refluxo Gastroesofágico (GRGE, n = 12); laparotomia mediana, seguida de secção das túnicas adventícia e muscular do esôfago distal, próximo à junção gastroesofágica, estendendo-se longitudinalmente por 1 cm (direção crânio-caudal). As túnicas submucosa e mucosa serão preservadas. O piloro será desnervado por meio de vagotomia troncular na curvatura menor do estômago. Após a cirurgia, os animais serão mantidos em jejum alimentar por 3 dias, seguida da administração de ração úmida. Aos 7 dias será fornecida ração comercial. Após 17 (n = 6) e 24 semanas (n = 6), serão obtidas imagens por BMUe e endoscopia digestiva;

Câncer Esofágico (GCE1, n = 12); mesmo procedimento anterior para secção das túnicas adventícia e muscular do esôfago distal. As túnicas submucosa e mucosa serão preservadas. Em seguida, será inoculada uma suspensão contendo 106 células do tumor de Walker-256 na camada muscular esofágica adjacente. Após a cirurgia, será iniciada uma dieta como proposto para o grupo RGE e 10 após dias serão obtidas imagens esofágicas por BMUe e endoscopia digestiva.

Câncer Esofágico (GCE2, n = 12); mesmo procedimento usado no grupo CE1, porém com as imagens obtidas após 20 dias.

A indução da doença esofágica será realizada na Instalação de Ciência Animal do UNIFESO (Centro Universitário Serra dos Órgãos, Teresópolis–RJ), e as imagens de BMUe e de endoscopia convencional adquiridas no Laboratório de Ultrassom (LUS) do Programa de Engenharia Biomédica (PEB/COPPE/UFRJ).

Figura 1. Linha temporal



GC= Grupo Controle; GS= Grupo Simulação; GRGE= Grupo Refluxo Gastroesofágico; GCE1= Grupo Câncer Esofágico 1; GCE2= Grupo Câncer Esofágico 2; Hist./IHQ= Histologia/Imunohistoquímica. BMue/End= Biomicroscopia Ultrassônica Endoluminal associada a Endoscopia Convencional. Fonte: Autores, 2023.

Técnica de cultivo celular e de suspensão contendo células tumorais

As células do tumor de Walker-256 serão cultivadas em meio de cultura Sigma 199 M4530® contendo 5% de soro de cavalo normal estéril e 1 ml de penicilina e estreptomicina. Frascos de cultura de 150 cm² serão usados para crescimento celular, e uma vez que > 90% de confluência for atingida, as células passam a ser separadas pela adição de 3,5 mL de tripsina a 1% (Sigma®). As células serão então centrifugadas (5 minutos a 1500 RPM) e depois ressuspensas em meio de cultura isento de soro. O número de células será calculado usando um hemocítômetro e então diluído, de modo que haja 10⁶ células/ml de suspensão.

Período estimado para o surgimento dos tumores esofágicos

Andreollo et al.¹⁴ aduziram que um dia de vida de um rato maduro sexualmente (± 3 meses) corresponde a cerca de 30 dias em *anima nobile*. Assim, o modelo visa mimetizar a progressão neoplásica em ratos Wistar em um lapso temporal máximo de 20 dias, equivalendo a dois anos no ser humano, período compatível com o quadro evolutivo insidioso da doença.

Com relação ao modelo baseado no refluxo gastroesofágico, Matsui et al.²⁵ estimaram que o esôfago de Barrett (EB) é observado 10 semanas após o início do refluxo. Já a displasia e o adenocarcinoma esofágico surgem a partir de 17 e 24 semanas, respectivamente.

Técnica operatória utilizada na miectomia total do esôfago distal com vagotomia troncular

Após cuidados de assepsia e antisepsia, o animal será anestesiado com a associação de 100 mg/kg de cloridrato de cetamina a 10% e 10 mg/kg de cloridrato de xilazina a 2% por via IP. Em seguida, posicionado em decúbito dorsal, procedendo-se à laparotomia mediana do processo xifoide até a topografia do umbigo, com ressecção da camada muscular esofágica, próximo à junção gastroesofágica, estendendo-se cranial e longitudinalmente por 1,5 cm.

Em seguida, as camadas adventícias e muscular serão dissecadas. O passo seguinte consistirá na síntese cirúrgica da parede abdominal e pele. Como analgesia preemptiva, administrar-se-á 1 mg/kg de cloridrato de tramadol (Tramal®) por via intramuscular, 30 minutos antes do procedimento.

Cuidados pós-operatórios e de suporte nutricionais

Como controle da dor pós-operatória será utilizado uma vez ao dia, cloridrato de tramadol (Tramal®) 1 mg/kg via IP, seguido da administração de Ibuprofeno (Alivium®) diluído na água de beber (30 mg/kg) durante 7 dias. Os animais serão pesados a cada 5 dias. Animais que apresentarem sintomas álgicos ou de grave anorexia, serão eutanasiados por motivos humanitários.

Transporte dos animais

Para a obtenção das imagens de BMUe e de endoscopia convencional no Laboratório de Ultrassom da COPPE/UFRJ, os animais serão transportados individualmente para que a saúde e o bem-estar seja preservado, mantendo-o acomodado em gaiola sem água e sem alimento. A capacidade do animal por caixa será de no máximo duas vezes maior do que a capacidade por caixa utilizada no biotério, para se evitar a movimentação do animal durante a viagem e a ocorrência de lesões durante o transporte. A temperatura do veículo será adequada para a espécie (22 ± 2 °C).

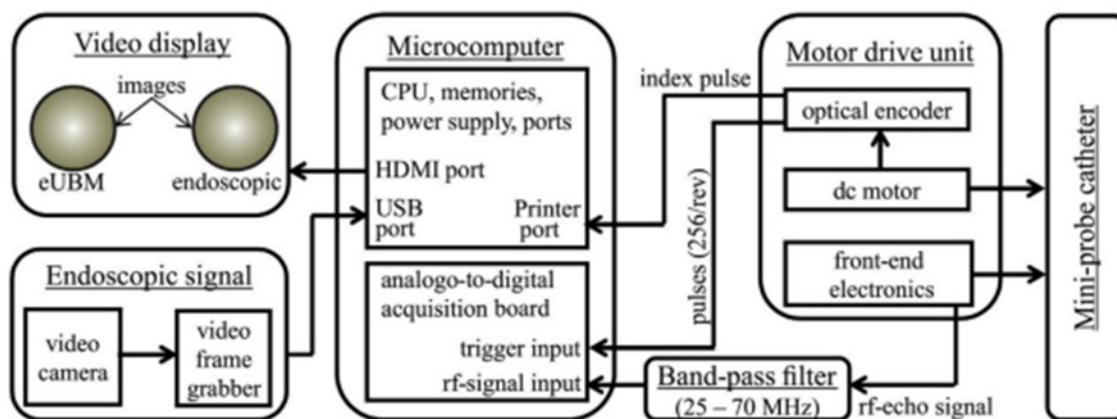
Antes da retirada do biotério o animal será inspecionado por Médico Veterinário Responsável Técnico (RT), que emitirá o atestado sanitário para ser utilizado na emissão da Guia de Trânsito Animal (GTA) e recolhimento da taxa (DARE) para cada deslocamento realizado.

Exame ultrassonográfico e endoscópico

As imagens ultrassonográficas serão adquiridas por meio do sistema BMUe (resoluções axiais e lateral da ordem de 30 e 100 μm , respectivamente) desenvolvido no próprio LUS (Figura 1), o qual utiliza uma minissonda de ultrassom de 40 MHz, na forma de cateter, inserida através do canal de biópsia de um broncofibroscópio flexível pediátrico. Imagens endoscópicas e de BMUe em modo-B serão obtidas simultaneamente do esôfago. Para isso, o animal será anestesiado com cloridrato de cetamina a 10% (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina a 2% (10 mg/kg) por injeção IP e depois colocado em posição ortostática, com os incisivos fixados a um elástico em uma plataforma de acrílico (RIS-100®, Biotex, Inc., Houston, TX, EUA), para manter a cavidade oral aberta.

Será realizada a intubação orotraqueal e a aquisição das imagens de BMUe e de endoscopia de acordo com os procedimentos descritos por Magalhães et al. 7

Figura 2. Sistema endoscópico e de BMUe



Esquema das partes principais do sistema de imagem projetado para exibir imagens biomicroscópicas e endoscópicas de ultrassom endoluminal simultaneamente. Fonte: Magalhães Gomes et al., 2016.7

Em relação a equipamento usado na aquisição de imagem por BMUe, o LUS, do Programa de Engenharia Biomédica/COPPE/UFRJ, dispõe de infraestrutura para a obtenção, *in vivo*, de imagens de BMUe e de endoscopia em animais de laboratório.

No que diz respeito ao âmbito do projeto em questão, dispõe de uma fonte de luz xênon (Confiance Medical®, Rio de Janeiro, Brasil), uma processadora de vídeo (IMAGE I HD; Karl Storz), endoscópio rígido modelo Hopkins 0° (64301 AA; Karl Storz®), endoscópio flexível (2,5 mm coledoscópio Richard Wolf®, IL, EUA), câmera em miniatura (H3-Z; Karl Storz®, Tuttlingen, DE) para ser acoplada na lente ocular do endoscópio, sistema de anestesia inalatória para pequenos animais de laboratório (EZ-700, Euthanex®, Palmer, PA, EUA), plataforma para a fixação de ratos em posição ortostática, com os incisivos fixados a um elástico em uma plataforma de acrílico (RIS-100; Biotex Inc.®. Houston, TX, EUA), sistema completo de BMUe desenvolvido no próprio LUS, *miniprobe*s na forma de um cateter (Atlantis® SR Pro Coronary Imaging Catheter; Boston Scientific Corporation), sistema de excitação/recepção de transdutor de ultrassom e de acionamento mecânico do miniprobe (MD5; Boston Scientific Corporation®. Natick, MA).

Estudo histológico e imunohistoquímico

Após a aquisição das imagens será induzida a morte nos animais por sobredose anestésica, para a excisão do segmento distal esofágico que será imerso em paraformaldeído tamponado a 4% por 48 horas. Após desidratação e diafanização, o segmento será imerso em parafina e o bloco de parafina e cortado em fragmentos com 4 μm de espessura. As amostras serão coradas com H&E e os preparados histológicos analisados no Serviço de Anatomia Patológica do HUCFF da UFRJ.

Realizar-se-ão análises semiquantitativas, para a imunexpressão dos biomarcadores oncogênicos e de atividade mitótica: p53, E-caderina, e EGFR. Os resultados serão avaliados por cegamento.

Análise estatística dos dados

Os achados (presença e tamanhos de tumores, parâmetros de exames histológicos e imunohistoquímicos) serão analisados com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste t (Welch) com a correção de Bonferroni, considerando-se um intervalo de confiança de 95% e grau de significância de 5% ($p < 0,05$). Será usado o software livre Jamovi (Versão 1.1.9), que tem como base a linguagem estatística R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

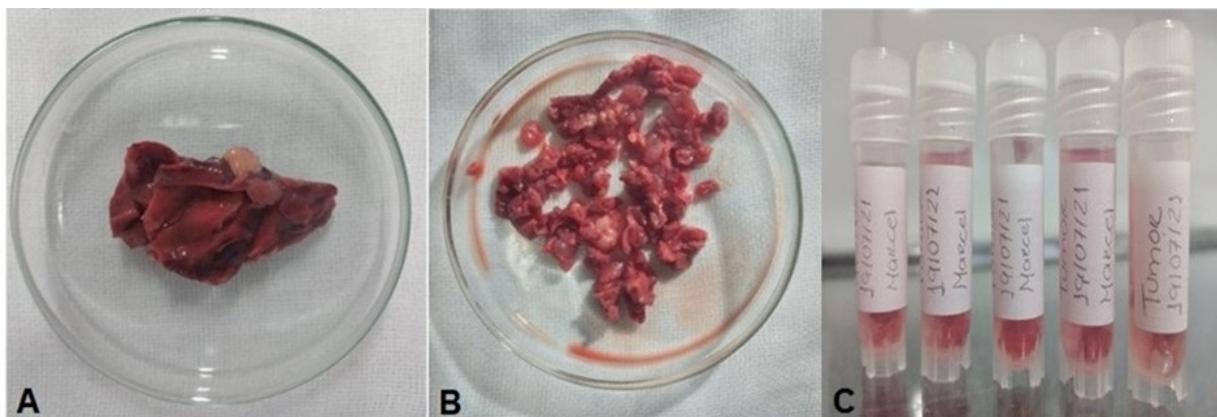
Manutenção do carcinossarcoma de Walker-256, por meio da criopreservação e repicagem celular

Após a recepção da amostra (± 60 g) acondicionada em gelo seco (-78 °C), ela foi fragmentada e maceada (Figura 3a, 3b).

Em câmara de fluxo laminar, colocou-se o material em um criotubo previamente resfriado em gelo contendo uma solução nutritiva composta por 43% de RPMI 1640 (Cultilab®, Campinas-SP, BR), 50% de Soro fetal bovino (Sigma-Aldrich®, St Louis, Mo, EUA) e 7% de DMSO (dimetilsulfóxido) (Figura 3c).

Um total de cinco amostras foram congeladas durante 1 hora a -4 °C, e em seguida, criopreservadas em nitrogênio líquido a -196 °C (método de criopreservação lenta).

Figura 3. Criopreservação do tumor de Walker-256



A) Amostra do Carcinossarcoma muscular de Walker 256. B) Fragmentação C) Criopreservação em solução nutritiva composta por 7% DMSO; RPMI 1640 50%; SFB 54%. Fonte: Autores.

Aduz-se que o material criopreservado, diferente da cultura de células, propicia uma viabilidade tecidual por períodos mais longos e compatíveis com a disponibilidade de animais ao projeto.

Ademais, no processo de criopreservação optou-se pela técnica de congelamento lento (taxa de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto). Assim, as células foram submetidas gradualmente a temperaturas baixas, impedindo a formação de cristais de gelo no citoplasma celular²⁶.

Para manter um padrão de excelência, foi utilizado o composto nutritivo de Roswel (RPMI 1640), amplamente utilizado na cultura de células humanas, que exigem uma maior quantidade de nutrientes devido à sua maior complexidade quando comparadas às células murinas. A criopreservação foi realizada em câmaras de fluxo laminar, evitando a contaminação e a perda das amostras.

Para aumentar a viabilidade celular durante e depois do processo de congelamento, utilizou-se o dimetilsulfóxido (DMSO) com ação crioprotetora e, apesar de ter uma suposta toxicidade celular, apresenta características higroscópicas que agem na extração de água do interior das células. No momento do implante, repetidas lavagens das amostras com PBS estéril reduziram a probabilidade de toxicidade por DMSO²⁷. Após o descongelamento rápido (banho-Maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$), a solução contendo as células tumorais foram inoculadas em três animais na camada muscular esofágica. (Figura 4).

Figura 4. Implante tumoral



Sutura simples na camada muscular após inoculação. Fonte: Autores, 2023.

Quatorze dias após o implante, observou-se falha na indução tumoral, provavelmente associada ao longo tempo desde o envio da amostra até o momento de seu uso. Tal óbice impediu a manutenção do carcinossarcoma de Walker-256, e sua repicagem em tecido muscular *in vivo*.

Estudo piloto da indução cirúrgica da DRGE

Foram randomizados seis animais para o estudo piloto da DRGE. Após cuidados de assepsia e antisepsia, os animais foram anestesiados, procedendo-se à cirurgia. Após a miectomia e vagotomia troncular, os animais foram submetidos a jejum alimentar por três dias. Em seguida, receberam quantidades crescentes de ração úmida. Aos 7 dias, os animais voltaram a ingerir a ração comercial (Nuvilab®). Segundo Gaia Filho¹¹, o adiamento do início da dieta sólida se relaciona à mortalidade aumentada no grupo de animais submetidos à miectomia total.

Clinicamente, os animais apresentaram dilatação gástrica acentuada (secundária ao retardo do esvaziamento gástrico), provocado pela vagotomia troncular, e regurgitação do conteúdo estomacal (Figura 5), atestando o êxito na indução cirúrgica da DRGE.

FIGURA 5. TÉCNICA OPERATÓRIA DE MIECTOMIA TOTAL E VAGOTOMIA TRONCULAR



A, B) Aspecto da junção gastroesofágica após a ressecção de 1,5 cm da camada muscular. C) A seta mostra o conteúdo alimentar regurgitado, 14 dias após a cirurgia. Fonte: Autores, 2023.

O modelo apresentou um curto tempo operatório e anestésico (média de 50 minutos), o que facilitou a recuperação precoce dos animais. A profilaxia com antibióticos não foi utilizada devido à baixa probabilidade de ocorrência de infecções. Os animais não necessitaram de hidratação endovenosa.

Após a cirurgia, 2/6 animais (33%) vieram à óbito. Essa taxa de óbitos se encontra acima da obtida por Gaia Filho de apenas 10%¹¹. A causa provável dos óbitos, relacionou-se a broncoaspiração do conteúdo gástrico alimentar. Os dados do estudo piloto encontram-se descritos na tabela 1.

Tabela 1. Estudo piloto (DRGE)

Rato n.º	Tempo operatório (min.)	Retorno à alimentação (dias)	Desfecho (óbito*; eutanásia***) (dias)
1	60	-	5*
2	45	7	30**
3	52	5	60**
4	33	7	30**
5	40	5	90**
6	70	-	3*

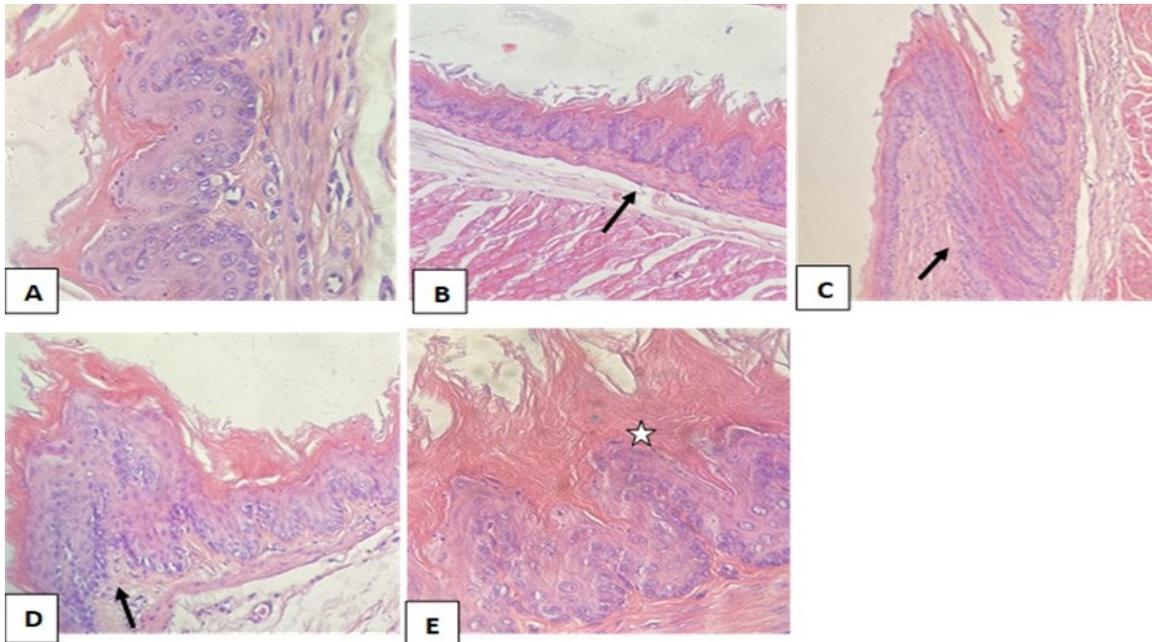
Fonte: autores, 2023.

Quando comparado aos demais modelos de DRGE, a miectomia total apresentou uma menor morbimortalidade, considerando que a ligadura pilórica, constrição pilórica com ligadura pré-estomacal, cardioplastia de Wendel e anastomose esofagogástrica, refluxo misto (anastomose esofagogastroduodenal, esofagoduodenostomia ou esofagojejunostomia), refluxo duodenal (anastomose esofagogastroduodenal com gastrectomia), apresentam modificações anatômicas acentuadas devido às anastomoses, aumentando a mortalidade pós-operatória¹⁵⁻²⁴.

Exames histológicos

Procedeu-se ao exame histológico do esôfago de um animal controle, o qual **não apresentou** nenhuma alteração digna de nota (Figura 7).

Figura 7. Características histológicas de animal controle



Nos animais do GC, foram observadas amostras contendo a camada mucosa justaposta à lâmina própria e muscular da mucosa (Fig. A). Na porção epitelial havia áreas com discreta hiperplasia caracterizada pelo espessamento ou alongamento das papilas (Figs. B-D-setas) e leve hiperqueratose (Fig. E estrela). A muscular da mucosa estava íntegra, sem indícios de atrofia. A camada muscular e a inervação não exibiam alterações dignas de nota. Esôfago com discretas áreas de hiperplasia e hiperqueratose na mucosa. Fonte: Autores, 2023.

CONCLUSÕES PRELIMINARES

Devido à falha na repicagem do tumor, com uso da suspensão criopreservada obtida a partir de um fragmento sólido, optou-se pela aquisição da cultura LLC WRC-256, fornecida pela American Type Culture Collection (ATCC). Quanto ao estudo piloto de indução da DRGE, este mostrou ser viável, mas, devido à alta mortalidade (33%), optou-se no estudo definitivo por uma ressecção de menor extensão da camada muscular esofágica.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver quaisquer conflitos de interesses.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Este estudo é financiado pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro- **FAPERJ**. Programa de Pós-Doutorado Nota 10 (PDR10)- 2022. Edital 17/22. Proc. **SEI-RJ 260003/019572/2002**.

Diretoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão (DPPE), do Centro Universitário Serra dos Órgãos-UNIFESO.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho do Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LOE), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil [Internet]. INCA; 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa>.
2. Hamamoto Y, Endo T, Nosho K, Arimura Y, Sato M, Imai K. Usefulness of narrow-band imaging endoscopy for diagnosis of Barrett's esophagus. *J Gastroenterol* 2004;39(1):14–20.
3. Galloro G. High technology imaging in digestive endoscopy. *World J Gastrointest Endosc* 2012; 4(2):22–7.
4. Murata Y, Napoleon B, Odegaard S. High-frequency endoscopic ultrasonography in the evaluation of superficial esophageal cancer. *Endoscopy* 2003;35(5):429–36.
5. Yoshinaga S, Oda I, Nonaka S, Kushima R, Saito Y. Endoscopic ultrasound using ultrasound probes for the diagnosis of early esophageal and gastric cancers. *World J Gastrointest Endosc* 2012;4(6):218–26.
6. Buttar NS, Wiersema MJ, Wang KK, DeMars CJ, Prasad GA, Lutzke LS. Rodent endosonography to monitor esophageal cancer. *Int J Gastrointest Cancer* 2006;37(2–3):84–90.
7. Magalhães Gomes R, Soletti RC, Soldan M, Madi K, Foster FS, Machado JC. In Vivo Endoluminal Ultrasound Biomicroscopy and Endoscopy of Inflamed Rat Esophagus. *Ultrasound Med Biol* 2016; 42(11):2687–96.
8. Britto MAP, Soletti RC, Schanaider A, Madi K, de Souza HSP, Machado JC. Endoluminal ultrasound biomicroscopy as a reliable tool for in vivo assessment of colonic inflammation in rats. *Int J Colorectal Dis* 2013;28(12):1613–20.
9. Soletti RC, Alves KZ, de Britto MAP, de Matos DG, Soldan M, Borges HL, et al. Simultaneous follow-up of mouse colon lesions by colonoscopy and endoluminal ultrasound biomicroscopy. *World J Gastroenterol* 2013;19(44):8056–64.
10. Do Amaral LA, de Souza GHO, Santos MR, Said YLV, de Souza BB, Oliveira RJ, dos Santos EF. Walker-256 Tumor: Experimental Model, Implantation Sites and Number of Cells for Ascitic and Solid Tumor Development. *Braz. Arch. of Biol Technol* 2019;62. doi: 0.1590/1678-4324-2019180284.
11. Gaia Filho EV, Goldenberg A, Costa HO. Experimental model of gastroesophageal reflux in rats. *Acta Cir Bras* 2005;20(6):437–44.
12. Castro Jr. MMA, Kruehl CDP, Meurer L, de Castro AP, Zimmermann BS. Modelo experimental de carcinogênese esofágica. *Rev Col Bras Cir* 2007;34(3):153–6.
13. Oberg S, Lord RV, Peters JH, Chandrasoma P, Theisen J, Hagen JA, et al. Is adenocarcinoma following esophagoduodenostomy without carcinogen in the rat reflux-induced? *J Surg Res* 2000;91(2):111–7.
14. Andreollo NA, Santos EF dos, Araújo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir Dig* 2012;25(1):49–51.
15. Helsing N. Oesophageal lesions following total gastrectomy in rats. I. Development and nature. *Acta Chir Scand* 1960; 118:202–16.
16. Helsing N. Oesophagitis following total gastrectomy in rats. II. Development of oesophagitis in relation to type of reconstruction. *Acta Chir Scand* 1960; 119:230–45.
17. Levrat M, Lambert R, Kirshbaum G. Esophagitis produced by reflux of duodenal contents in rats. *Am J Dig Dis* 1962; 7:564–73.
18. Lambert R. Relative importance of biliary and pancreatic secretions in the genesis of esophagitis in rats. *Am J Dig Dis* 1962; 7:1026–33.

19. Salmon R, Hem B. Bile reflux esophagitis. A critical study of two models in the rat. *Digestion* 1981; 22(2):73–9.
20. Ishii Y, Fujii Y, Yamashita T. Effect of sodium polyacrylate on chronic reflux esophagitis in rats. *Arzneimittelforschung* 1981;31(12):2112–5.
21. Mud HJ, Kranendonk SE, Obertop H, Van Houten H, Westbroek DL. Active trypsin and reflux oesophagitis: an experimental study in rats. *Br J Surg* 1982;69(5):269–72.
22. Pera M, Grande L, Gelabert M, Figueras X, Pera M, Palacín A, et al. Epithelial cell hyperproliferation after biliopancreatic reflux into the esophagus of rats. *Ann Thorac Surg* 1998;65(3):779–86.
23. He J, Fang Y, Chen X. Surgical Models of Gastroesophageal Reflux with Mice. *J Vis Exp* 2015; (102):e53012.
24. Kruel CDP. Classificação citopatológica das lesões precursoras do carcinoma escamoso do esôfago: modelo experimental em camundongos. [São Paulo]: Escola Paulista de Medicina; 1992.
25. Matsui D, Omstead AN, Kosovec JE, Komatsu Y, Lloyd EJ, Raphael H, et al. High yield reproducible rat model recapitulating human Barrett’s carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2017; 23(33):6077–87.
26. Solves P, Mirabet V, Planelles D, Carbonell-Uberos F, Roig R. Influence of volume reduction and cryopreservation methodologies on quality of thawed umbilical cord blood units for transplantation. *Cryobiology*. 2008;56(2):152-8.
27. Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am J Hematol*. 2007;82(6):463-72.