

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

**Efeitos do Álcool e da Cafeína em Modelo
de Lesões Intra-epiteliais e de
Carcinogênese Pancreática Induzidas por
7,12-Dimetilbenzantraceno (DMBA) em
Camundongos**

Tese de Doutorado

LUIZ ROBERTO RIGO WENDT

Orientador: Prof. Luiz Rohde

Co-Orientadora: Prof.^a Maria Isabel Albano Edelweiss

Porto Alegre, 2004

W473a **Wendt, Luiz Roberto Rigo**

Efeitos do álcool e da cafeína em modelo de lesões intra-epiteliais e de carcinogênese pancreática induzidas por 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) em camundongos / Luiz Roberto Rigo Wendt ; orient. Luiz Rohde ; co-orient. Maria Isabel Albano Edelweiss. – 2004.
80f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação Medicina: Cirurgia. Porto Alegre, BR-RS, 2004.

1. Carcinogênese 2. Neoplasias pancreáticas 3. Modelos animais de doenças 4. Camundongos 5. Álcool 6. Cafeína 7. 9,10-Dimetil-1,2-benzantraceno I. Rohde, Luiz II. Edelweiss, Maria Isabel Albano III. Título.

NLM: WI 810

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

À minha esposa **Liliane**, pelo estímulo, amor e compreensão.

À nossa amada filha **Caroline**, razão maior de nossas vidas.

Aos meus pais **Rubens e Izaltina**, pelo amor, dedicação, estímulo
e pela educação que me proporcionaram.

Aos meus irmãos **Fernando, Rose e Rosângela**,
pelo carinho e amor fraterno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a execução desta tese e, em especial:

Ao Prof. Dr. **Luiz Rohde**, modelo de profissionalismo e sábio orientador. Seu espírito científico, sua orientação precisa, seu constante estímulo e sua paciência foram determinantes na conclusão desta tese. Agradeço sinceramente todo seu apoio e compreensão.

À Prof.^a Dr.^a **Maria Isabel Albano Edelweiss**, co-orientadora, pelo incessante estímulo e dedicação. Seu suporte científico e sua supervisão adequada foram fundamentais na elaboração desta tese.

Ao Prof. Dr. **Luiz Lavinski**, pelo apoio neste primeiro projeto realizado integralmente no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Igualmente a administradora Sr.^a **Rosane Paixão Schlatter**.

À Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do HCPA, Prof.^a Dr.^a **Roseli de Oliveira Möllerke** e, especialmente aos seus colaboradores, veterinário **Marcos Eugênio Soares Duarte** e biólogo **Eduardo Mottola Amaro da Silveira**. Foram fundamentais na experimentação como um todo e no cuidado dos animais.

À Prof.^a Dr.^a **Rita de Cássia Alves Schumacher**, pela sua dedicação e precisão na avaliação histopatológica.

À Divisão de Produção e Experimentação Animal da Fundação Estadual de Estudos e Pesquisas da Saúde (FEEPS), em especial, à veterinária **Luisa Maria**

Gomes de Macedo Braga e à bióloga **Patrícia Sesterheim**, pelo fornecimento dos animais para experimentação.

Ao Serviço de Importação do HCPA, Sr.^a **Eliane Santana** e Sr. **Luiz Daniel Schontag** pelo empenho na obtenção dos carcinógenos.

Ao Dr. **Alessandro Bersch Osvaldt**, companheiro em todas as fases deste trabalho. Seu auxílio foi inestimável na realização desta tese. Agradeço em especial sua amizade, dedicação e estímulo.

Ao Dr. **Luiz Carlos Adamatti**, pelo auxílio fundamental na dissecação dos animais e na edição das imagens.

Ao Prof. **Mário Bernardes Wagner**, pela eficiente e competente orientação para a análise estatística.

Ao Prof. **João Carlos Prolla**, pelo auxílio na digitalização da documentação histopatológica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Fundo de Incentivo à Pesquisas (FIPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, pelo auxílio financeiro prestado.

Ao fotógrafo do HCPA, Sr. **Clóvis Souza**, pelo auxílio na documentação fotográfica do modelo experimental.

À bibliotecária **Helen Rose Flores de Flores** pelo auxílio com a catalogação bibliográfica.

À Prof.^a **Edir Valente da Silva**, pela prestimosa e cuidadosa revisão ortográfica.

Ao Dr. **Kaspar Z'gragen** e Dr. **Pascal Zenhder** pela documentação enviada sobre a técnica de implantação do DMBA.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia e seus Professores pelos ensinamentos que me proporcionaram.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	3
REVISÃO DA LITERATURA.....	4
BIOLOGIA MOLECULAR DO CÂNCER DE PÂNCREAS	7
LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER DE PÂNCREAS	10
MODELOS EXPERIMENTAIS DE CARCINOGÊNESE PANCREÁTICA.....	11
CAFÉINA E CARCINOGÊNESE	17
ÁLCOOL E CARCINOGÊNESE	21
MÉTODOS	23
1) MODELO ANIMAL.....	23
1.1) Divisão dos Grupos.....	24
1.2) Soluções	25
1.3) DMBA.....	26
1.4) Anestesia	26
1.5) Procedimento operatório	27
1.6) Pós-operatório	30
1.7) Eutanásia dos animais	30
2) ANÁLISE HISTOLÓGICA	31
2.1) Critérios histológicos	31
3) ÉTICA	33
4) ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
RESULTADOS	35
1) PERDAS	35
2) CONSUMO DE SOLUÇÕES	36
3) ANÁLISE HISTOLÓGICA	37
DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÕES.....	55

PERSPECTIVAS FUTURAS	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO 1	70
ANEXO 2	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Concentração de cafeína em algumas bebidas	17
Tabela 2 : Caracterização dos grupos do experimento	25
Tabela 3 : Total de perdas nos diferentes grupos.....	36
Tabela 4 : Média do volume (ml) de solução ingerida por camundongo diariamente nos diferentes grupos.	36

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação morfológica evolutiva do PanIN..... 11
- Figura 2:** Antissepsia da pele e abertura da cavidade peritoneal..... 28
- Figura 3:** Mobilização do estômago e dissecação do pâncreas (P)..... 28
- Figura 4:** Introdução dos cristais de DMBA no pâncreas..... 29
- Figura 5:** Visualização anterior da bolsa (tracejado)..... 29
- Figura 6:** Visualização posterior da bolsa com seu conteúdo (seta)..... 30
- Figura 7:** A) Parênquima pancreático normal com ilhota de Langerhans(I), animal do grupo água, aumento de 20x no original; B) Parênquima pancreático com ducto normal(d), animal do grupo água, aumento de 20x no original; C) Bolsa com cristais de DMBA (setas), aumento de 4x no original; D) Formação de complexos tubulares (setas), aumento de 20x no original. Lâminas coradas por H&E..... 37
- Figura 8:** Lesões precursoras classificadas como PanIN: A) PanIN 1A com epitélio cilíndrico, aumento de 40x no original; B) PanIN 1B com projeções papilares (setas), aumento de 20x no original; C) PanIN 1B com projeções papilares (setas), aumento de 10x no original; D) PanIN 2 com projeção papilar com núcleos em diferentes alturas (seta), aumento de 20x no original; E) PanIN 2 com projeções papilares (setas), aumento de 20x no original; F) PanIN 3, aumento de 10x no original;

G)PanIN 3 com decapitação (seta), aumento de 10x no original; H)PanIN 3 com aspecto cribiforme, aumento de 20x no original. Lâminas coradas por H&E. 38

Figura 9: Cortes histológicos evidenciando adenocarcinoma invasor de pâncreas A) Animal do grupo álcool, aumento de 20x no original B) Animal do grupo álcool+cafeína, aumento de 20x no original C) Estroma desmoplásico com glândulas atípicas, aumento de 20x no original D) Animal do grupo água, aumento de 10x no original E) e F) Estroma desmoplásico com glândulas atípicas, aumento de 20x no original. Lâminas coradas por H&E..... 39

Figura 10: Frequência (n) dos diagnósticos histológicos no Grupo Água. N:normal; HR:hiperplasia reacional; Ia:PanIN 1a; Ib:PanIN 1b; II:PanIN 2; III:PanIN 3; Ca: Adenocarcinoma invasor..... 40

Figura 11: Frequência dos diagnósticos histológicos no Grupo Álcool. N:Normal; HR:Hiperplasia Reacional; Ia:PanIN Ia; 1b:PanIN 1b; II:PanIN 2; III: PanIN 3; Ca:Adenocarcinoma invasor. 41

Figura 12: Frequência dos diagnósticos histológicos no Grupo Cafeína. N:Normal; HR:Hiperplasia Reacional; Ia:PanIN 1a; Ib:PanIN 1b; II:PanIN 2; III:PanIN 3; Ca:Adenocarcinoma invasor. 42

Figura 13: Frequência dos diagnósticos histológicos no Grupo Álcool+Cafeína. N:Normal; HR:Hiperplasia Reacional; Ia:PanIN 1a; Ib:PanIN 1b; II:PanIN 2; III:PanIN 3; Ca:Adenocarcinoma invasor..... 43

Figura 14: Frequência de adenocarcinoma nos diferentes grupos..... 44

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: Adenocarcinoma ductal pancreático

EUA: Estados Unidos da América

DMBA: 7,12-dimetilbenzantraceno

PDA: Pancreatic ductal adenocarcinoma

PanIN: Neoplasias pancreáticas intra-epiteliais

DDT: Dicloro-difenil-tricloroetano

RR: Risco relativo

IC: Intervalo de confiança

BRCA2: Breast cancer 2

DPC4: Deleted in pancreatic cancer locus 4

BOP: N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine

IHPBA: International Hepato Pancreato Biliary Association

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

CCE: Centro de cirurgia experimental

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SPSS: Statistical package for social science

H&E: Hematoxilina-eosina

RESUMO

Introdução: Modelos experimentais de indução da carcinogênese pancreática são necessários para melhor compreensão da biologia tumoral e para estudar os efeitos de agentes promotores ou protetores. **Objetivos:** Avaliar os efeitos do álcool e da cafeína na carcinogênese pancreática induzida pelo 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), aplicando a classificação sistematizada de neoplasias intra-epiteliais pancreáticas (PanIN) de Hruban e cols. (2001)(1) em camundongos. **Métodos:** Cento e vinte camundongos *mus musculus*, machos, adultos foram divididos em quatro grupos. Em todos os animais foi induzida a carcinogênese pancreática pela implantação de 1mg de DMBA no pâncreas dos animais. Os animais recebiam ou água ou cafeína ou álcool ou álcool+cafeína de acordo com seu grupo. Para a análise histológica do pâncreas, adotou-se a classificação sistematizada das lesões precursoras (PanIN). **Resultados:** No grupo água + DMBA, 16,6% dos animais desenvolveram adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) e 66,6% apresentaram neoplasias intra-epiteliais pancreáticas (PanIN). No grupo álcool + DMBA, 52,9% desenvolveram ADP ($p < 0,05$) e 35,3% PanIN. No grupo cafeína + DMBA, 15% apresentaram ADP e 65% PanIN. No grupo álcool+cafeína + DMBA, 23,8% desenvolveram ADP e 71,4% PanIN. **Conclusões:** O modelo experimental de carcinogênese pancreática em camundongos utilizando o DMBA, é eficaz na indução de lesões precursoras e de adenocarcinoma pancreático. O álcool está associado ao aumento da frequência de adenocarcinoma pancreático, enquanto que a cafeína não demonstrou este efeito.

ABSTRACT

Introduction: Experimental models of pancreatic carcinogenesis are necessary to a better understanding of tumoral biology and to study the effects of the promoting or protective agents. **Objectives:** To evaluate the effects of alcohol or caffeine in pancreatic carcinogenesis induced by the DMBA (7,12-dimethylbenzanthracene) in mice, applying the systematized classification of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) of Hruban e cols. **Methods:** A hundred and twenty male, adult mice (*mus musculus*), were allocated into four groups. In all animals, pancreatic carcinogenesis was induced by implanting 1mg of DMBA into the pancreas. According with each group, a different solution was added to the drinking water. Some animals received water, others caffeine, alcohol or alcohol plus caffeine. To the histological analysis of the pancreas, the systematized classification of preinvasive lesions (PanIN) was adopted. **Results:** In the group water+DMBA, 16,6% of animals developed pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) and 66,6% pancreatic intraepithelial neoplasias (PanIN). In the group alcohol+DMBA, 52,9% developed PDA ($p < 0,05$) and 35,3% PanIN. In the group caffeine+DMBA, 15% developed PDA and 65% PanIN. In the group alcohol+caffeine+DMBA, 23,8% developed PDA and 71,4% PanIN. **Conclusions:** The experimental model of pancreatic carcinogenesis in mice using DMBA is effective in the induction of preinvasive lesions and pancreatic adenocarcinoma. Alcohol is associated to the increase of incidence of pancreatic adenocarcinoma, while caffeine did not show this effect.

INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma ductal de pâncreas (ADP) representa o décimo primeiro sítio primário de neoplasia, e é atualmente a quarta causa de óbito por câncer nos Estados Unidos da América (EUA)(2),(3),(4). O ADP tem taxa de sobrevivência em 1 ano de 19% e em 5 anos de 4% quando considerados todos os estágios. É a neoplasia maligna com menor taxa de sobrevivência em 5 anos entre todos os tipos de neoplasias(2),(5). Aproximadamente 80% dos pacientes apresentam doença irremediável no momento do diagnóstico(2). Assim, infelizmente, a maioria dos pacientes são submetidos apenas a tratamento paliativo. Esses dados ressaltam a importância do diagnóstico das lesões iniciais e da identificação de possíveis fatores de risco.

Estudos recentes têm caracterizado as lesões precursoras (pré-invasivas) do ADP, unificando a terminologia destas lesões e propondo um modelo de progressão morfológica para o ADP (1),(6),(7). De acordo com esses autores, estas lesões foram classificadas em Neoplasias **Pancreáticas Intra-epiteliais (PanIN)**. Estes estudos também relacionam estas lesões precursoras com alterações genéticas moleculares específicas(8).

O ADP está associado a inúmeros fatores de risco como tabagismo, diabetes melito, pancreatite crônica, gastrectomia prévia e história familiar (9). A associação entre o consumo de álcool ou de cafeína com câncer de pâncreas não está bem definida.

Modelos experimentais de carcinogênese pancreática induzida pelo 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) têm sido desenvolvidos para a indução de

adenocarcinoma pancreático(10),(11),(12),(13), todos utilizando o rato como animal de experimentação. Zehnder e cols. induziram o adenocarcinoma pancreático em camundongos e descreveram uma seqüência displasia-adenocarcinoma, estudo que foi publicado somente sob forma de resumo(14). A classificação sistematizada das lesões precursoras (PanIN) é de publicação posterior(1).

O presente estudo avalia os efeitos do álcool e da cafeína na carcinogênese pancreática induzida pelo DMBA em camundongos, classificando os resultados nesta nova nomenclatura das lesões intra-epiteliais pancreáticas.

OBJETIVOS

- Avaliar os efeitos do álcool e da cafeína na carcinogênese pancreática induzida pelo 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) em modelo experimental em camundongos.

- Estudar as lesões precursoras e a carcinogênese pancreática induzidas pelo 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) em modelo experimental em camundongos.

REVISÃO DA LITERATURA

O adenocarcinoma ductal do pâncreas (ADP) permanece como problema de saúde pública mundial e como desafio clínico(3). É a quarta causa de óbito por câncer nos Estados Unidos (4) e a segunda causa de óbito por câncer do trato digestivo(15), sendo o décimo primeiro sítio neoplásico primário(3). A maior incidência é na sexta e sétima décadas de vida, com predomínio em homens (risco relativo 1,35)(2) e a relação entre negros e brancos é 1,5:1(16),(17).

A incidência americana de tumores pancreáticos é de 9 casos/100.000 hab/ano (2). Em 2002, mais de 30.300 novos casos foram diagnosticados nos EUA e quase 30.000 pacientes faleceram desta doença (18). No Reino Unido, o câncer de pâncreas afeta aproximadamente 6000 pessoas anualmente (19). No Brasil, o Rio Grande do Sul é o estado que apresenta maior mortalidade por câncer de pâncreas (5,3/100.000 hab/ano)(20;21).

Estima-se que ocorram 185.000 novos casos de câncer de pâncreas, anualmente em todo mundo, com razão de óbito por incidência de 0,99(3), com taxa de sobrevivência de 5 anos inferior a 5%(2). No momento do diagnóstico, 80% dos pacientes apresentam doença irresssecável, ou seja, doença localmente avançada ou metastática (2). Este mau prognóstico reflete a inefetividade dos métodos de “screening”, a apresentação da doença em estágios avançados e a ausência de terapias adjuvantes eficazes(11).

A ressecção cirúrgica com margens livres e linfonodos negativos oferece a melhor possibilidade de cura para o câncer de pâncreas, com taxa de sobrevivência em 5 anos de 20% (22). Infelizmente, a maioria dos pacientes é submetida apenas a tratamento paliativo.

O *diabete melito* pode ser uma manifestação precoce do carcinoma pancreático, principalmente quando de início súbito em pacientes com mais de 50 anos, sem história familiar (5). Entretanto, a sua presença por 5 anos ou mais, especialmente nos pacientes não-insulino dependentes, com idade superior a 40 anos, aumenta o risco (23). Embora exista essa relação, sua fisiopatologia não está definida, mas especula-se que a intolerância à glicose, o hiperinsulinismo e resistência à insulina estejam envolvidos neste processo(24),(16),(25),(2).

A *pancreatite crônica* apresenta um dos riscos mais bem definidos que está ligado ao tempo de evolução da doença. Em cada década há um aumento do risco de aproximadamente 2%(26).

O *tabagismo* é um dos mais importantes fatores de risco. Até 30% dos tumores podem ser atribuídos ao fumo como agente etiológico. Vários estudos tipo caso-controle e tipo coorte demonstraram aumento de 1,5 a 3,8 vezes no risco de desenvolvimento do ADP. O seu efeito se estende àqueles cujo contato é apenas por inalação da fumaça do cigarro. Estima-se que o risco continue aumentado por um período de 10 a 15 anos após a cessação do tabagismo (16),(9),(15),(27). A nicotina, mas sobretudo as nitrosaminas tabaco específicas são as mais envolvidas com a carcinogênese(28),(29).

A *obesidade* não tem sido associada ao ADP(30). Alguns tipos de *dietas* como aquelas com altos percentuais de proteínas (carnes vermelhas) ou gorduras têm demonstrado risco aumentado(31),(32).

A *exposição ocupacional* representa um grupo heterogêneo de produtos e de ocupações relacionadas. Entre eles, os trabalhadores da indústria petroquímica, de borracha, de plástico, os trabalhadores rurais com contato com DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), e os que mantêm contato com aminas aromáticas, compostos de níquel e cádmio, benzopirenos, 2-naftilamina, entre outros (16),(27),(9),(2).

O ADP tem sido relacionado a algumas cirurgias digestivas. A *gastrectomia* aumenta o risco de desenvolvimento de carcinoma pancreático (RR 1,8; IC 95% 1,3-2,6) após cinco anos da cirurgia, aumentando gradualmente para 3,6 após 35 anos ou mais (33). A *colecistectomia* não apresenta riscos, segundo estudos atuais (34),(35).

A *história familiar* está relacionada com risco aumentado de desenvolvimento de ADP. A frequência de parentes em primeiro grau com diagnóstico de ADP aumenta o risco relativo, conforme o número de familiares acometidos: três (32,0; IC 95% 10,2-74,7), dois (6,4; IC 95% 1,8-16,4), ou um (4,6; IC 95% 0,5-16,4). O risco é maior em fumantes do que não fumantes.

Existem algumas *síndromes genéticas*, cujo gene e o risco relativo aumentado de desenvolvimento do ADP foram estudados: câncer de mama e ovário hereditários por mutações em BRCA2 (aumento de 3,5 a 10 vezes), sendo a mutação no BRCA2 a mutação mais comum identificada em pacientes

portadores de ADP hereditário; melanoma múltiplo familiar atípico com mutação do p16 (aumento de 12 a 20 vezes); síndrome de Peutz-Jeghers com mutação do STK11 e LKB1 (aumento de 130 vezes); pancreatite hereditária com mutação no PRSS1 (aumento de 50 vezes); câncer colo-retal não-polipomatoso hereditário com mutação do gene reparador do DNA e a síndrome ataxia-telangiectasia. Uma sétima síndrome, que consiste de câncer de pâncreas, insuficiência pancreática e diabetes melito foi recentemente descrita com mutação no cromossoma 4q32-34 (2).

Por outro lado, alguns fatores têm sido especulados como protetores. Os principais são o alto consumo de vegetais e frutas(36), de azeite de oliva(37) e a prática de caminhadas, pelo menos 1 hora e meia por semana ou mais (2). A aspirina tem sido objeto de controvérsia, pois há estudos populacionais demonstrando a diminuição da incidência e mortalidade pancreática em grupos com consumo regular de aspirina em até 43% (32), em oposição a outros que não demonstraram nenhum benefício (38),(39).

A relação do álcool e da cafeína com o câncer de pâncreas será discutida mais adiante.

Biologia Molecular do Câncer de Pâncreas

O ADP é doença associada a mutações em genes causadores de câncer (40). Estes genes podem ser classificados em três grupos: genes supressores de tumor, oncogenes e genes reparadores do DNA.

1) Genes supressores de tumor: normalmente funcionam por restringir a proliferação celular e a perda de sua função, por mutação ou deleção, resulta em aumento da proliferação celular. No mínimo quatro genes supressores de tumor estão envolvidos no desenvolvimento do câncer de pâncreas (3).

1.1) p16: Este gene supressor de tumor no cromossoma 9 está inativado em aproximadamente 95% dos casos de câncer de pâncreas(41),(42). A proteína codificada por este gene é um importante regulador do ciclo celular.

1.2) p53: O segundo gene supressor de tumor, mais freqüentemente inativado no câncer de pâncreas, é o p53. O p53 está localizado no cromossoma 17p e está inativado em 50-70% dos casos de câncer de pâncreas (43),(44),(45). A inativação do p53 resulta não somente na perda de um importante regulador do ciclo celular, mas também de um importante indutor da morte celular.

1.3) DPC4 (Deleted in Pancreatic Cancer Locus 4): O gene DPC4 do cromossoma 18q está inativado em aproximadamente 50% dos casos de câncer de pâncreas (46),(47). O DPC4 é um interessante gene supressor de tumor porque sua inativação é relativamente específica para câncer de pâncreas (48).

1.4) BRCA2 (Breast Cancer 2): Este gene está inativado em apenas 7% dos casos de câncer de pâncreas (49),(50) e está associado ao câncer de pâncreas hereditário (2).

2) Oncogenes: O oncogene mais freqüentemente ativado no câncer de pâncreas é o K-ras (51). Mais de 90% dos casos de ADP estão associados com mutações neste oncogene e a maioria destas mutações está localizada no códon 12 do K-ras gene (51).

3) Genes reparadores do DNA: Sua inativação resulta em um fenótipo molecular específico, chamado instabilidade microsatélite ou “RER+”. Isto ocorre aproximadamente em 4% dos casos de ADP e o câncer de pâncreas “RER+” apresenta uma característica morfológica única (52). Este tipo de câncer tende a ser pouco diferenciado, diplóide e com bom prognóstico.

O entendimento da biologia molecular do câncer de pâncreas apresenta potenciais aplicações clínicas:

- alterações genéticas moleculares têm sido usadas para definir lesões precursoras do adenocarcinoma infiltrativo do pâncreas (44).

- alterações genéticas moleculares podem ser usadas para caracterizar histologicamente lesões ambíguas (3).

- alterações genéticas moleculares podem formar a base para novos testes de “screening” para neoplasia de pâncreas. Estas alterações genéticas podem ser detectadas no suco duodenal ou mesmo nas fezes de pacientes com neoplasia de pâncreas e estas alterações podem ser detectadas antes dos pacientes apresentarem neoplasia clinicamente detectável(53),(54),(55).

- alterações genéticas moleculares podem ser utilizadas como teste epidemiológico. Determinados carcinógenos induzem mutações específicas no DNA e o achado de mutações específicas na presença de carcinomas podem sugerir que carcinomas foram causados por um carcinógeno específico.

- alguns casos de câncer de pâncreas podem ter maior incidência familiar se associados com mutações no BRCA2. Assim, pacientes de risco podem realizar

“screening” para detectar alterações no BRCA2 e aqueles que apresentarem esta mutação sejam acompanhados para detecção de câncer de mama ou pâncreas (3).

Lesões Precursoras do Câncer de Pâncreas

Proliferações microscópicas em pequenos ductos pancreáticos têm sido reconhecidas por quase um século (56), mas uma ampla terminologia tem sido utilizada para classificar estas lesões precursoras.

Devido à crescente importância das lesões precursoras e nomenclatura muito heterogênea realizou-se uma reunião de consenso em 1999 para unificação da terminologia dessas lesões. Um grupo de oito patologistas do Canadá, EUA, Alemanha e Holanda, analisaram 35 lâminas diferentes, antes do encontro. Dessa primeira análise, 70 diagnósticos diferentes foram dados, mesclando diferentes graus de hiperplasia, displasia, hiperplasia com displasia, neoplasias pancreáticas intra-epiteliais(PanIN) e lesões ductais. Foi impossível a concordância entre os examinadores. Reuniram-se então para o consenso, Pancreas Cancer Think Tank, em Park City, Utah, EUA, de 16 a 19 de setembro de 1999, concluindo que a melhor nomenclatura a adotar seria a de PanIN (“**P**ancreatic **I**ntraepithelial **N**eoplasia”). Esta nomenclatura e sistema de classificação para lesões ductais pancreáticas foi primeiramente proposta por Klimstra e Longnecker em 1994(57), que uniformizou a terminologia destas lesões, auxiliando a definir um modelo de progressão da neoplasia pancreática (58),(6),(59)(Figura 1).

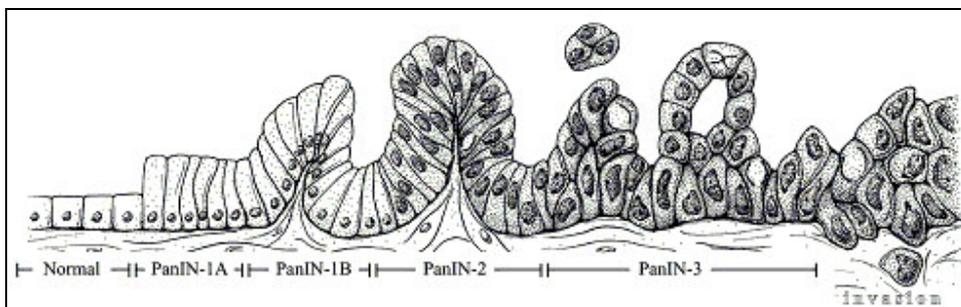


Figura 1: Representação morfológica evolutiva do PanIN, adaptado de Maitra e cols.(6).

Esta classificação das lesões precursoras (PanIN) tornou-se consenso internacional e foi oficialmente publicada por Hruban e cols. em 2001(1), e está explicitada na seção “Métodos”.

Modelos Experimentais de Carcinogênese Pancreática

A presença de pontos obscuros na carcinogênese pancreática estimula o desenvolvimento de modelos experimentais em animais biologicamente semelhantes. Modelos experimentais em animais devem mimetizar a doença que ocorre em humanos. As técnicas e os modelos utilizados são variados e estão descritos a seguir.

Animais geneticamente modificados

Animais geneticamente modificados são ideais para estudo das múltiplas etapas da carcinogênese pancreática. É realizado, quase que exclusivamente, em camundongos. As principais técnicas utilizam animais transgênicos (inserção de uma seqüência específica de DNA com especificidade de expressão no tecido pancreático), o “knockout” (deleção genética, por exemplo, com p53 deficiente)

ou a combinação das duas (60). O fator que limita o uso deste modelo experimental é o elevado custo dos animais geneticamente modificados.

Animais imunodeficientes

Animais imunodeficientes, principalmente os camundongos, são viáveis para estudo experimental do câncer pancreático humano. Os camundongos atímicos e sem pêlos têm sido utilizados como receptores de xenotransplantes de câncer pancreático humano (61).

Os métodos de indução tumoral incluem a injeção direta de células de câncer pancreático humano no pâncreas dos animais, o transplante de fragmentos tumorais do subcutâneo de animais doadores e o transplante de fragmentos tumorais obtidos de tumores humanos ressecados (62). A crítica a este modelo experimental de carcinogênese pancreática é de que o uso de animais imunodeficientes difere, em muitos aspectos da situação do paciente, particularmente pelo seu estado imunológico.

Modelos experimentais com carcinógenos químicos

a) Azaserina

É um dos carcinógenos mais bem estudados. A azaserina é um antimetabólito que induz dano no DNA e inibe a síntese do DNA no pâncreas de ratos, e também no rim, na mama e na pele. A indução é feita por injeção intraperitoneal de 150-260 mg/kg de azaserina, divididas em 5 a 26 doses semanais. A partir de dois meses, após o início do tratamento, já existe a formação de nódulos de células acinares. Após quinze meses, a incidência de carcinomas foi de 58% em machos e 17% em fêmeas. A maioria das neoplasias

induzidas foi do tipo acinar com alguns casos ductulares, císticos e indiferenciados. As metástases são infreqüentes. O estudo molecular revelou ausência de mutações no K-ras, à semelhança do carcinoma de células acinares em humanos (63).

Este modelo experimental de carcinogênese pancreática é um bom modelo para o desenvolvimento do carcinoma de células acinares, mas estes tumores raramente ocorrem em humanos, o que limita o uso deste modelo experimental.

b) N-nitrosobis (2-oxopropyl)amine (BOP)

Vários tipos de nitrosaminas e compostos afins já foram estudados na carcinogênese pancreática, mas o mais potente e seletivo é o BOP. Entretanto, induz também tumores no fígado, vesícula biliar, pulmões e rins.

Este modelo experimental de carcinogênese pancreática é desenvolvido em hamsters. A carcinogênese é induzida pela injeção subcutânea de BOP na dose de 10 mg/kg, durante 16 semanas e os animais são sacrificados após 32 semanas. Clinicamente, desenvolvem icterícia, caquexia, ascite e trombose vascular. A maioria dos tumores pancreáticos é de adenocarcinomas ductais com ocorrência em 80 a 100% dos animais, apresentando invasão perineural e intensa reação desmoplásica. Em nível molecular apresentam mutação do K-ras no códon 12 precocemente com alta freqüência. Mutações do p53 são infreqüentes e é evento tardio (60). Os hamsters não são animais amplamente utilizados em pesquisas de laboratório como ratos e camundongos, e isso tem dificultado o uso deste modelo experimental na prática.

c) DMBA

O 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno ou 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) é um hidrocarboneto policíclico aromático produzido pela combustão incompleta de compostos orgânicos de carbono. Pode ser encontrado como subproduto da queima do tabaco e de combustíveis fósseis, no ar poluído, na água e em alimentos contaminados por resíduos da combustão do petróleo. Experimentalmente, é teratogênico e mutagênico em animais, produzindo neoplasias de pele, cavidade oral, pulmões, mama e pâncreas (64).

O primeiro experimento foi conduzido por Dissin, em 1975(10), que implantou, por meio de incisão e sutura em bolsa, 2-3 mg de DMBA na região cefálica do pâncreas, em 35 ratos machos Sprague-Dawley (27 do grupo DMBA e 9 controles). Histologicamente, 14 animais desenvolveram adenocarcinomas bem diferenciados(10).

Rivera e colaboradores (11) avaliaram a eficácia da implantação parenquimatosa, da injeção intraductal do DMBA associadas ou não a pancreatectomia subtotal em ratos, após período de 10 meses de observação. Estes autores descreveram o adenocarcinoma ductal em 19/49(39%) e metástases peritoniais em 3/49(6%). A associação de pancreatectomia não aumentou a frequência das lesões.

Uma grande questão é sobre a origem das células ductais neste modelo: se os tumores se originam nos ductos, invadindo os lóbulos e células acinares, ou se o fenótipo ductal é consequência da desdiferenciação de células acinares em ductais. Bockman e cols.(1976)(12) analisaram por microscopia eletrônica as

organelas citoplasmáticas nos adenocarcinomas ductais induzidos pelo DMBA. Os resultados demonstraram a presença aumentada de retículo endoplasmático rugoso, característica comum às células acinares (12). O mesmo resultado foi encontrado quanto à origem dos complexos tubulares (arranjos de estruturas ductais presentes na circunvizinhança do sítio de implantação do DMBA), quando estudada pelo mesmo autor. A explicação para o arranjo estrutural ductal foi a diminuição dos complexos de Golgi no citoplasma (65). Por sua vez, Jimenez e cols. (13) avaliaram as lesões induzidas pela implantação do DMBA em 2 semanas, 1 mês e 9 meses, quanto à presença de queratina e citoqueratina 19 e 20 (marcadores de células ductais), quimotripsina (marcador para células acinares) e cromogranina A (marcador para ilhotas), comparando-os a amostras de adenocarcinomas humanos. O resultado foi que os complexos tubulares e adenocarcinomas em ratos apresentaram expressão forte de queratinas e citoqueratinas 19 e 20, nenhuma expressão de quimotripsina e expressão rara de cromogranina A. Os carcinomas humanos apresentaram expressão forte de queratina e citoqueratina 19, expressão de citoqueratina 20 em 15 a 20% das células, ausência de quimotripsina e cromogranina A. Com base nestes dados, a conclusão foi de que a célula precursora destas neoplasias é a ductal (13).

Contudo, Bockman e cols.(66) implantaram o DMBA no pâncreas de ratos e avaliaram as alterações histopatológicas locais em 24 horas, 48 horas, 4 dias; 1 e 2 semanas e 1, 3 e 4 meses após. Os autores concluíram que os complexos tubulares são precursores dos adenocarcinomas e que estas lesões precursoras têm origem na desdiferenciação das células acinares.

Z'Graggen e cols. avaliaram o papel da dieta hiperlipídica e hiperprotéica (HL/HP) na gênese do adenocarcinoma ductal induzido por DMBA (67). A prevalência de adenocarcinoma, ao final de 9 meses, foi 17% no grupo de dieta normal e de 29% no grupo de dieta HL/HP. No mesmo experimento, a mensuração da expressão do K-ras códon 12 mutante foi proporcionalmente aumentando, conforme o grau de alteração patológica: pâncreas normal (0%), hiperplasia ductal (21%), displasia ou carcinoma *in situ* (50%) e adenocarcinoma invasivo (90%). Este estudo corrobora a propriedade do modelo da DMBA na indução química da carcinogênese pancreática de provocar as alterações no K-ras como no ADP humano.

Zehnder e cols.(14) adotaram este modelo para uso em camundongos, apresentando resultados semelhantes, mas com diminuição do tempo de indução da carcinogênese para apenas 60 dias com prevalência de 72% de displasia/adenocarcinoma (14). Este estudo foi apresentado no Congresso da IHPBA (International Hepato Pancreato Biliary Association), em Brisbane, Austrália, em 2000 e publicado sob forma de resumo.

A adoção do camundongo como animal de experimentação neste modelo reduziu o tempo de indução da carcinogênese. Este animal, pela sua maior disponibilidade, permite também a utilização de amostra(n) maior, quando comparado a outros animais.

A classificação publicada por Hruban e cols.(1) para caracterizar as lesões precursoras (PanIN) do ADP neste modelo experimental em camundongos foi objeto de estudo recente de tese de doutorado, em que o modelo foi eficaz na

indução da carcinogênese pancreática(68). Os efeitos do álcool e da cafeína não foram avaliados neste modelo experimental.

Cafeína e carcinogênese

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina, $C_8H_{10}N_4O_2$) é uma substância exógena, presente em várias plantas distribuídas pelo mundo. Sua obtenção a partir de grãos de café foi descrita em 1820, a sua estrutura definida em 1875, e sua síntese realizada em 1895, *apud* Schirmer(69). É um pó branco, inodoro, com gosto amargo, densidade de 1,23 e solubilidade na água de 1 grama em 46ml, na temperatura de 20 °C.

Diversos alimentos, principalmente bebidas, consumidos diariamente contêm quantidades variáveis de cafeína (Tabela 1).

Tabela 1 : Concentração de cafeína em algumas bebidas

Bebida(180ml)	Cafeína (mg)
Chá	40-100
Café passado	100-150
Café instantâneo	60-80
Café descafeinado	1-6
Refrigerante tipo cola	17-55

Fonte: Hand Book of Pediatric Drug Therapy, 1990

Aproximadamente 80 a 90% da cafeína extraída dos grãos de café verdes é usada na indústria de bebidas e na indústria farmacêutica. A principal fonte de cafeína é o café. Mais de 60 espécies de plantas conhecidas no mundo contêm cafeína, entre elas a “*ilex paraguariensis*”. As folhas desta planta são utilizadas no preparo do mate (chimarrão) nas regiões sul do Brasil e da América do Sul, e apresentam níveis importantes de cafeína.

A cafeína é considerada, junto com o tabaco, uma das substâncias psicoativas mais consumidas no mundo (70). O efeito estimulante sobre o sistema nervoso central, manifestado pela capacidade de manter esforço intelectual, é provavelmente o motivo que torna seu uso tão popular. O aumento progressivo da dose ingerida causa ansiedade, inquietude, insônia, hiperestesia, podendo progredir para convulsões focais e generalizadas (71).

As estimativas de consumo “per capita” de cafeína por dia no mundo é de 70mg/dia. A quantidade consumida varia muito conforme o país: EUA, 211mg/dia; Canadá, 238mg/dia; Suécia, 425mg/dia e Inglaterra, 444mg/dia. Considerando-se que um adulto pesa em média 70kg, observamos que este consumo é de 3mg/kg/dia nos Estados Unidos e aumenta progressivamente para mais de 6mg/kg/dia na Inglaterra. A tendência atual é de aumento no consumo diário de cafeína, devido à ingesta crescente de alimentos que contêm cafeína, principalmente chocolates e refrigerantes (72).

Estudos experimentais com animais demonstram que a cafeína é rápida e completamente absorvida e distribuída pelo sistema gastrointestinal e está presente em todos os tecidos em 5 minutos. A fração da droga no plasma ligada à

albumina varia de 10-30% e é excretada, após metabolização hepática, por via renal. A meia vida em camundongos e ratos é de 0,7 a 1 hora, com limite na capacidade de absorção e metabolização de 10-25mg/kg/dia (73).

O metabolismo da cafeína em humanos é quase que exclusivamente hepático(97%) pelas enzimas microsossomiais do sistema citocromo P-450. Estas enzimas são responsáveis pela demetilação da cafeína, que é um dos principais passos da sua metabolização. A enzima CYP1A2 metaboliza a cafeína em paraxantina e é a rota predominante da demetilação. Nos roedores, entre eles o camundongo, a metabolização é muito semelhante a dos humanos com formação de dimetilxantinas e de derivados uracil. A toxicidade da cafeína é dose dependente, podendo levar à convulsões e morte em intoxicações agudas. A dose tóxica via oral para camundongos é de 127mg/kg (74).

Diversos estudos experimentais em animais estudaram os possíveis efeitos da cafeína associada a drogas conhecidamente carcinogênicas. Nakanishi e cols. (75) e Kunze e cols. (76) estudaram a ação da cafeína administrada na água de beber associada ao carcinógeno N-nitroso-N-butil sobre a bexiga urinária de ratos e não observaram qualquer efeito.

Trabalhos semelhantes abordaram o papel da cafeína em neoplasia mamária de ratas, induzida pelo DMBA. Welsh e cols. (77) não observaram qualquer efeito da cafeína, porém Milton e cols. (78) relatam diminuição do período de latência e aumento do número de tumores mamários por animal. Outro estudo demonstrou que a cafeína exerce potente efeito quimio-preventivo na mama, mas age como co-carcinógeno no cólon (79).

Os efeitos da cafeína sobre o metabolismo, estrutura e função do DNA são os seguintes: indução de mitoses prematuras, inibição da excisão de bases danificadas, reversão da depressão na síntese do DNA induzida por agentes específicos e diminuição nos sítios de replicação (80).

Estudo epidemiológico tipo coorte com 10.064 participantes, avaliando o efeito da cafeína na hipertensão e na mortalidade por câncer em qualquer órgão, não demonstrou associação da droga com neoplasia (81). Outro estudo caso-controle, realizado na Dinamarca encontrou fraca associação entre o consumo de cafeína em chás e café e carcinoma de bexiga urinária, mesmo após o ajuste para a idade, tabaco e outras bebidas (82).

Estudo prospectivo, realizado na Noruega com 16.713 indivíduos para avaliar potenciais fatores de risco do câncer de pâncreas, demonstrou associação entre o consumo de álcool e câncer de pâncreas e não demonstrou associação entre ingestão de café e câncer de pâncreas (83).

Estudo de caso-controle, envolvendo 141 pacientes com câncer de pâncreas e 282 controles realizado no Japão em 1996 (84), demonstrou relação entre a dose ingerida de café e câncer de pâncreas. Estes autores concluíram que pequenas quantidades de café ingeridas pareciam prevenir o câncer de pâncreas, enquanto doses elevadas poderiam causar a doença.

Estudo semelhante multicêntrico com 570 pacientes com câncer de pâncreas e com 570 controles foi realizado na Itália. Este estudo demonstrou associação entre consumo de mais de 3 taças de café por dia e câncer de pâncreas, mesmo controlando eventuais fatores de confusão como o fumo e o álcool. Esta

associação persistiu quando a análise foi restrita aos usuários de café não-fumantes(85).

Álcool e Carcinogênese

Em modelos animais, o consumo de álcool pode aumentar o efeito de substâncias carcinogênicas (86),(87). Os principais mecanismos responsáveis pela carcinogênese relacionada ao álcool são os seguintes:

a) Acetaldeído: o acetaldeído, um produto do metabolismo do álcool, é carcinogênico em modelos animais (86).

b) Solvente: alguns carcinógenos, quando em solução alcoólica, possuem maior efeito em animais, possivelmente devido ao efeito solvente do álcool (86).

c) Dieta: entre os alcoólatras mal-nutridos, a baixa ingestão de frutas e vegetais pode aumentar o efeito do álcool na carcinogênese de esôfago (87).

d) O consumo de álcool diminui a quantidade de vitamina A armazenada no fígado. A vitamina A interfere no controle da diferenciação celular, processo importante na carcinogênese (88).

e) Alteração enzimática: o álcool diminui a destoxificação por inibir a enzima citocromo P450, levando à metabolização mais lenta de carcinógenos no fígado de alcoólatras (89).

f) O consumo de álcool aumenta os níveis séricos de estrógenos e altera também os níveis de outros hormônios em humanos (90).

g) Função imunológica: o álcool deprime a função imunológica (89).

h) O consumo de álcool aumenta a proliferação celular (91),(92).

Estudos epidemiológicos comprovam que o consumo de álcool causa câncer da boca, faringe, laringe, esôfago e fígado em humanos (86),(93). O uso abusivo de álcool aumenta o risco de cirrose hepática que, por sua vez, aumenta o risco de carcinoma hepatocelular (94).

Gapstur e cols. (95) observaram em estudo de coorte com 41.837 mulheres que o consumo de álcool aumenta, em aproximadamente 50%, o risco de câncer de mama, mas dados epidemiológicos variam de estudo para estudo e a relação entre câncer de mama e álcool não está clara (93).

Evidências epidemiológicas de associação causal entre álcool e câncer de intestino grosso é considerada sugestiva, mas não conclusiva (86).

A associação de álcool com câncer de pâncreas é controversa, pois estudos não demonstraram esta relação (96),(97),(98),(99),(100),(101),(102), enquanto outros admitiram esta relação (103),(104),(105), mesmo ajustando para o hábito de fumar. Evidências epidemiológicas indiretas sugerem que o álcool pode ser um fraco fator causal de câncer de pâncreas (93). O consumo de álcool aumenta o risco de pancreatite (106) e pancreatite aumenta o risco de câncer (26).

Assim, considerando as controvérsias existentes relacionadas ao efeito do álcool e da cafeína na carcinogênese pancreática, e, em especial, na promoção de lesões precursoras, optou-se por estudar seus efeitos em modelo experimental de indução pelo DMBA, utilizando o camundongo como animal de experimentação.

MÉTODOS

Realizou-se um estudo experimental em camundongos para estudar as lesões precursoras e a carcinogênese pancreática induzida pelo DMBA e avaliar os efeitos do álcool e da cafeína neste modelo experimental. A carcinogênese pancreática foi induzida conforme técnica descrita por Dissin e cols.(10), Rivera e cols.(11) e Zehnder e cols.(14).

Os procedimentos cirúrgicos experimentais foram realizados no Centro de Cirurgia Experimental (CCE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A análise histológica foi feita no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Serviço de Patologia do mesmo hospital.

1) Modelo Animal

Foram utilizados 120 camundongos *mus musculus* da cepa CF1, machos, adultos, com três meses de idade no início do experimento, provenientes do biotério da Divisão de Produção e Experimentação Animal da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul. Os animais foram albergados no CCE do HCPA, em ciclo circadiano de luminosidade de 12 horas com controle ambiental da temperatura entre 18-23°C e umidade entre 40-70%. Foram mantidos em caixas de polipropileno com tampas de arame gradeadas e com dimensões de 35x50x20cm, em número de cinco animais por caixa. O fundo das caixas foi recoberto com serragem esterilizada em autoclave trocada três

vezes por semana. Os animais foram alimentados com ração Nuvital CR® e recebiam água “ad libitum”.

1.1) Divisão dos Grupos

Os animais foram divididos em quatro grupos (Tabela 2):

Grupo Água + DMBA: denominado grupo controle do experimento. Neste grupo, os animais foram submetidos à laparotomia mediana, dissecação e identificação do pâncreas e implantação de 1 mg de DMBA no pâncreas. Esses animais recebiam para beber apenas água, tanto no período pré-operatório como no período pós-operatório.

Grupo Álcool + DMBA: neste grupo, os animais receberam álcool diluído na água de beber, por 30 dias no pré-operatório e por mais 30 dias no pós-operatório. Foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico que os animais do grupo anterior com implantação de DMBA no pâncreas.

Grupo Cafeína + DMBA: neste grupo, os animais receberam cafeína diluída na água de beber, por 30 dias no pré-operatório e por mais 30 dias no pós-operatório. Também foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico que os animais do grupo anterior com implantação de DMBA no pâncreas.

Grupo Álcool+Cafeína + DMBA: neste grupo, os animais receberam álcool e cafeína diluídos na água de beber, igualmente por 30 dias nos períodos pré e pós-operatórios e foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico que os animais dos demais grupos.

Tabela 2 : Caracterização dos grupos do experimento

Grupo	Pâncreas	Pré-operatório¹	Pós-operatório²
Água	DMBA	Água	Água
Álcool	DMBA	Álcool	Álcool
Cafeína	DMBA	Cafeína	Cafeína
Álcool+Cafeína	DMBA	Álcool+Cafeína	Álcool+Cafeína

¹: Períodos pré-operatório com 30 dias de duração.

²: Período pós-operatório com 30 dias de duração.

O estudo teve duração de 60 dias para cada grupo. Ao final deste período os animais sobreviventes foram mortos.

1.2) Soluções

a)Cafeína:

A cafeína anidra pura, 1,3,7-trimetilxantina,(Caffeine, lote110K0264, referência C-0750, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) (Anexo 2) utilizada foi dissolvida em água à temperatura ambiente e acondicionada em galões plásticos.

A concentração da cafeína dissolvida na água de beber foi de 40mg de cafeína / 1000ml de água. Esta concentração foi definida, baseada em estudos que comprovam que o maior consumo “per capita” de cafeína em humanos é de 6mg/kg/dia na Inglaterra. Assim, baseado em estudo prévio (69) que definiu que o consumo médio de água, por camundongo, com três meses de idade é de 5-6ml / 24h, logo 5 animais por gaiola consumiriam 25-30ml / 24h. Como os animais nesta idade apresentam peso médio de 40g, o consumo médio de água em 24h

para cada 100g de camundongo é igual à 15ml ou 150ml / kg de camundongo. Assim, considerando que a solução apresenta 40mg / 1000ml, o consumo médio foi de 6mg / kg de camundongo (69).

b) Álcool:

O álcool utilizado foi o álcool de cereais 96 GL, referência 101.0012.03, proveniente da Importadora Química Delaware®, Porto Alegre, Brasil.

O álcool foi diluído em água à temperatura ambiente e acondicionado em galões plásticos hermeticamente fechados e trocados semanalmente. A concentração utilizada do álcool na água de beber foi de 6% álcool/volume.

1.3) DMBA

O DMBA (9,10-Dimetil-1,2-benzantraceno, lote 21K3688, referência D3254, Sigma-Aldrich, Sant-Louis, EUA) (Anexo 1) foi implantado no pâncreas dos camundongos na forma de cristais.

O aparelho introdutor do DMBA foi preparado a partir de um cateter de punção venosa n°14, seccionando-se 2 mm a extremidade metálica e preenchendo-a com cola, formando um êmbolo. Este dispositivo foi calibrado em balança de precisão de forma a conter exatamente 1mg de cristais de DMBA no seu interior.

1.4) Anestesia

Os camundongos foram anestesiados, mediante administração de pré-medicação com atropina, na dose de 0,04mg/kg via subcutânea e 10 minutos após,

anestesia com quetamina 50mg/kg, associada à xilazina 50mg/kg via intraperitoneal . O jejum observado foi de 6 horas.

Os animais foram considerados anestesiados quando apresentavam-se inconscientes e sem reação ao manuseio cirúrgico.

1.5) Procedimento operatório

Após a indução da anestesia, o animal foi imobilizado sobre uma prancha de cortiça plastificada, mediante a fixação de seus membros com fita adesiva. A tricotomia foi realizada na região anterior do abdomen, e a limpeza da pele, com solução de álcool iodado (Figura 2).

Realizou-se uma incisão mediana com 3cm de extensão iniciando no apêndice xifóide em direção caudal, obtendo-se acesso à cavidade peritoneal (Figura 2). Em todos os animais, dissecou-se o pâncreas (porção duodenal) mediante mobilização delicada do estômago e do cólon transversos (Figura 3). Realizou-se então, sutura em bolsa com aproximadamente 5mm de diâmetro com fio de polipropileno 7-0 (Prolene®)na porção duodenal do pâncreas, tendo o cuidado para não incluir o ducto biliaropancreático na sutura. Implantou-se 1mg de DMBA em forma de cristais com auxílio de um introdutor previamente calibrado e simultaneamente fechou-se a sutura em bolsa em torno do introdutor (Figura 4). Visualizou-se, então, a bolsa no pâncreas com seu conteúdo (Figuras 5 e 6). Após revisão cuidadosa da hemostasia, a cavidade peritoneal foi fechada. A síntese da parede foi realizada com sutura contínua do plano musculoaponeurótico com fio de poligalactina 4-0. A pele foi fechada com pontos separados de mononylon 4-0. O procedimento cirúrgico durou em média 30 minutos.

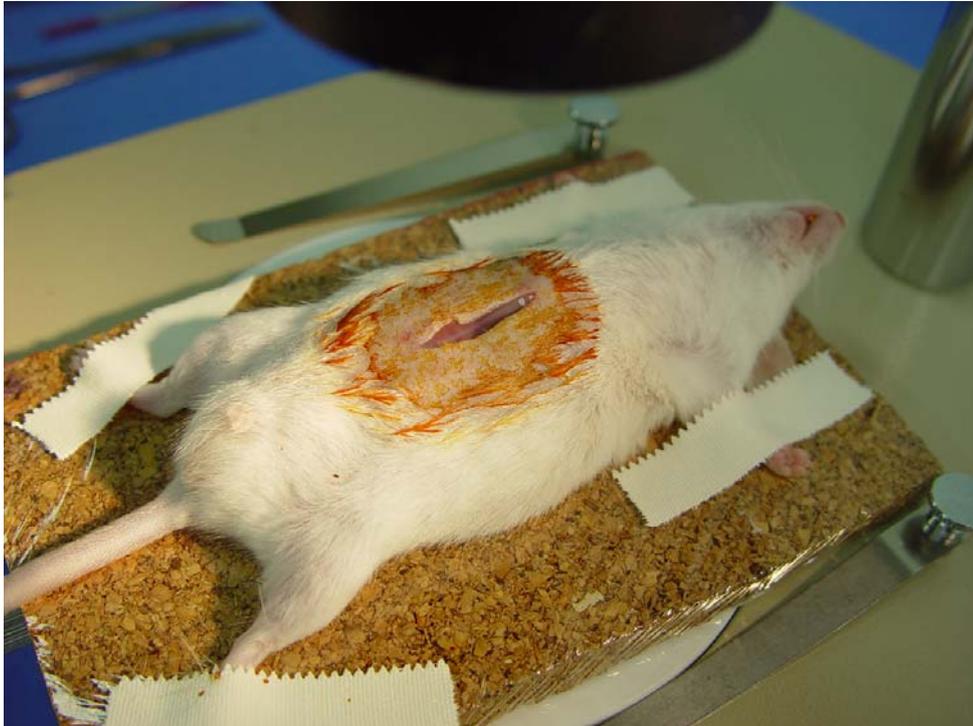


Figura 2: Antissepsia da pele e abertura da cavidade peritoneal.

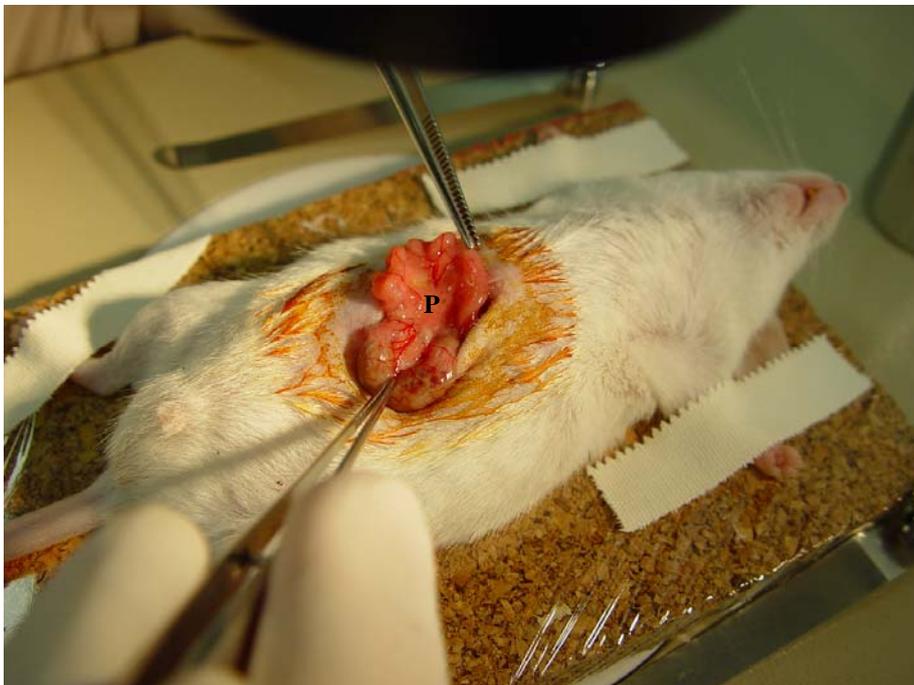


Figura 3: Mobilização do estômago e dissecação do pâncreas (P).

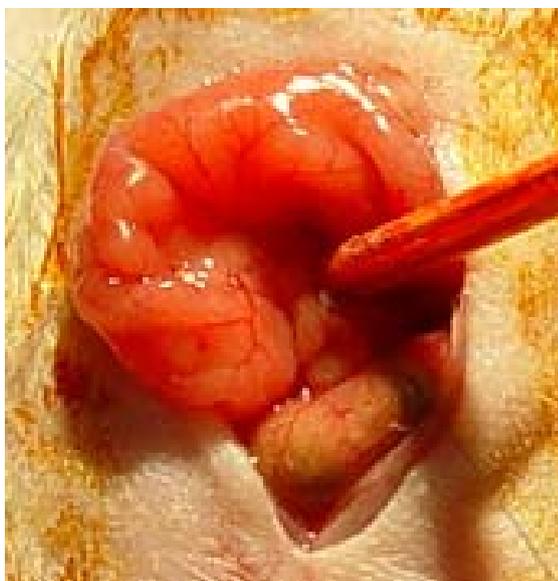


Figura 4: Introdução dos cristais de DMBA no pâncreas.

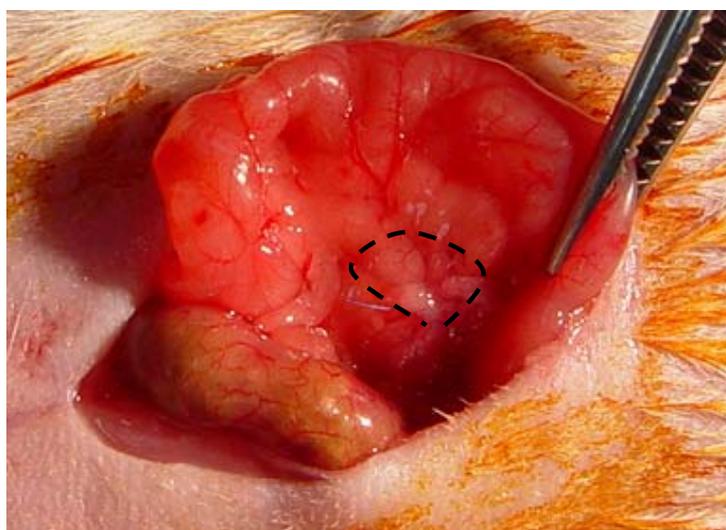


Figura 5: Visualização anterior da bolsa (tracejado).

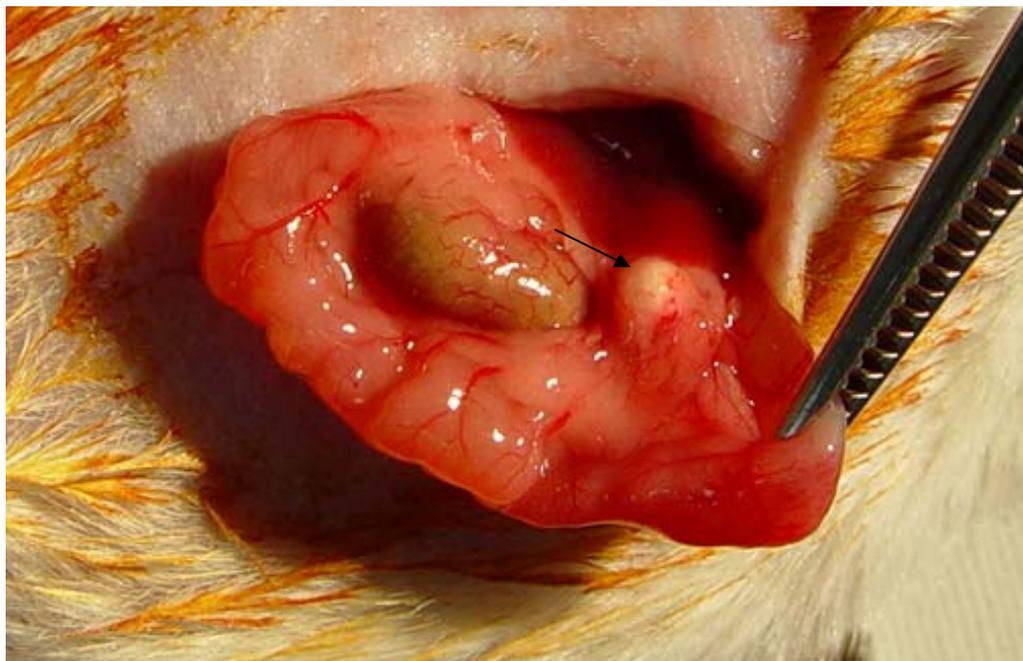


Figura 6: Visualização posterior da bolsa com seu conteúdo (seta).

O procedimento cirúrgico foi realizado com auxílio de lupa cirúrgica Olympus SD-1LK com foco de luminosidade externo Olympus TL3-115.

1.6) Pós-operatório

No período pós-operatório imediato, os animais foram transferidos para gaiolas aquecidas e permaneceram em observação. Somente após completa recuperação anestésica, os animais foram levados para as gaiolas definitivas conjuntas com outros animais também operados. Estes animais permaneceram por 30 dias, recebendo ração e solução diluída em água de beber de acordo com seu grupo e, findo este período, foram mortos.

1.7) Eutanásia dos animais

Os animais foram mortos com ciclo de 20 minutos, em câmara de gás carbônico (CO₂). A cavidade peritoneal foi aberta através da incisão anterior e

removeu-se o pâncreas mediante cuidadosa dissecação. O pâncreas removido foi então acondicionado em frascos com solução de formalina tamponada a 10% para fixação e posterior análise histológica.

2) Análise histológica

A amostra tecidual, o pâncreas, após período de fixação de 24h em formalina tamponada, foi encaminhado para processamento histológico e confecção de lâminas coradas pela técnica da hematoxilina-eosina (H&E). Para cada pâncreas foram confeccionadas três lâminas.

A análise histológica foi realizada por dois patologistas que desconheciam de qual grupo provinha cada lâmina analisada (estudo cego). Quando o diagnóstico histológico divergia, realizava-se uma terceira análise histológica, em conjunto com os dois patologistas, obtendo-se o consenso no diagnóstico.

2.1) Critérios histológicos

Os diagnósticos histológicos foram baseados nos seguintes critérios:

a) Normal: quando houvesse preservação completa da arquitetura pancreática glandular e celular;

b) Hiperplasia reacional: aumento do número de ductos e células ductais predominantemente nas proximidades da bolsa de DMBA, relacionada à formação de complexos tubulares.

c) PanIN (1) (Neoplasia Pancreática Intra-epitelial)

c-1) Neoplasia Pancreática Intra-epitelial 1A (PanIN-1A): lesões planas compostas por células de epitélio colunar alto, com núcleo basal e mucina citoplasmática supranuclear. Os núcleos são pequenos de forma redonda ou ovalada, quando ovais seu maior eixo longitudinal é perpendicular à membrana basal.

c-2) Neoplasia Pancreática Intra-epitelial 1B (PanIN-1B): são lesões semelhantes ao PanIN-1A, exceto pelo formato papilar, micropapilar ou de pseudoestratificação basal.

c-3) Neoplasia Pancreática Intra-epitelial 2 (PanIN-2): estruturalmente são lesões mucinosas que podem ser planas, mas a maioria é papilar. Na avaliação citológica, apresentam núcleos aumentados em tamanho e número, hipercromáticos, com perda da polaridade e pseudoestratificação. Mitoses são raras e, quando presentes, são basais.

c-4) Neoplasia Pancreática Intra-epitelial 3 (PanIN-3): estruturalmente, na sua maioria, são lesões papilares ou micropapilares, raramente, planas. São cribiformes e o desprendimento de grupos de células (decapitação) ou necrose intraluminal sugere o diagnóstico de PanIN-3. A citologia dessas lesões apresenta perda da polaridade dos núcleos, células calciformes distróficas (células calciformes com núcleos orientados para a porção apical, luminal da célula e a mucina citoplasmática predominante na membrana basal), mitoses anormais, irregularidades nucleares e nucléolos proeminentes (macronúcleolos). A arquitetura citonuclear é semelhante ao carcinoma, sem invasão à membrana

basal. O sinônimo para esta alteração é o carcinoma in situ (1),(107). Algumas vezes podem adotar um padrão cribiforme.

d) Carcinoma invasor: glândulas pequenas, com irregularidade de contorno, uma camada de células associadas com desmoplasia periductal e estromal hialinizada. As características celulares são de pleomorfismo, nucléolos evidentes e diminuição da relação citoplasma/núcleo. Os núcleos são de volume aumentado, com esvaziamento da cromatina e pleomórficos. Alterações glandulares com as características nucleares do PanIN-3, acrescidas de extensão irregular com infiltração glandular neoplásica da camada basal, circundada por estroma desmoplásico(108).

Na presença de mais de uma alteração no mesmo caso, sempre foi considerada a mais grave.

e) Complexos Tubulares

São arranjos de vários ductos com células ductais típicas, em substituição às células acinares, localizadas na região parenquimatosa ao redor da bolsa onde foi implantado o DMBA(66). Nestes locais, estão presentes áreas de atrofia pancreática, com proeminência do estroma fibroso, comparativamente ao glandular atrófico.

3) Ética

Este estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA.

4) Análise estatística

O programa estatístico utilizado foi o SPSS (Statistical Package for Social Science), versão 11.0. Utilizou-se o teste de qui-quadrado de Pearson e o teste exato de Fisher para avaliar a significância das comparações. O nível de significância estatística adotado foi de 5%.

RESULTADOS

1) Perdas

O modelo experimental de carcinogênese pancreática utilizou 120 camundongos, com 30 animais em cada grupo. Deste total, 33 (27,5%) morreram no período de 1 a 19 dias do período pós-operatório. As causas de óbito foram: peritonite (n:6), evisceração (n:6), pancreatite hemorrágica (n:5), anestesia (n:4), necrose intestinal (n:3), canibalismo (n:3), hemorragia (n:2), indeterminada (n:4). Esses animais foram excluídos porque seus espécimes histológicos não puderam ser utilizados para análise histológica.

A análise macroscópica das peças cirúrgicas revelou aderências do pâncreas às estruturas adjacentes e ausência de tumor visível. Dos 87 animais restantes, 5 (5,7%) foram excluídos, porque a análise histológica foi prejudicada pela autólise do material examinado; 3 do grupo álcool; 1 do grupo água; e 1 do grupo cafeína. Assim, o total de perdas foi de 38(31,6%) animais. No grupo água, as perdas foram 6 (20%), no grupo álcool foram 13(43,3%), no grupo cafeína 10(33,3%) e no grupo álcool+cafeína 9(30%)(Tabela 3). Não houve diferença estatística nas perdas entre os diferentes grupos (p:0,2780 teste qui-quadrado).

Tabela 3: Total de perdas nos diferentes grupos.

Grupos	n	Perdas
Água + DMBA	30	6(20%)
Álcool + DMBA	30	13(43,3%)
Cafeína + DMBA	30	10(33,3%)
Álcool+Cafeína + DMBA	30	9(30%)
Total	120	38(31,6%)

2) Consumo de soluções

Registrou-se detalhada e diariamente o consumo da solução para beber, oferecida aos animais de cada grupo. Dividiu-se cada grupo em período pré-operatório e pós-operatório, e calculou-se o volume médio (ml) consumido por cada animal, diariamente, nos diversos grupos (Tabela 4). O consumo da solução oferecida era registrado por gaiola, dividia-se pelo número de animais de cada gaiola e, então, calculava-se o volume médio consumido por cada animal diariamente.

Tabela 4: Média do volume (ml) de solução ingerida por camundongo diariamente nos diferentes grupos.

Grupos	Pré-operatório	Pós-operatório
Água + DMBA	8,02	6,80
Álcool + DMBA	8,90	9,10
Cafeína + DMBA	9,88	9,30
Álcool+Cafeína + DMBA	9,50	9,28

Os dados obtidos demonstraram que o consumo da solução para beber foi semelhante nos diversos grupos, observando-se apenas pequena redução no volume ingerido no grupo água no período pós-operatório.

3) Análise Histológica

Os achados histológicos variaram desde parênquima normal, formação de complexos tubulares (Figura 7), todas as alterações tipo PanIN (Figura 8), até o carcinoma invasor (Figura 9).

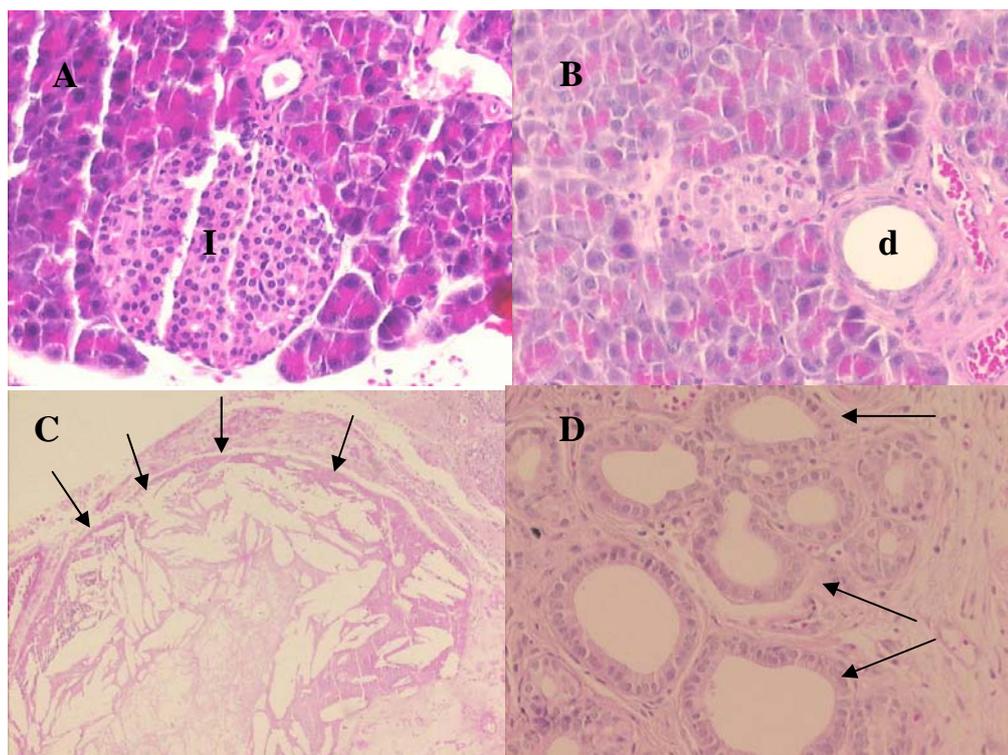


Figura 7: **A)** Parênquima pancreático normal com ilhota de Langerhans(**I**), animal do grupo água, aumento de 20x no original; **B)** Parênquima pancreático com ducto normal(**d**), animal do grupo água, aumento de 20x no original; **C)** Bolsa com cristais de DMBA (setas), aumento de 4x no original; **D)** Formação de complexos tubulares (setas), aumento de 20x no original. Lâminas coradas por H&E.

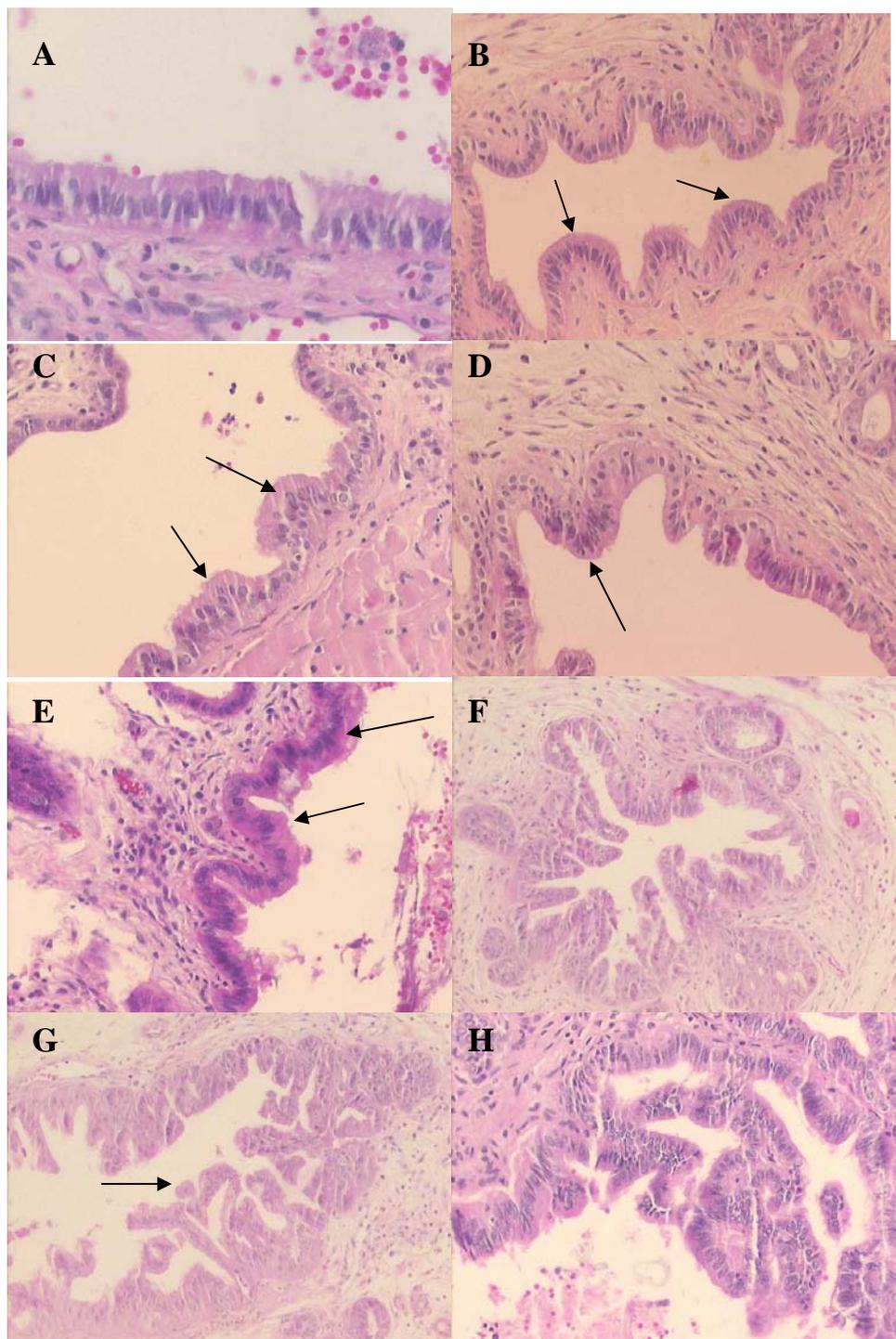


Figura 8: Lesões precursoras classificadas como PanIN: **A)** PanIN 1A com epitélio cilíndrico, aumento de 40x no original; **B)** PanIN 1B com projeções papilares (setas), aumento de 20x no original; **C)** PanIN 1B com projeções papilares (setas), aumento de 10x no original; **D)** PanIN 2 com projeção papilar com núcleos em diferentes alturas (seta), aumento de 20x no original; **E)** PanIN 2 com projeções papilares (setas), aumento de 20x no original; **F)** PanIN 3, aumento de 10x no original; **G)** PanIN 3 com decapitação (seta), aumento de 10x no original; **H)** PanIN 3 com aspecto cribiforme, aumento de 20x no original. Lâminas coradas por H&E.

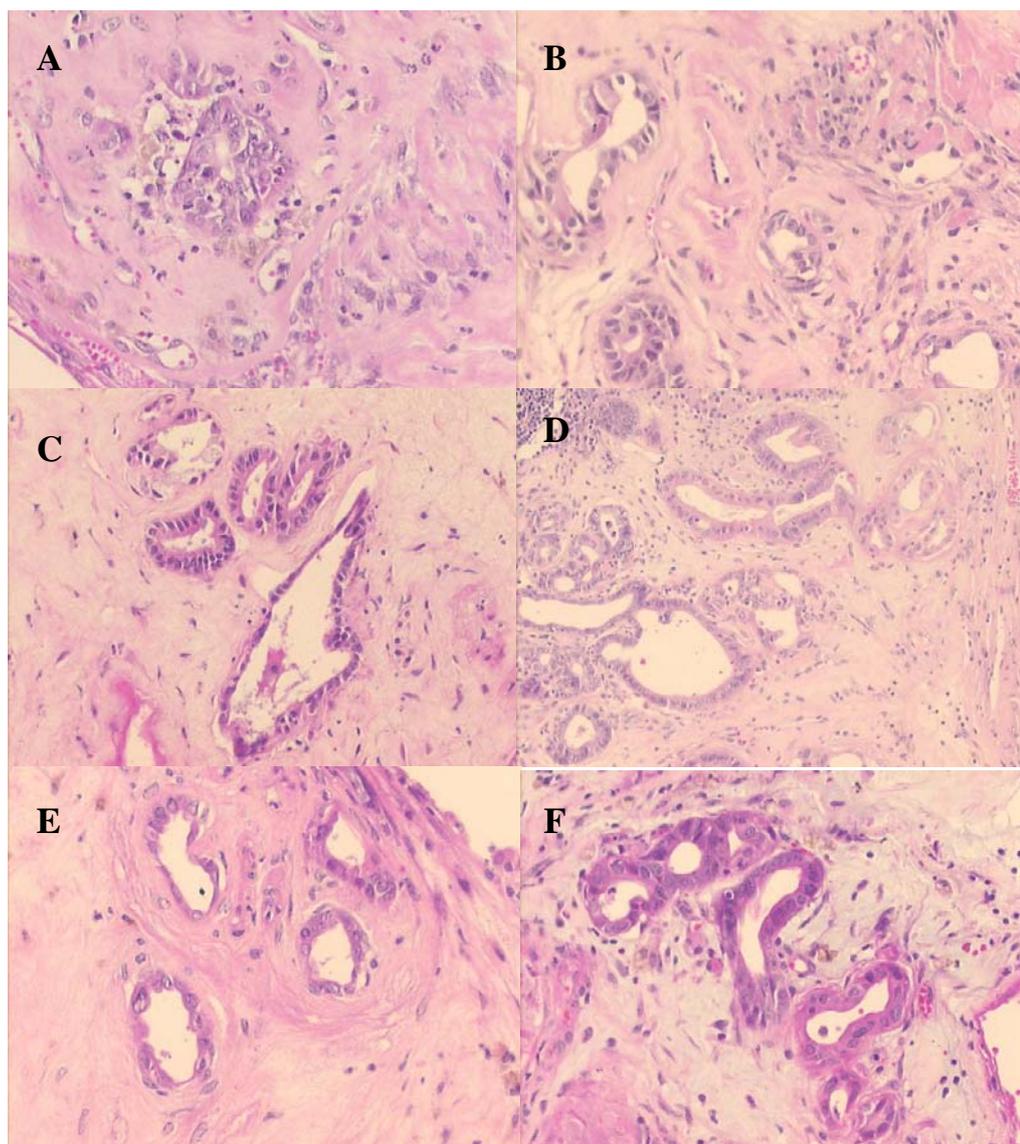


Figura 9: Cortes histológicos evidenciando adenocarcinoma invasor de pâncreas **A)** Animal do grupo álcool, aumento de 20x no original **B)** Animal do grupo álcool+cafeína, aumento de 20x no original **C)** Estroma desmoplásico com glândulas atípicas, aumento de 20x no original **D)** Animal do grupo água, aumento de 10x no original **E)** e **F)** Estroma desmoplásico com glândulas atípicas, aumento de 20x no original. Lâminas coradas por H&E.

Grupo Água + DMBA (Grupo Controle):

Na análise histológica deste grupo, de 24 animais, 16(66,6%) apresentaram alterações tipo PanIN, 4(16,6%) apresentaram adenocarcinoma e outros 4(16.6%) hiperplasia reacional. Os dados observados estão sumarizados no Figura 10.

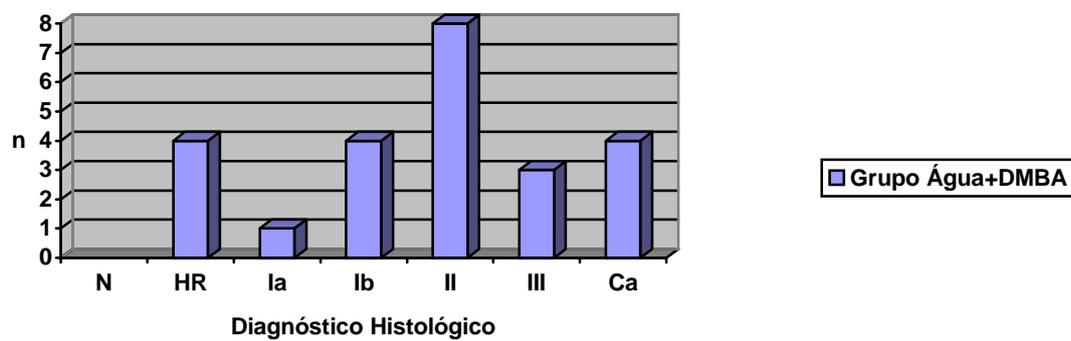


Figura 10: Frequência (n) dos diagnósticos histológicos no Grupo Água. N:normal; HR:hiperplasia reacional; Ia:PanIN 1a; Ib:PanIN 1b; II:PanIN 2; III:PanIN 3; Ca: Adenocarcinoma invasor.

Grupo Álcool + DMBA:

Este grupo foi o que apresentou a maior frequência de adenocarcinoma: 9(52,9%) de 17 animais analisados. Em 6(35,3%) animais observou-se alteração tipo PanIN. Os dados observados estão sumarizados na Figura 11.

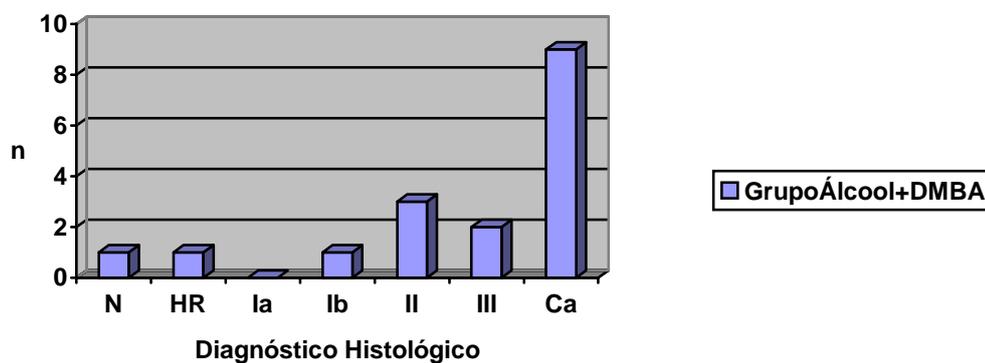


Figura 11: Frequência dos diagnósticos histológicos no Grupo Álcool. N:Normal; HR:Hiperplasia Reacional; Ia:PanIN 1a; Ib:PanIN 1b; II:PanIN 2; III: PanIN 3; Ca:Adenocarcinoma invasor.

Grupo Cafeína + DMBA:

Neste grupo, os dados obtidos foram semelhantes aos do grupo controle (grupo água): 13(65%)/20 animais com alteração tipo PanIN, 3(15%)/20 animais com adenocarcinoma e 4(20%)/20 animais com diagnóstico histológico de normal ou hiperplasia reacional. Os dados deste grupo estão sumarizados na Figura 12.

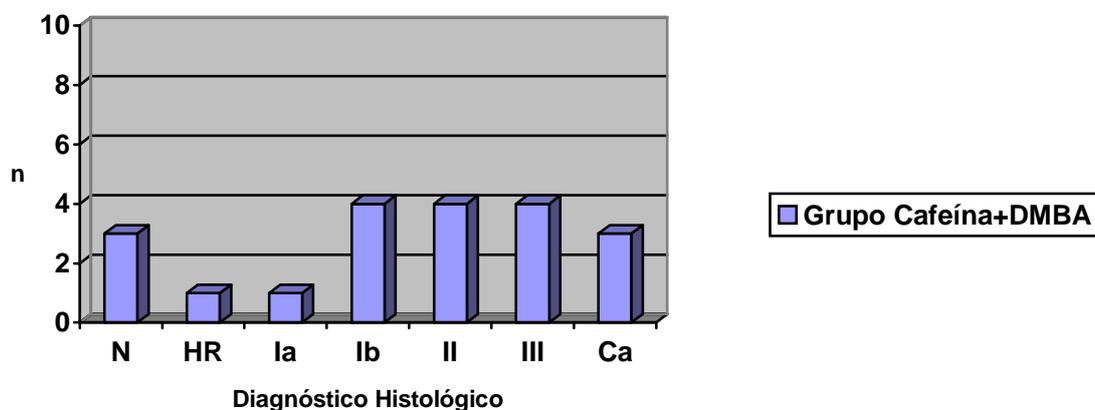


Figura 12: Frequência dos diagnósticos histológicos no Grupo Cafeína. N:Normal; HR:Hiperplasia Reacional; Ia:PanIN 1a; Ib:PanIN 1b; II:PanIN 2; III:PanIN 3; Ca:Adenocarcinoma invasor.

Grupo Álcool+Cafeína e DMBA:

Neste grupo, 5(23,8%)/21 animais apresentaram diagnóstico histológico de adenocarcinoma, enquanto 15(71,4%)/21 animais apresentaram alteração tipo PanIN. Houve importante redução nos casos de adenocarcinoma se for comparado ao grupo álcool. Os achados deste grupo estão sumarizados na Figura 13.

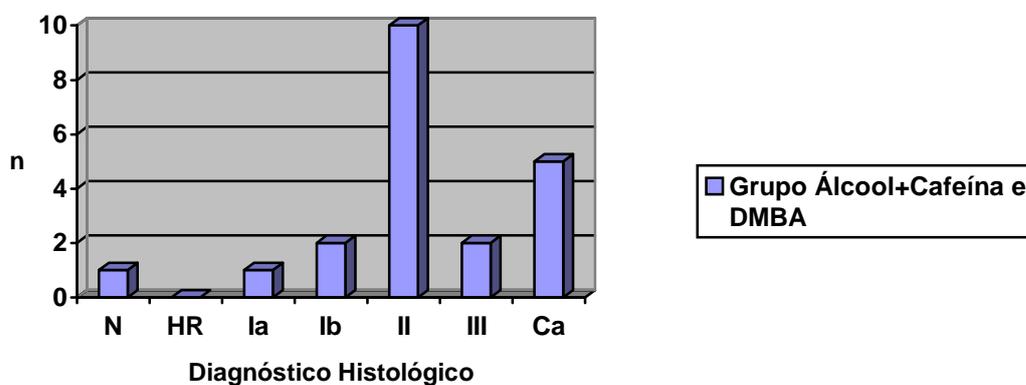


Figura 13: Frequência dos diagnósticos histológicos no Grupo Álcool+Cafeína. N:Normal; HR:Hiperplasia Reacional; Ia:PanIN 1a; Ib:PanIN 1b; II:PanIN 2; III:PanIN 3; Ca:Adenocarcinoma invasor.

Na análise estatística destes dados histopatológicos, ocorreu significância estatística na frequência de adenocarcinomas nos diferentes grupos ($p < 0,05$ teste exato de Fisher). Os dados estão na Figura 14.

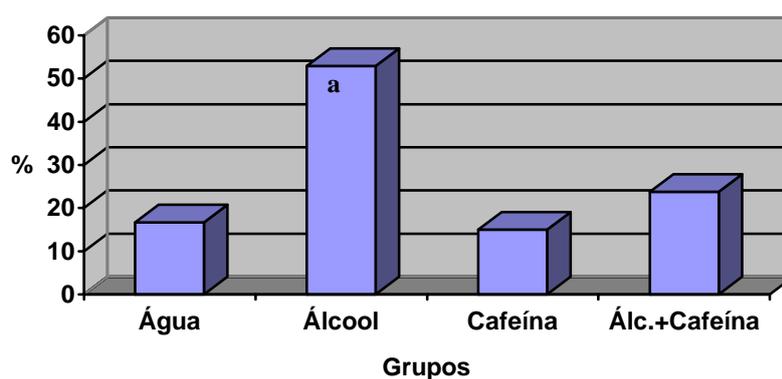


Figura 14: Frequência de adenocarcinoma nos diferentes grupos **a** :($p < 0,05$ teste exato de Fisher).

Na comparação dos grupo dois a dois, a frequência de adenocarcinoma no grupo álcool foi significativamente maior quando comparado ao grupo água e ao grupo cafeína ($p < 0,05$ teste exato de Fisher). Na comparação do grupo álcool com o grupo álcool+cafeína, observamos que houve redução da frequência de

adenocarcinoma, mas sem significância estatística ($p:0,065$ teste exato de Fisher). Na comparação dos demais grupos dois a dois, não houve significância estatística.

DISCUSSÃO

O ADP tem a menor taxa de sobrevida em 5 anos entre todos os tipos de neoplasias (5). As causas deste mau prognóstico estão relacionadas ao diagnóstico tardio, inefetividade de métodos de “screening”, características biológicas da neoplasia, situação anatômica da glândula e ausência de terapias adjuvantes eficazes (11),(109). Portanto, para o ADP “early is too late” (109). Assim, estudos recentes pretendem identificar, caracterizar e unificar a terminologia das lesões precursoras (pré-invasivas) do ADP, e suas relações com alterações genéticas moleculares específicas(8). A adoção desta nova nomenclatura para caracterizar as lesões precursoras (PanIN), conforme proposto por Hruban e cols.(1) permite comparar resultados de diferentes pesquisadores.

Este trabalho estudou as lesões precursoras do ADP em modelo experimental de carcinogênese pancreática em camundongos e avaliou os efeitos do álcool e da cafeína no referido modelo. Modelos experimentais que induzem a doença à semelhança da mesma no ser humano são fundamentais para estudar modelos de progressão e avaliar efeitos de possíveis fatores de risco.

O **modelo experimental** adotado no presente estudo foi o da indução da carcinogênese pancreática pela implantação do DMBA no pâncreas, conforme descrito previamente por Dissin e cols.(10), Bockman e cols. (12) e Rivera e cols.(11). O animal de experimentação dos estudos acima relacionados foi o rato

com período de observação que variou de 4 a 12 meses para indução de carcinogênese pancreática.

Em nosso estudo foi utilizado o camundongo como animal de experimentação conforme descrito por Zehnder e cols.(14), com redução do tempo para indução da carcinogênese pancreática. O camundongo, como animal de experimentação, além de reduzir substancialmente o tempo de indução, o que permite maior rapidez nas observações, diminui os custos da pesquisa e é um animal disponível. Por outro lado, possui algumas desvantagens, pois é animal de menor peso em relação ao rato, exigindo auxílio de lupa cirúrgica para realização do procedimento cirúrgico e, as complicações cirúrgicas são maiores, pois o mínimo sangramento representa significativa perda de volemia para o camundongo, aumentando o número de perdas.

O modelo experimental de carcinogênese pancreática adotado, utilizando o DMBA em camundongos, foi satisfatório, porque em todos os grupos estudados desenvolveram-se lesões precursoras (PanIN) e ,também, adenocarcinoma invasor.

O número total de perdas no presente estudo foi de 38(31,6%), não havendo diferença estatística entre os diversos grupos ($p:0,2780$ Teste qui-quadrado). Dissin e cols (1975) relataram perdas de 18,5%, utilizando o rato como animal de experimentação. Rivera e cols (1997), também utilizando o rato como animal de experimentação, relataram perdas de 67,3%, mas em período de observação de 10 meses. Estes autores referem em seu estudo que animais foram incluídos nos grupos, conforme as taxas de mortalidade encontradas, com o

objetivo de assegurar um número suficiente de sobreviventes nos vários tempos de sobrevivência definidos que garantissem dados significativos. Outro estudo utilizando o mesmo modelo experimental de indução de carcinogênese pancreática não faz referência a perdas(13).

Estudo utilizando grande número de animais (n:310), relatou taxa de mortalidade global de 40% (124/310)(67). O animal utilizado foi o rato e o período de observação foi de 9 meses.

Os estudos disponíveis para comparar as taxas de mortalidade utilizaram o rato como animal de experimentação. Nesse estudo, utilizou-se o camundongo, que, por tratar-se de um animal de menor peso, possui potencialmente mortalidade superior. A taxa de mortalidade global foi de 31,6%, não sendo excessivamente superior às relatadas nos demais estudos. De qualquer forma, essa taxa de perdas podem ser reduzidas com o aprimoramento da técnica anestésica e cirúrgica.

Para a confirmação da ingestão das respectivas soluções, baseou-se em estudo anterior (69), que confirmou a ingestão de cafeína por camundongos, por dosagem da cafeína sérica. Este autor encontrou uma média de consumo diário de, aproximadamente, 9 a 10 ml de solução de cafeína por animal. A média de volume diário de cafeína, consumido por camundongo, foi semelhante ao encontrado neste estudo.

A concentração da cafeína na água de beber foi de 40mg/1000ml. Conforme cálculo demonstrado anteriormente, os animais deveriam beber no mínimo 6ml/24h da solução de cafeína para consumirem a dose de 6mg/kg/dia.

Esta dose corresponde ao maior consumo diário *per capita*, observado na Inglaterra (72). Observamos que no grupo cafeína, os animais consumiram em média 9,88ml/dia no período pré-operatório e 9,30ml/dia no período pós-operatório.

A concentração do álcool na água de beber foi de 6% álcool/volume. Esta concentração foi a escolhida porque corresponde à concentração alcoólica média da cerveja. O consumo médio diário foi de 8,90ml no período pré-operatório e de 9,10ml no período pós-operatório.

A solução que associava o álcool e a cafeína apresentava concentração de 40mg/1000ml de cafeína e de 6% álcool/volume. O consumo médio diário desta solução foi de 9,50ml no período pré-operatório e de 9,28ml no período pós-operatório.

Na comparação entre os diversos grupos, observou-se que o consumo médio diário das diferentes soluções pelos animais foi semelhante.

Na **análise histológica**, adotou-se a classificação proposta por Hruban e cols.(1) para caracterizar as lesões precursoras do ADP. Esta classificação foi originalmente proposta por Klimstra e Longnecker, em 1994(57), e tornou-se consenso internacional recentemente, após reunião do Pancreas Cancer Think Tank, realizada em Park City, Utah, EUA, de 16 a 19 de setembro de 1999. As definições originais de PanIN foram oficialmente publicadas em 2001(1).

Estudos anteriores utilizando o mesmo modelo experimental não adotaram esta classificação para descrever as lesões precursoras do ADP. Assim, Dissin e

cols.(10) descreveram hiperplasia ductal, adenoma pancreático e adenocarcinoma bem-diferenciado de pâncreas. Bockman e cols.(12) relataram a indução de adenocarcinoma pancreático. Rivera e cols.(11) descreveram hiperplasia ductal, atipia, displasia e adenocarcinoma pancreático histologicamente similar ao ADP humano. Estes autores sugerem também que estas alterações encontradas, acompanhando o adenocarcinoma, seriam alterações pré-neoplásicas. Jimenez e cols.(13) relataram o aparecimento de complexos tubulares, próximos ao sítio de implantação do DMBA como lesões pré-neoplásicas que eram classificadas como hiperplasias ductais. Relataram também o aparecimento de adenocarcinoma pancreático invasivo. Z'gragen e cols.(67) descreveram hiperplasia, atipia, displasia, carcinoma *in situ* e adenocarcinoma invasor. Bockman e cols.(66) relataram o aparecimento de complexos tubulares como lesões pré-neoplásicas e adenocarcinoma ductal 1 mês após a indução da carcinogênese, com seu desenvolvimento próximo ao sítio de implantação do DMBA. Todos estes autores utilizaram o rato como animal de experimentação.

Zehnder e cols.(14), utilizando o camundongo como animal de experimentação, descreveram aparecimento de displasia e de adenocarcinoma, com redução do tempo de indução da carcinogênese.

Assim, pela ausência de unificação da terminologia, neste estudo adotou-se a classificação das lesões precursoras conforme recentemente publicada (1),(7),(110). Na indução da carcinogênese em camundongos, utilizando a implantação do DMBA, encontrou-se desde arquitetura pancreática normal, todos os tipos de lesões precursoras (PanIN), até carcinoma invasor nos diferentes

grupos. Isto permite comparações dos resultados encontrados com os de outros investigadores, que também adotarem esta mesma classificação sistematizada.

Outro ponto que vem sendo objeto de pesquisa é a identificação de possíveis agentes promotores ou protetores do ADP. O tabagismo é fator de risco identificado e estima-se que seja responsável por até 30% dos tumores pancreáticos e que o risco permanece aumentado por um período de 10 a 15 anos após a cessação do tabagismo (16),(9),(15),(27).

A **cafeína** foi amplamente estudada como agente indutor de diferentes tipos de neoplasias. Estudo epidemiológico tipo coorte com 10.064 pacientes não demonstrou associação da cafeína com câncer em qualquer tipo de órgão (81).

Estudo caso-controle com 141 pacientes e 282 controles demonstrou associação entre a dose ingerida de cafeína e câncer de pâncreas (84). Da mesma forma, estudo multicêntrico caso-controle realizado na Itália com 570 pacientes e 570 controles igualmente encontrou associação entre a dose ingerida de cafeína e o câncer de pâncreas (85). Estudo epidemiológico tipo coorte, realizado no Japão com mais de 175.000 pacientes para identificar fatores de risco no câncer de pâncreas, demonstrou aumento do risco nos pacientes com consumo elevado de cafeína (111). Estudo caso-caso, realizado na Espanha demonstrou que a ativação do oncogene k-ras é menos freqüente nos pacientes com câncer de pâncreas não-usuários de café em relação aos usuários regulares, e, assim, a cafeína poderia modular a ativação do K-ras (112).

Por outro lado, a maioria dos estudos epidemiológicos publicados não demonstra associação entre o consumo de cafeína e o câncer de pâncreas (113). Estudo prospectivo, realizado na Noruega com 16713 indivíduos não demonstrou associação entre cafeína e câncer de pâncreas (83). Estudo canadense caso-controle com 583 pacientes e 4813 controles, igualmente não demonstrou associação da cafeína e o câncer de pâncreas (114). Recentemente foi publicado estudo prospectivo com duas coortes nos EUA, que consistia de 51.529 homens e 121.700 mulheres com ocorrência de 288 casos de câncer de pâncreas. Não foi demonstrado aumento de risco de câncer de pâncreas entre os usuários de café (115).

No presente estudo, não evidenciou-se maior frequência de adenocarcinoma invasor no grupo cafeína, sendo que a frequência relativa de adenocarcinoma neste grupo foi semelhante ao grupo água. Na comparação do grupo álcool com o grupo álcool+cafeína, observamos redução da frequência de adenocarcinoma no grupo álcool+cafeína, mas que não alcançou significância estatística ($p:0,065$ teste exato de Fisher). Se o tamanho da amostra fosse maior, talvez se obtivesse significância estatística, o que poderia demonstrar possível efeito protetor da cafeína neste modelo experimental.

A associação entre o consumo de **álcool** e desenvolvimento do ADP também vem sendo amplamente pesquisada. Estudos epidemiológicos, sobre consumo de álcool e risco de câncer em humanos, demonstraram risco aumentado de câncer de boca, faringe, laringe, esôfago e fígado entre alcoólatras. A

associação entre consumo de álcool e câncer de mama e câncer de cólon não está clara. Evidências epidemiológicas sugerem que o álcool pode ser um fraco fator causal no câncer de pâncreas (116),(93).

Estudo prospectivo com duas coortes, conduzido nos EUA com 51.529 homens e com 121.700 mulheres não evidenciou associação entre o consumo de álcool e câncer de pâncreas (115). Estudo caso-controle canadense com 583 pacientes e 4813 controles igualmente não demonstrou associação entre consumo de diferentes tipos de bebidas alcoólicas e câncer de pâncreas (114). Estudo japonês, prospectivo, tipo coorte com 110.790 homens e com 64.327 mulheres também não evidenciou aumento de risco de câncer de pâncreas entre consumidores de álcool (111).

Contrariamente, estudo prospectivo tipo coorte conduzido na Noruega em 16.713 indivíduos, ocorreram 63 casos de câncer de pâncreas demonstrando forte associação entre consumo de álcool e câncer de pâncreas (83). Estudo sueco recente, tipo coorte com 178.688 indivíduos demonstrou aumento de risco de 40% de câncer de pâncreas entre alcoólatras (RR 1.4, IC 95% 1.2-1.5), mas estes autores sugerem que este risco aumentado pode ser parcialmente atribuído a maior proporção de fumantes entre os alcoólatras (117). Estudo japonês, caso-controle, recentemente publicado demonstrou aumento do risco de câncer pâncreas entre ex-alcoólatras (RR 3.70, IC 95% 2.28-6.00) (118).

No presente estudo, encontrou-se maior frequência relativa de adenocarcinoma invasor no grupo álcool quando comparado ao grupo água e ao grupo cafeína ($p < 0,05$ teste exato de Fisher), demonstrando associação entre

álcool e câncer de pâncreas neste modelo experimental. Os mecanismos principais que explicariam este efeito do álcool, de acordo com a literatura(89),(116) seriam: o acetaldeído, carcinógeno que é produto do metabolismo do álcool; o efeito solvente do álcool, aumentando o efeito de outros carcinógenos; as alterações enzimáticas no fígado, diminuindo a metabolização de carcinógenos; a diminuição da função imunológica; as alterações hormonais, como o aumento dos níveis de estrógenos e o aumento da proliferação celular (89).Não existe na literatura relato de mecanismo específico que explicasse a associação entre álcool e câncer de pâncreas, apenas evidência epidemiológica indireta, pois o consumo de álcool aumenta risco de pancreatite (106) e pancreatite aumenta o risco de câncer de pâncreas (26).

Estudos utilizando este mesmo modelo experimental, seguindo a mesma linha de pesquisa, devem ser realizados para consolidar este método, adotando a mesma classificação para descrição das lesões precursoras, conforme consenso proposto por Hruban e cols(1).

CONCLUSÕES

O modelo experimental de carcinogênese pancreática em camundongos utilizando o DMBA, é eficaz na indução de lesões precursoras e de adenocarcinoma pancreático.

No presente estudo, a frequência de adenocarcinoma pancreático no grupo álcool foi de 52,9% ($p < 0,05$), demonstrando associação entre o consumo de álcool e câncer de pâncreas neste modelo experimental. A cafeína não demonstrou este efeito.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Este modelo experimental abre uma linha de pesquisa para avaliar os efeitos de outros agentes promotores ou protetores de carcinogênese pancreática, assim como o estudo de novas opções terapêuticas. A adoção da classificação sistematizada para identificar e caracterizar as lesões precursoras permitirá a comparação de resultados com outros pesquisadores.

REFERÊNCIAS ¹

- (1) Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(5):579-586.
- (2) Yeo TP, Hruban RH, Leach SD, Wilentz RE, Sohn TA, Kern SE et al. Pancreatic cancer. *Curr Probl Cancer* 2002; 26(4):176-275.
- (3) Yeo CJ. Pancreatic cancer: 1998 update. *J Am Coll Surg* 1998; 187(4):429-442.
- (4) Postier RG. The challenge of pancreatic cancer. *Am J Surg* 2003; 186(6):579-582.
- (5) DiMagno EP, Reber HA, Tempero MA. AGA technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. American Gastroenterological Association. *Gastroenterology* 1999; 117(6):1464-1484.
- (6) Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL et al. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol* 2003; 16(9):902-912.
- (7) Takaori K, Hruban RH, Maitra A, Tanigawa N. Pancreatic intraepithelial neoplasia. *Pancreas* 2004; 28(3):257-262.
- (8) Hruban RH, Iacobuzio-Donahue C, Wilentz RE, Goggins M, Kern SE. Molecular pathology of pancreatic cancer. *Cancer J* 2001; 7(4):251-258.

¹ Bibliografia organizada de acordo com o padrão VANCOUVER.

- (9) Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet* 2004; 363(9414):1049-1057.
- (10) Dissin J, Mills LR, Mains DL, Black O, Jr., Webster PD, III. Experimental induction of pancreatic adenocarcinoma in rats. *J Natl Cancer Inst* 1975; 55(4):857-864.
- (11) Rivera JA, Graeme-Cook F, Werner J, Z'graggen K, Rustgi AK, Rattner DW et al. A rat model of pancreatic ductal adenocarcinoma: targeting chemical carcinogens. *Surgery* 1997; 122(1):82-90.
- (12) Bockman DE, Black O, Jr., Mills LR, Mainz DL, Webster PD, III. Fine structure of pancreatic adenocarcinoma induced in rats by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *J Natl Cancer Inst* 1976; 57(4):931-936.
- (13) Jimenez RE, Z'graggen K, Hartwig W, Graeme-Cook F, Warshaw AL, Fernandez-Del Castillo C. Immunohistochemical characterization of pancreatic tumors induced by dimethylbenzanthracene in rats. *Am J Pathol* 1999; 154(4):1223-1229.
- (14) Zehnder P, Z'Graggen K, Ozawa F, Mazzucchelli L, Büchler MW. First description of a carcinogen induced mouse model of ductal pancreatic adenocarcinoma: dimethylbenzanthracene induces ductal adenocarcinoma of the pancreas in a dysplasia-carcinoma type sequence. *HPB Surg* 2000; 2(2):124.
- (15) Boyle P, Maisonneuve P, Bueno dM, Ghadirian P, Howe GR, Zatonski W et al. Cigarette smoking and pancreas cancer: a case control study of the search programme of the IARC. *Int J Cancer* 1996; 67(1):63-71.
- (16) Simon B, Printz H. Epidemiologic Trends in Pancreatic Neoplasias. *Dig Dis* 2001; 19(1):6-14.
- (17) Silverman DT, Hoover RN, Brown LM, Swanson GM, Schiffman M, Greenberg RS et al. Why do Black Americans have a higher risk of pancreatic cancer than White Americans? *Epidemiology* 2003; 14(1):45-54.

- (18) Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 2003; 53(1):5-26.
- (19) Takhar AS, Palaniappan P, Dhingsa R, Lobo DN. Recent developments in diagnosis of pancreatic cancer. *BMJ* 2004; 329(7467):668-673.
- (20) BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Conprev. Atlas de mortalidade por câncer no Brasil 1979-1999. <http://www.inca.gov.br/atlas/>, -412p. : il. 2004. Rio de Janeiro: INCA, 2002. 25-5-2004. Ref Type: Electronic Citation
- (21) Informações de Saúde: Mortalidade Brasil. MS/SVS/DASIS - Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM . 2003. 14-9-2003. Ref Type: Electronic Citation
- (22) Yeo CJ, Cameron JL, Lillemoe KD, Sitzmann JV, Hruban RH, Goodman SN et al. Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas. 201 patients. *Ann Surg* 1995; 221(6):721-731.
- (23) Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA* 1995; 273(20):1605-1609.
- (24) Gapstur SM, Gann PH, Lowe W, Liu K, Colangelo L, Dyer A. Abnormal glucose metabolism and pancreatic cancer mortality. *JAMA* 2000; 283(19):2552-2558.
- (25) Michaud DS, Liu S, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS. Dietary sugar, glycemic load, and pancreatic cancer risk in a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(17):1293-1300.
- (26) Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR et al. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med* 1993; 328(20):1433-1437.

- (27) Lowenfels AB, Maisonneuve P. Environmental factors and risk of pancreatic cancer. *Pancreatology* 2003; 3(1):1-7.
- (28) Chowdhury P, MacLeod S, Udupa KB, Rayford PL. Pathophysiological effects of nicotine on the pancreas: an update. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227(7):445-454.
- (29) Hecht SS. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem Res Toxicol* 1998; 11(6):559-603.
- (30) Berrington dG, Sweetland S, Spencer E. A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2003; 89(3):519-523.
- (31) Silverman DT, Swanson CA, Gridley G, Wacholder S, Greenberg RS, Brown LM et al. Dietary and nutritional factors and pancreatic cancer: a case-control study based on direct interviews. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(22):1710-1719.
- (32) Anderson KE, Johnson TW, Lazovich D, Folsom AR. Association between nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the incidence of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(15):1168-1171.
- (33) Tascilar M, van Rees BP, Sturm PD, Tytgat GN, Hruban RH, Goodman SN et al. Pancreatic cancer after remote peptic ulcer surgery. *J Clin Pathol* 2002; 55(5):340-345.
- (34) Schernhammer ES, Michaud DS, Leitzmann MF, Giovannucci E, Colditz GA, Fuchs CS. Gallstones, cholecystectomy, and the risk for developing pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2002; 86(7):1081-1084.
- (35) Talamini G, Falconi M, Bassi C, Casetti L, Fantin A, Salvia R et al. Previous cholecystectomy, gastrectomy, and diabetes mellitus are not crucial risk factors for pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis. *Pancreas* 2001; 23(4):364-367.

- (36) La Vecchia C, Negri E, d'Avanzo B, Ferraroni M, Gramenzi A, Savoldelli R et al. Medical history, diet and pancreatic cancer. *Oncology* 1990; 47(6):463-466.
- (37) Newmark HL. Squalene, olive oil, and cancer risk. Review and hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 889:193-203.
- (38) Menezes RJ, Huber KR, Mahoney MC, Moysich KB. Regular use of aspirin and pancreatic cancer risk. *BMC Public Health* 2002; 2(1):18.
- (39) Jacobs EJ, Connell CJ, Rodriguez C, Patel AV, Calle EE, Thun MJ. Aspirin use and pancreatic cancer mortality in a large United States cohort. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(7):524-528.
- (40) Hruban RH, Offerhaus GJ, Kern SE, Goggins M, Wilentz RE, Yeo CJ. Tumor-suppressor genes in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998; 5(4):383-391.
- (41) Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB et al. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 1994; 8(1):27-32.
- (42) Schutte M, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK et al. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57(15):3126-3130.
- (43) Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M et al. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57(9):1731-1734.
- (44) Digiuseppe JA, Hruban RH, Goodman SN, Polak M, van den Berg FM, Allison DC et al. Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Clin Pathol* 1994; 101(6):684-688.
- (45) Redston MS, Caldas C, Seymour AB, Hruban RH, da Costa L, Yeo CJ et al. p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of

- homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res* 1994; 54(11):3025-3033.
- (46) Schutte M, Rozenblum E, Moskaluk CA, Guan X, Hoque AT, Hahn SA et al. An integrated high-resolution physical map of the DPC/BRCA2 region at chromosome 13q12. *Cancer Res* 1995; 55(20):4570-4574.
- (47) Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996; 271(5247):350-353.
- (48) Schutte M, Hruban RH, Hedrick L, Cho KR, Nadasdy GM, Weinstein CL et al. DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res* 1996; 56(11):2527-2530.
- (49) Goggins M, Schutte M, Lu J, Moskaluk CA, Weinstein CL, Petersen GM et al. Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1996; 56(23):5360-5364.
- (50) Ozelik H, Schmocker B, Di Nicola N, Shi XH, Langer B, Moore M et al. Germline BRCA2 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish pancreatic cancer patients. *Nat Genet* 1997; 16(1):17-18.
- (51) Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, van Weering DH, Allison DC, Goodman SN et al. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 1993; 143(2):545-554.
- (52) Goggins M, Offerhaus GJ, Hilgers W, Griffin CA, Shekher M, Tang D et al. Pancreatic adenocarcinomas with DNA replication errors (RER+) are associated with wild-type K-ras and characteristic histopathology. Poor differentiation, a syncytial growth pattern, and pushing borders suggest RER+. *Am J Pathol* 1998; 152(6):1501-1507.

- (53) Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE. Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res* 1994; 54(13):3568-3573.
- (54) Wilentz RE, Chung CH, Sturm PD, Musler A, Sohn TA, Offerhaus GJ et al. K-ras mutations in the duodenal fluid of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 1998; 82(1):96-103.
- (55) Berthelemy P, Bouisson M, Escourrou J, Vaysse N, Rumeau JL, Pradayrol L. Identification of K-ras mutations in pancreatic juice in the early diagnosis of pancreatic cancer. *Ann Intern Med* 1995; 123(3):188-191.
- (56) Hulst SPL. Zur kenntnis der Genese des Adenokarzinoms und Karzinoms des Pankreas. *Virchows Arch B* 1905; 180:288-316.
- (57) Klimstra DS, Longnecker DS. K-ras mutations in pancreatic ductal proliferative lesions. *Am J Pathol* 1994; 145(6):1547-1550.
- (58) Klein AP, Brune KA, Petersen GM, Goggins M, Tersmette AC, Offerhaus GJ et al. Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer Res* 2004; 64(7):2634-2638.
- (59) Yamano M, Fujii H, Takagaki T, Kadowaki N, Watanabe H, Shirai T. Genetic progression and divergence in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* 2000; 156(6):2123-2133.
- (60) Hotz HG, Hines OJ, Foitzik T, Reber HA. Animal models of exocrine pancreatic cancer. *Int J Colorectal Dis* 2000; 15(3):136-143.
- (61) Schmidt M, Deschner EE, Thaler HT, Clements L, Good RA. Gastrointestinal cancer studies in the human to nude mouse heterotransplant system. *Gastroenterology* 1977; 72(5 Pt 1):829-837.

- (62) Fu X, Guadagni F, Hoffman RM. A metastatic nude-mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically with histologically intact patient specimens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(12):5645-5649.
- (63) Schaeffer BK, Zurlo J, Longnecker DS. Activation of c-Ki-ras not detectable in adenomas or adenocarcinomas arising in rat pancreas. *Mol Carcinog* 1990; 3(3):165-170.
- (64) International Agency for Research on Cancer. Certain Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Heterocyclic Compounds. <http://monographs.iarc.fr/htdocs/monographs/vol32/benz%5Ba%5Danthracene.html> 32, 135-136. 17-4-2004. 2-7-2004.
- (65) Bockman DE, Black O, Jr., Mills LR, Webster PD. Origin of tubular complexes developing during induction of pancreatic adenocarcinoma by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Am J Pathol* 1978; 90(3):645-658.
- (66) Bockman DE, Guo J, Buchler P, Muller MW, Bergmann F, Friess H. Origin and development of the precursor lesions in experimental pancreatic cancer in rats. *Lab Invest* 2003; 83(6):853-859.
- (67) Z'graggen K, Warshaw AL, Werner J, Graeme-Cook F, Jimenez RE, Fernandez-Del Castillo C. Promoting effect of a high-fat/high-protein diet in DMBA-induced ductal pancreatic cancer in rats. *Ann Surg* 2001; 233(5):688-695.
- (68) Osvaldt A. Modelo experimental de lesões intra-epiteliais e de adenocarcinoma ductal pancreático induzidos por 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) em camundongos. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.
- (69) Schirmer CC. Avaliação do Efeito da Cafeína na Carcinogênese Esofágica Induzida pela Dietilnitrosamina - Estudo Experimental em Camundongos. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

- (70) Kaplan GB, Greenblatt DJ, Kent MA, Cotreau-Bibbo MM. Caffeine treatment and withdrawal in mice: relationships between dosage, concentrations, locomotor activity and A1 adenosine receptor binding. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 266(3):1563-1572.
- (71) Curatolo PW, Robertson D. The health consequences of caffeine. *Ann Intern Med* 1983; 98(5 Pt 1):641-653.
- (72) Gilbert RM. Caffeine consumption. *Prog Clin Biol Res* 1984; 158:185-213.:185-213.
- (73) Bonati M, Latini R, Tognoni G, Young JF, Garattini S. Interspecies comparison of in vivo caffeine pharmacokinetics in man, monkey, rabbit, rat, and mouse. *Drug Metab Rev* 1984; 15(7):1355-1383.
- (74) Tarka SM, Jr. The toxicology of cocoa and methylxanthines: a review of the literature. *Crit Rev Toxicol* 1982; 9(4):275-312.
- (75) Nakanishi K, Hirose M, Ogiso T, Hasegawa R, Arai M, Ito N. Effects of sodium saccharin and caffeine on the urinary bladder of rats treated with n-butyl-n-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Gann* 1980; 71(4):490-500.
- (76) Kunze E, Rath G, Graewe T. Effect of phenacetin and caffeine on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-initiated urothelial carcinogenesis in rats. *Urol Int* 1987; 42(2):108-114.
- (77) Welsch CW, Scieszka KM, Senn ER, DeHoog JV. Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine), a temperature promoter of DMBA-induced rat mammary gland carcinogenesis. *Int J Cancer* 1983; 32(4):479-484.
- (78) Minton JP, Abou-Issa H, Foecking MK, Sriram MG. Caffeine and unsaturated fat diet significantly promotes DMBA-induced breast cancer in rats. *Cancer* 1983; 51(7):1249-1253.

- (79) Hagiwara A, Boonyaphiphat P, Tanaka H, Kawabe M, Tamano S, Kaneko H et al. Organ-dependent modifying effects of caffeine, and two naturally occurring antioxidants alpha-tocopherol and n-tritriacontane-16,18-dione, on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced mammary and colonic carcinogenesis in female F344 rats. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90(4):399-405.
- (80) Roberts JJ. Mechanism of potentiation by caffeine of genotoxic damage induced by physical and chemical agents. *Nucleic Acids Symp Ser* 1984;(13):193-215.
- (81) Martin JB, Annegers JF, Curb JD, Heyden S, Howson C, Lee ES et al. Mortality patterns among hypertensives by reported level of caffeine consumption. *Prev Med* 1988; 17(3):310-320.
- (82) Jensen OM, Wahrendorf J, Knudsen JB, Sorensen BL. The Copenhagen case-control study of bladder cancer. II. Effect of coffee and other beverages. *Int J Cancer* 1986; 37(5):651-657.
- (83) Heuch I, Kvale G, Jacobsen BK, Bjelke E. Use of alcohol, tobacco and coffee, and risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer* 1983; 48(5):637-643.
- (84) Nishi M, Ohba S, Hirata K, Miyake H. Dose-response relationship between coffee and the risk of pancreas cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1996; 26(1):42-48.
- (85) Gullo L, Pezzilli R, Morselli-Labate AM. Coffee and cancer of the pancreas: an Italian multicenter study. The Italian Pancreatic Cancer Study Group. *Pancreas* 1995; 11(3):223-229.
- (86) Alcohol drinking. IARC Working Group, Lyon, 13-20 October 1987. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1988; 44:1-378.:1-378.
- (87) Garro AJ, Lieber CS. Alcohol and cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30:219-49.:219-249.
- (88) Lieber CS. Aetiology and pathogenesis of alcoholic liver disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1993; 7(3):581-608.

- (89) Blot WJ. Alcohol and cancer. *Cancer Res* 1992; 52(7 Suppl):2119s-2123s.
- (90) Gavalier JS, Deal SR, Van Thiel DH, Arria A, Allan MJ. Alcohol and estrogen levels in postmenopausal women: the spectrum of effect. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17(4):786-790.
- (91) Simanowski UA, Seitz HK, Baier B, Kommerell B, Schmidt-Gayk H, Wright NA. Chronic ethanol consumption selectively stimulates rectal cell proliferation in the rat. *Gut* 1986; 27(3):278-282.
- (92) Singletary KW, McNary MQ, Odoms AM, Nelshoppen J, Wallig MA. Ethanol consumption and DMBA-induced mammary carcinogenesis in rats. *Nutr Cancer* 1991; 16(1):13-23.
- (93) Longnecker MP, Enger SM. Epidemiologic data on alcoholic beverage consumption and risk of cancer. *Clin Chim Acta* 1996; 246(1-2):121-141.
- (94) Adami HO, Hsing AW, McLaughlin JK, Trichopoulos D, Hacker D, Ekblom A et al. Alcoholism and liver cirrhosis in the etiology of primary liver cancer. *Int J Cancer* 1992; 51(6):898-902.
- (95) Gapstur SM, Potter JD, Sellers TA, Folsom AR. Increased risk of breast cancer with alcohol consumption in postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 1992; 136(10):1221-1231.
- (96) Bouchardy C, Clavel F, La Vecchia C, Raymond L, Boyle P. Alcohol, beer and cancer of the pancreas. *Int J Cancer* 1990; 45(5):842-846.
- (97) Bueno de Mesquita HB, Maisonneuve P, Moerman CJ, Runia S, Boyle P. Lifetime consumption of alcoholic beverages, tea and coffee and exocrine carcinoma of the pancreas: a population-based case-control study in The Netherlands. *Int J Cancer* 1992; 50(4):514-522.

- (98) Clavel F, Benhamou E, Auquier A, Tarayre M, Flamant R. Coffee, alcohol, smoking and cancer of the pancreas: a case-control study. *Int J Cancer* 1989; 43(1):17-21.
- (99) Farrow DC, Davis S. Risk of pancreatic cancer in relation to medical history and the use of tobacco, alcohol and coffee. *Int J Cancer* 1990; 45(5):816-820.
- (100) Ghadirian P, Simard A, Baillargeon J. Tobacco, alcohol, and coffee and cancer of the pancreas. A population-based, case-control study in Quebec, Canada. *Cancer* 1991; 67(10):2664-2670.
- (101) Jain M, Howe GR, St Louis P, Miller AB. Coffee and alcohol as determinants of risk of pancreas cancer: a case-control study from Toronto. *Int J Cancer* 1991; 47(3):384-389.
- (102) Kalapothaki V, Tzonou A, Hsieh CC, Toupadaki N, Karakatsani A, Trichopoulos D. Tobacco, ethanol, coffee, pancreatitis, diabetes mellitus, and cholelithiasis as risk factors for pancreatic carcinoma. *Cancer Causes Control* 1993; 4(4):375-382.
- (103) Cuzick J, Babiker AG. Pancreatic cancer, alcohol, diabetes mellitus and gall-bladder disease. *Int J Cancer* 1989; 43(3):415-421.
- (104) Zatonski WA, Boyle P, Przewozniak K, Maisonneuve P, Drosik K, Walker AM. Cigarette smoking, alcohol, tea and coffee consumption and pancreas cancer risk: a case-control study from Opole, Poland. *Int J Cancer* 1993; 53(4):601-607.
- (105) Zheng W, McLaughlin JK, Gridley G, Bjelke E, Schuman LM, Silverman DT et al. A cohort study of smoking, alcohol consumption, and dietary factors for pancreatic cancer (United States). *Cancer Causes Control* 1993; 4(5):477-482.
- (106) Singh M, Simsek H. Ethanol and the pancreas. Current status. *Gastroenterology* 1990; 98(4):1051-1062.

- (107) Brat DJ, Lillemoe KD, Yeo CJ, Warfield PB, Hruban RH. Progression of pancreatic intraductal neoplasias to infiltrating adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 1998; 22(2):163-169.
- (108) Kloppel G, Luttges J. WHO-classification 2000: exocrine pancreatic tumors. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2001; 85:219-228.
- (109) Real FX. A "catastrophic hypothesis" for pancreas cancer progression. *Gastroenterology* 2003; 124(7):1958-1964.
- (110) Klein WM, Hruban RH, Klein-Szanto AJ, Wilentz RE. Direct correlation between proliferative activity and dysplasia in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): additional evidence for a recently proposed model of progression. *Mod Pathol* 2002; 15(4):441-447.
- (111) Lin Y, Tamakoshi A, Kawamura T, Inaba Y, Kikuchi S, Motohashi Y et al. Risk of pancreatic cancer in relation to alcohol drinking, coffee consumption and medical history: findings from the Japan collaborative cohort study for evaluation of cancer risk. *Int J Cancer* 2002; 99(5):742-746.
- (112) Porta M, Malats N, Alguacil J, Ruiz L, Jariod M, Carrato A et al. Coffee, pancreatic cancer, and K-ras mutations: updating the research agenda. *J Epidemiol Community Health* 2000; 54(9):656-659.
- (113) Vineis P. ras Mutations and a cup of coffee: cause, confounder, effect modifier, or what else? *J Epidemiol Community Health* 1999; 53(11):685.
- (114) Villeneuve PJ, Johnson KC, Hanley AJ, Mao Y. Alcohol, tobacco and coffee consumption and the risk of pancreatic cancer: results from the Canadian Enhanced Surveillance System case-control project. Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. *Eur J Cancer Prev* 2000; 9(1):49-58.
- (115) Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS. Coffee and alcohol consumption and the risk of pancreatic cancer in two prospective United States cohorts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10(5):429-437.

- (116) Longnecker MP. Alcohol consumption and risk of cancer in humans: an overview. *Alcohol* 1995; 12(2):87-96.
- (117) Ye W, Lagergren J, Weiderpass E, Nyren O, Adami HO, Ekblom A. Alcohol abuse and the risk of pancreatic cancer. *Gut* 2002; 51(2):236-239.
- (118) Inoue M, Tajima K, Takezaki T, Hamajima N, Hirose K, Ito H et al. Epidemiology of pancreatic cancer in Japan: a nested case-control study from the Hospital-based Epidemiologic Research Program at Aichi Cancer Center (HERPACC). *Int J Epidemiol* 2003; 32(2):257-262.

ANEXO 1



SIGMA-ALDRICH

Certificate of Analysis

Product Name	7,12-Dimethylbenz[a]anthracene
Product Number	D3254
Product Brand	SIGMA
CAS Number	57-97-6
Molecular Formula	C ₂₀ H ₁₆
Molecular Weight	256.34

**TEST
SPECIFICATION
LOT 021K3688 RESULTS**

APPEARANCE

YELLOW TO YELLOW WITH A TAN TO BROWN OR GREEN CAST POWDER
YELLOW POWDER WITH A GREEN CAST

SOLUBILITY

CLEAR TO SLIGHTLY HAZY YELLOW TO YELLOW-GREEN SOLUTION AT 50MG/ML IN TOLUENE
SLIGHTLY HAZY LIGHT YELLOW-GREEN

ELEMENTAL ANALYSIS

91.4 TO 96.0% CARBON
92.9%

PURITY BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

MINIMUM 97%
>99%

QC ACCEPTANCE DATE

FEBRUARY 2001

Lori Schulz, Manager
Analytical Services
St. Louis, Missouri USA

ANEXO 2

— —

Caffeine
Product Number
C0750
Product Brand
SIGMA
CAS Number
58-08-2
Molecular Formula
 $C_8H_{10}N_4O_2$
Molecular Weight
194.19

**TEST
SPECIFICATION
LOT 110K0264 RESULTS**

APPEARANCE
WHITE POWDER
CONFORMS

SOLUBILITY
CLEAR COLORLESS SOLUTION AT 50MG/ML IN CHLOROFORM
CONFORMS

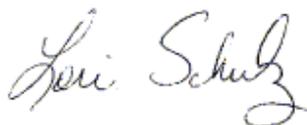
IR SPECTRUM
CONSISTENT WITH STRUCTURE
PASS

WATER CONTENT
NMT 0.5%
0.1% (BY KARL FISCHER)

ASSAY *
98.5 TO 101.0%
100.2%

SHELF LIFE SOP QC-12-006
4 YEARS
DECEMBER 2004

QC ACCEPTANCE DATE
DECEMBER 2000



Lori Schulz, Manager
Analytical Services
St. Louis, Missouri USA