

**BALDOMERO ANTONIO KATO DA SILVA**

**ELABORAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE  
CARCINOGENESE PULMONAR EM RATOS *WISTAR***

**CAMPO GRANDE – MS, 2006**

SILVA, Baldomero Antonio Kato

**Elaboração de um Modelo Experimental de Carcinogênese Pulmonar em Ratos *Wistar*. Campo Grande – MS, 2006.**

79p.

Dissertação (Mestrado) - Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Rede Centro-Oeste, convênio Universidade de Brasília, Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Elaboration of an Experimental Model of Pulmonary Carcinogenesis in *Wistar* Rats.

1. Carcinogênese 2. Câncer de Pulmão 3. Benzo[a]pireno 4. Neoplasias 5. Modelo Experimental.

**BALDOMERO ANTONIO KATO DA SILVA**

**ELABORAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE  
CARCINOGENESE PULMONAR EM RATOS *WISTAR***

Dissertação submetida ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Rede Centro-Oeste, convênio Universidade de Brasília, Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde

**Orientadora: Profa. Dra. Iandara Schettert Silva**

**Coordenador: Prof. Dr. Carlos Alberto Bezerra Thomaz**

**CAMPO GRANDE – MS, 2006**

**A mais bela coragem é a confiança que devemos  
ter na capacidade de nosso esforço**

**Coelho Neto**

**Aos meus pais e irmãs, pelas inesquecíveis lições...**

À minha companheira **Cristina Vincensi**, fonte de amor e inspiração, berço de compreensão e carinho.

Ao “irmão” **Daniel Martins Pereira**, pela amizade, amparo e presença, constantes e gratuitos em minha vida.

A todos colegas de trabalho, em especial aos amigos José Luis Feltrin Oréfice, Rogério Fernando Fontes Padilha, Juliano Coelho Arakaki, Augusto Ken Sakihama, Rosalbina Santiago Rubint Oréfice, Filipe Abdalla dos Reis, Sandra Regina Barnabé Ramalho Zoratti, Carlos Alexandre Habitante, Eliete Martins Cardoso de Carvalho, Gilberto Gonçalves Facco e Arquimedes Augusto Penha, pelo apoio e incentivo contínuos.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela grandiosidade de sua obra.

“Um professor sempre afeta a eternidade. Ele nunca saberá onde sua influência termina” (Henry Adams).

Meus mais profundos e sinceros agradecimentos à minha orientadora, **Profa. Dra. Iandara Schettert Silva**. Fonte indispensável de luz, norteando-me de forma incansável e brilhante durante a elaboração deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos**, Coordenador do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Rede Centro-Oeste em Campo Grande/MS, pela inestimável colaboração e direcionamento em nossa formação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, pela incalculável contribuição intelectual.

Ao **Prof. Dr. Paulo de Tarso Camillo de Carvalho**, por compartilhar de forma grandiosa sua vasta experiência acadêmica. Meu respeito e admiração por tudo que representa em minha formação docente.

# SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS, NOMENCLATURAS E SÍMBOLOS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	
2.1. CÂNCER.....	06
2.1.1 CÂNCER DE PULMÃO.....	08
2.1.1.1 Etiologia e Patogênese.....	09
2.1.1.2 Inflamação e Câncer.....	14
2.1.1.3 Classificação.....	15
2.1.1.4 Marcadores Biológicos no Câncer de Pulmão.....	18
2.2. MODELOS ANIMAIS DE DOENÇA.....	21
2.3. BENZO[a]PIRENO.....	24
<b>3. OBJETIVOS</b>	
3.1 OBJETIVO GERAL.....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>4. MÉTODO</b>	
4.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	28
4.1.1 Análise Estatística.....	30
4.1.2. Preparo e Análise Histológica – AgNOR.....	31
4.1.3. Preparo e Análise Histológica – HE.....	31
4.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR – AgNOR.....	33
4.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA – HE.....	33
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>
APÊNDICE.....	56
ANEXOS.....	58

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 01 – Classificação histológica do Câncer de Pulmão.....	16
Figura 01: Caracterização do grupo Proliferação Celular – AgNOR.....	33
Figura 02: Caracterização do grupo Análise Histopatológica – HE.....	34
Tabela 01: Média $\pm$ desvio padrão da quantidade de pontos NOR por célula entre os grupos controle, 10mg/kg e 20mg/kg após 07 e 21 dias...	35
Figura 03 – Média e desvio padrão dos pontos NOR por células, comparação entre grupo experimental 10mg/kg após 07 ( $1,51\pm 0,86$ ) e 21 ( $1,84\pm 0,13$ ) dias da injeção de B[a]P.....	36
Figura 04 – Média e desvio padrão dos pontos NOR por células, comparação entre grupo experimental 20mg/kg após 07 e 21 dias da injeção de B[a]P.....	37
Figura 05 – Média e desvio padrão dos pontos NOR por células, comparação entre grupos controle após 07 ( $0,81\pm 0,13$ ) e 21 ( $0,71\pm 0,21$ ) dias da injeção de álcool 70%.....	38
Figura 06 – Média e desvio padrão dos pontos NOR por células, comparação entre os três grupos controle após 07 dias.....	39
Figura 07 – Média e desvio padrão dos pontos NOR por células, comparação entre os três grupos controle após 21 dias.....	40
Quadro 02 – Descrição dos achados histopatológicos por grupo estudado nos períodos 8, 10, 12 e 14 semanas.....	41
Figura 08: Microscopia das secções pulmonares do grupo Controle.....	42
Figura 09: Microscopia das secções pulmonares do grupo 10mg/kg.....	43
Figura 10: Microscopia das secções pulmonares do grupo 20mg/kg.....	44
Figura 11: Microscopia de secção pulmonar. Grupo 20mg/kg, 12 semanas.....	44
Figura 12: Posicionamento e incisão utilizados para retirada do pulmão...	57
Figura 13: Sistema respiratório após retirada.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS, NOMENCLATURAS E SÍMBOLOS

AgNOR – Região Organizadora Nucleolar Argirofílica

B[a]P – Benzo[a]pireno

BALT – Bronchial Associated Lymphoid Tissue

DNA – Ácido desoxirribonucléico

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – Óxido Férnico

HAP – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

HE – Hematoxilina e Eosina

NOR – Região Organizadora Nucleolar

RNA<sub>m</sub> – Ácido ribonucléico mensageiro

RNA<sub>r</sub> – Ácido ribonucléico ribossômico

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi elaborar um modelo experimental de carcinogênese pulmonar em ratos wistar. Para tanto, foi realizada injeção intra-pulmonar da diluição em álcool 70% de Benzo[a]pireno (B[a]P), um hidrocarboneto aromático policíclico amplamente conhecido por seu poder de indução tumoral. Após realização de estudo para verificação do grau de proliferação celular induzido pelo B[a]P, cuja confirmação pôde ser obtida através da análise histológica dos pontos de regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR) 03 semanas após a injeção (10mg/kg =  $1,84 \pm 0,13$ ; 20mg/kg =  $2,48 \pm 0,28$ ), foram formados três grupos experimentais com 08 animais cada: Grupo Controle (álcool 70%); Grupo B[a]P 10 mg/kg; e Grupo B[a]P 20mg/kg, submetidos a eutanásia 08, 10, 12 e 14 semanas após o procedimento experimental. As secções pulmonares foram coradas por hematoxilina e eosina (HE) e submetidas a análise morfométrica para descrição das alterações teciduais. Em todos os grupos observou-se a presença de alterações inflamatórias difusas, porém na análise do tecido pulmonar dos grupos experimentais, observou-se alterações hiperplásicas (hiperplasia de BALT), e em um dos animais do grupo experimental 20mg/kg (12 semanas) notou-se a presença de pleomorfismo celular epitelial traqueal, sugerindo a formação de adenocarcinoma in situ. Concluiu-se neste estudo que a injeção intra-pulmonar de B[a]P é um método de fácil realização e pode constituir um modelo adequado quando utilizadas doses e períodos maiores de observação. As principais alterações secundárias à injeção intra-pulmonar de B[a]P em ratos *Wistar* foram: proliferação celular, alterações inflamatórias de diversos graus e hiperplasias nodulares linfóides.

Descritores: carcinogênese, câncer de pulmão, benzo[a]pireno, neoplasias, modelo experimental.

## ABSTRACT

The aim of this study was to elaborate an experimental model of pulmonary carcinogenesis in Wistar rats. So it was carried through an intra-pulmonary injection of the Benzo[a]pyrene (B[a]P) dilution in alcohol 70%, a polycyclic aromatic hydrocarbon widely known by its power of tumoral induction. After daily study accomplishment to verify the induced degree of cellular proliferation by the B[a]P, which confirmation was gotten through the histological analysis of the Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNOR) points 03 weeks later the injection (10mg/kg =  $1,84 \pm 0,13$ ; 20mg/kg =  $2,48 \pm 0,28$ ), three experimental groups had been formed with 08 animals each: Control Group (Alcohol 70%); B[a]P Group 10 mg/kg; e B[a]P Group 20mg/kg, submitted to euthanasia 08, 10, 12 and 14 weeks after the experimental procedure. The pulmonary sections had been colored by hematoxilin-eosin (HE) and submitted to the morphometrical analysis to describe the tissue alterations. The presence of diffuse inflammatory alterations was observed in all groups, however, at the analysis of the pulmonary tissue of the experimental groups, it had been observed hyperplasic alterations (BALT hyperplasia), and in one of the animals of the experimental group 20mg/kg (12 weeks), it was noticed the presence of cellular epithelial tracheal pleomorphism, suggesting the adenocarcinoma formation *in situ*. It had been concluded in this study that the intra-pulmonary injection of B[a]P is an easy realization method, and can be an adequate model when major doses and observation periods will used. The main secondary alterations to the intra-pulmonary injection of B[a]P in Wistar rats were: cellular proliferation, inflammatory alterations of several degrees and nodular lymphoid hyperplasias.

Key words: carcinogenesis, lung cancer, benzo[a]pyrene, neoplasms, experimental model.

# 1. INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão representa a causa mais comum de óbitos por câncer em ambos os sexos no mundo desenvolvido, sendo considerada uma das mais importantes doenças na medicina moderna. No mundo inteiro em 2001, o câncer de pulmão causou mais de um milhão de mortes, e sua incidência global tem aumentado cerca de 0,5% ao ano, sendo maior que o câncer colorretal, uterino e de mama combinados<sup>1</sup>.

Somente nos Estados Unidos, estima-se que foram diagnosticados em 2002 cerca de 169.400 novos casos da doença, levando a óbito cerca de 155.000 pacientes no mesmo ano. Existem, portanto, muitas razões para afirmar que constitui um dos maiores problemas de saúde pública no mundo<sup>2</sup>.

O hábito tabágico constitui a causa de 80% dos casos de câncer de pulmão. Os riscos atribuídos à exposição a asbestos, agentes ambientais/ocupacionais e fatores genéticos representam os demais casos<sup>3</sup>.

A análise citológica é o principal meio de obtenção do diagnóstico em pacientes com suspeita de câncer de pulmão. A citologia do escarro poderia certamente ser o primeiro passo em pacientes que apresentam lesão central ou evidência radiográfica de doença metastática, porém muitas instituições não têm estabelecido um programa de coleta e análise citológica, e as que realizam esse procedimento são pouco dotadas de eficaz sensibilidade no processo de análise<sup>4</sup>.

A patogênese do câncer de pulmão envolve o acúmulo de múltiplas anormalidades durante um longo período de tempo, sendo a instabilidade genômica universalmente encontrada durante essa acumulação. Essas

mudanças ocorrem precocemente em tecidos aparentemente normais, sem características macroscópicas da presença de células cancerígenas<sup>5</sup>.

Aproximadamente 50 supressores tumorais e mais de 100 oncogenes são atualmente descritos. O fato desses componentes estarem intimamente envolvidos no crescimento e divisão celular, faz do câncer uma doença considerada como resultante da desregulação do ciclo celular<sup>3</sup>.

Uma marca significativa da carcinogênese é a quantidade de DNA mutante em relação ao DNA normal. O DNA mutante constitui modificações covalentes do DNA resultante da exposição a agentes carcinogênicos ativados, e é possível que essas mutações possam alterar diretamente a regulação da transcrição dos supressores tumorais ou oncogenes. Apesar da importância da associação dos aspectos genéticos da carcinogênese pulmonar, o impacto clínico dessa associação ainda é relativamente pequeno<sup>5</sup>.

A carcinogênese é um processo multifásico que envolve a iniciação, promoção, conversão maligna e progressão. O evento mais precoce da carcinogênese química (iniciação) requer a exposição a um agente carcinogênico em sua forma mais reativa, ativação metabólica e a ligação do agente a macromoléculas celulares<sup>6</sup>. A análise molecular das diferentes fases da teoria da carcinogênese permite supor que na fase de iniciação se produz uma ou mais mutações simples, sendo que a maioria das células iniciadas não evoluirão para outras fases, justificando a presença de múltiplas células iniciadas em organismos adultos. A fase de promoção (sem alterações moleculares no DNA) muitas vezes está ausente na realidade clínica, porém se agentes cancerígenos forem suficientemente mutagênicos e a exposição a eles

abundante, entra-se diretamente na fase de progressão (tumor localmente invasivo ou doença metastática)<sup>7</sup>.

O progresso no tratamento do câncer de pulmão tem se mostrado desapontador. Um modelo animal de câncer pulmonar humano poderia acelerar as investigações sobre novas formas de tratamento<sup>8</sup>.

Existem poucos modelos animais de câncer pulmonar humano. Sabe-se que o câncer no animal pode ser induzido por uretano, asbestos ou benzopireno, sendo este último o mais importante carcinogênico, encontrado em concentração de 20 a 40 ng em cada cigarro<sup>3</sup>. Um modelo animal utilizando nitrosamina NNK associado a benzopireno, descrito por Hetch et al. (1994) produziu adenomas bronquiais em aproximadamente 16 semanas, com um observado aumento dose-dependente no número de tumores por animal<sup>9</sup>.

O benzopireno (3,4-benzo[a]pireno), substância encontrada no alcatrão, é um hidrocarboneto aromático policíclico resultante da queima do cigarro, podendo ser encontrado também como produto da queima de combustíveis fósseis. Com alto poder carcinogênico, tem tido seu metabolismo estudado em sistemas “in vitro” e “in vivo”, e sabe-se que se liga ao DNA com maior eficiência em células epiteliais do que em fibroblastos, com efeito indutivo instalando-se em poucas horas após sua aplicação. A ligação de substâncias como o benzopireno com os constituintes celulares produz freqüentemente substâncias quimicamente reativas (processo conhecido como *bioativação*) responsável pela formação de inúmeros metabólitos ativos, cuja presença pode desencadear o início de processos tóxicos como mutagenicidade, carcinogenicidade e necrose<sup>10</sup>. Além dos pontos de mutação, pode também

levar a formação de uma linha simples na divisão da cromátide celular, fenômeno freqüentemente presente no câncer de pulmão<sup>5, 11</sup>.

Resultados de alguns estudos sugerem que as respostas metabólicas secundárias a exposição ao benzopireno tem importante papel em doenças crônicas ocupacionais, e que as alterações celulares do trato respiratório podem ser devidas a reações imunológicas<sup>12</sup>.

Wolterbeek (1995) relata um método utilizado para indução de câncer de pulmão em modelos vivos baseado na instilação intratraqueal de suspensão salina de benzopireno cristalino. Em um experimento realizado com hamsters, observou-se baixa resposta na indução de alterações neoplásicas ou paraneoplásicas no trato respiratório dos animais, provavelmente devido ao uso de uma dose não suficientemente alta da substância. Ademais, foi observada dificuldade no controle da resposta tumoral<sup>13</sup>.

Segundo Dawkins e Stockley (2001) o uso de ratos em modelos experimentais de patologias pulmonares constitui a melhor escolha, porque o genoma do rato tem sido extensivamente estudado e sua seqüência apresenta similaridades com o genoma humano<sup>14</sup>. Apesar de diferenças anatomo-fisiológicas entre o sistema respiratório de ratos e humanos, a utilização das cobaias facilita o desenvolvimento e introdução de novas estratégias terapêuticas, bem como possíveis métodos de quimioprevenção e diagnóstico precoce<sup>15</sup>.

Uma outra vantagem na utilização de cobaias para determinação de modelos de carcinogênese pulmonar baseia-se na alta resistência das células do trato respiratório humano a transformações por carcinogênicos químicos *in vitro*, tendo vários estudos prévios com células humanas resultado mais

freqüentemente em células fibroblásticas ao invés de células típicas de câncer pulmonar<sup>16</sup>.

Apesar dos diversos trabalhos abordando o tema em questão, em diversos artigos consultados observam-se lacunas em relação a determinação de um protocolo de desenvolvimento de tumores pulmonares "*in vivo*". Diante disso, o presente estudo pretende elaborar, através da utilização de um conhecido agente carcinogênico ativo, um modelo experimental de carcinogênese de trato respiratório, observando-se os critérios dose e tempo-dependência, lesões celulares e características histopatológicas mediante colorações AgNOR e HE.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. CÂNCER

O câncer é um crescimento celular anormal e incontrolado, que invade os tecidos vizinhos e à distância, e é conhecido há vários séculos<sup>17</sup>.

É um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo. Embora as maiores taxas de incidência de câncer sejam encontradas em países desenvolvidos, dos dez milhões de casos novos anuais de câncer, cinco milhões e meio são diagnosticados nos países em desenvolvimento<sup>18</sup>.

Os tipos mais incidentes, à exceção de câncer pele não melanoma, são os de próstata e pulmão no sexo masculino e mama e colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo. Estima-se que o câncer de pele não melanoma (116 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de mama feminina (49 mil), próstata (47 mil), pulmão (27 mil), cólon e reto (25 mil), estômago (23 mil) e colo do útero (19 mil)<sup>19</sup>.

A mortalidade por câncer na América Latina apresenta um padrão em que coexistem fatores de risco relacionados à pobreza e ao desenvolvimento. O Brasil

apresenta diferenças regionais marcantes, possuindo grandes áreas pouco desenvolvidas, outras desenvolvidas e ainda onde coexistem as duas condições. Estas regiões apresentam taxas muito diferentes de mortalidade por câncer, apresentando um padrão de crescimento aproximadamente do Norte para o Sul. Uma possível explicação para este fato é que o Rio Grande do Sul, é considerado um dos poucos estados brasileiros que possuem registros considerados confiáveis de mortalidade por câncer. Uma consequência importante desse gradiente norte-sul é que os número médios nacionais traduzem mal a realidade diversificada do país<sup>20</sup>.

Segundos dados da Organização Mundial de Saúde (2002), os tipos de câncer mais frequentes são tumores de pulmão, cólon e reto e de estômago, tanto nos países industrializados, quando nos países em desenvolvimento<sup>18</sup>. Com relação ao sexo, a prevalência de câncer entre os homens e mulheres é muito similar nos países desenvolvidos, enquanto nos países em desenvolvimento, a prevalência nas mulheres é 25% maior, o que reflete o predomínio, em homens, e localizações de câncer com pior sobrevida, tais como fígado, esôfago e estômago<sup>21</sup>.

A distribuição epidemiológica de câncer no Brasil sugere um aumento entre os tipos de câncer normalmente associados a alto status sócio-econômico – câncer de mama, próstata, cólon e reto – e, simultaneamente, a presença de taxas de incidência persistentemente elevadas de tumores geralmente associados com a pobreza – câncer de colo de útero, pênis, estômago e cavidade oral. Esta distribuição certamente resulta de exposição a um grande número de diferentes fatores de risco ambientais relacionados ao processo de industrialização, como

agentes químicos, físicos e biológicos. Também de exposição a outros fatores relacionados às disparidades sociais<sup>22</sup>.

### **2.1.1 CÂNCER DE PULMÃO**

O câncer de pulmão constitui a neoplasia de maior mortalidade nos dias atuais. Segundo o Instituto Nacional de Câncer, apresenta um aumento de 2% ao ano na sua incidência mundial e soma anualmente cerca de 1,2 milhões de novos casos<sup>23</sup>.

Na população masculina, o hábito de fumar continua sendo responsável pela maioria dos casos diagnosticados de câncer de pulmão (podendo chegar a mais de 90% em alguns países ou regiões) e, nas mulheres, pode-se atribuir cerca de metade dos casos de câncer pulmonar ao tabagismo. O câncer de pulmão permanece como uma doença altamente letal. A sobrevivência média cumulativa total em cinco anos varia entre 13 e 21% em países desenvolvidos e entre 7 e 10% nos países em desenvolvimento. O hábito de fumar é capaz de aumentar o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão em 20 a 30 vezes em tabagistas de longa data e em 30 a 50% em fumantes passivos, não existindo nenhuma dose ou quantidade segura para o consumo. As taxas de incidência em um determinado país refletem seu consumo de cigarros<sup>19</sup>.

A maior parte dos casos acomete indivíduos entre 50 e 70 anos de idade e, embora fosse inicialmente uma doença epidêmica entre homens em nações industrializadas, o câncer de pulmão tornou-se uma doença cada vez mais comum

entre as mulheres, devido principalmente a aceleração no consumo do tabaco e à difusão do tabagismo na população feminina. Além do tabagismo, outros fatores tradicionalmente aceitos são: presença de doença pulmonar preexistente, exposição ocupacional (asbesto, urânio, cromo, agentes alquilantes, entre outros), história familiar de câncer de pulmão e neoplasia pulmonar prévia<sup>22, 23</sup>.

O tabagismo passivo aumenta também o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão. Pesquisas sobre tabagismo passivo mostram que entre não fumantes expostos de forma crônica à poluição tabágica ambiental, o risco de câncer de pulmão é 30% maior que entre não fumantes não expostos<sup>24</sup>.

O número de casos novos de câncer de pulmão, estimados para o Brasil em 2006, é de 17.850 entre homens e de 9.320 nas mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 19 casos novos a cada 100 mil homens e 10 para cada 100 mil mulheres<sup>19</sup>.

#### **2.1.1.1 Etiologia e Patogênese**

Há uma variedade de fatores que contribuem para o risco de câncer de pulmão, porém o mais conhecido e mais fortemente aceito é o hábito de fumar, particularmente cigarros. Entretanto, apenas uma pequena fração de fumantes desenvolve câncer de pulmão, o que indica uma susceptibilidade diferencial para a carcinogênese, em parte por diferenças genéticas no metabolismo do carcinógeno e/ou por variação na capacidade de reparo do DNA. Estudos de bases moleculares mostram que o dano genético ao epitélio respiratório secundário à exposição

tabágica persiste por décadas após a cessação do tabagismo. Atualmente 50% de todos os novos casos de câncer de pulmão são diagnosticados em ex-fumantes, ressaltando a marcante influência da “iniciação” na carcinogênese. Outros fatores demonstrados são o radônio, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, níquel, cromo, arsênico, asbestos e éteres clorometílicos, além da poluição atmosférica cuja influência foi demonstrada em diversos estudos<sup>25, 26</sup>.

O tabagismo tem sido associado com diminuição da sobrevida em uma variedade de neoplasias, incluindo de cabeça e pescoço, fígado, próstata, colón e reto, câncer de mama e leucemia. Vários estudos mostram que em pacientes com câncer de pulmão, o tabagismo é associado à recorrência de tumores, todas as causas de mortalidade e diminuição da sobrevida, uma vez que está associado a diversos fatores que contribuem para aumento da mortalidade, como baixo estado sócio-econômico, déficit nutricional, co-morbididades e disfunções imunológicas<sup>27</sup>.

O desenvolvimento do câncer deve-se ao acúmulo de alterações que ocorrem de forma espontânea ou induzida na estrutura ou expressão de determinados genes. Essas mutações genéticas ocorrem continuamente e são reparadas pelo mecanismo de defesa celular, que exerce controle sobre o crescimento, a latência e a apoptose celular. A presença de falhas no mecanismo de defesa, herdadas ou geradas por mutações, possibilita a reprodução de clones de células resistentes à indução para a fase de latência, ou à apoptose e ao controle de crescimento, podendo dar origem ao desenvolvimento de neoplasias<sup>28</sup>.

A carcinogênese começa com a exposição do epitélio a um agente agressor, resultando em dano genético, usualmente associado à lesão celular crônica. A ação constante do agente pode resultar na transformação maligna da célula epitelial. Alterações morfológicas pré-neoplásicas caracterizadas como hiperplasia, displasia e carcinoma *in situ* podem ser observadas no epitélio brônquico antes do aparecimento do quadro clínico de câncer de pulmão<sup>28</sup>.

O conceito de precedência de alterações pré-malignas no epitélio das vias aéreas durante a patogênese do câncer de pulmão não é recente, tendo sido objetivo de diversos estudos na década de 50 e 60. Filley (2004) descreve que um estudo de análise patológica de 42.000 secções brônquicas, foram observadas lesões epiteliais em 100% dos indivíduos fumantes, e em 93% deles foram encontradas células atípicas. Quando analisados os tecidos pulmonares, alterações histológicas não foram freqüentes, mas quando encontradas mostraram-se multifocais, independentes de idade, sexo, condições sócio-econômicas e presença ou não de lesões infecciosas. Este estudo confirma que lesões em vias aéreas podem aparecer mesmo sem desenvolvimento de neoplasias. O tempo de surgimento dessas lesões e seu poder de predição para o desenvolvimento de câncer ainda não podem ser estimados<sup>29</sup>.

Quanto à existência de uma base genética na susceptibilidade ao câncer de pulmão, os estudos ainda não foram conclusivos, não sendo encontrado nenhum efeito genético na mortalidade por câncer de pulmão<sup>25</sup>.

A patogênese do câncer de pulmão envolve o acúmulo de múltiplas anormalidades durante um longo período de tempo. A Instabilidade genômica é universalmente encontrada durante a ocorrência dessas anormalidades, e as alterações podem ocorrer por falha de combinação gênica, mudanças no DNA, ampliação dos segmentos de DNA ou durante combinação ou quebra de cromossomos. Essas mudanças ocorrem inicialmente em tecidos aparentemente normais e sem características celulares neoplásicas<sup>5</sup>.

Segundo Fong et al. (2003), múltiplas lesões clonais são detectadas em tumores invasivos de pulmão, e às vezes em lesões pulmonares metastáticas. As fases celulares e genéticas do processo de carcinogênese variam notavelmente, mas basicamente respeitam a seguinte seqüência: (1) anormalidades nos fatores de crescimento; (2) inibição da apoptose; (3) dissensibilização dos fatores anti-crescimento; (4) supressão dos limites do potencial replicativo celular; (5) angiogênese; e (6) invasão tecidual e metástase<sup>26</sup>.

Atenção especial tem sido dedicada aos receptores dos fatores de crescimento epidérmicos na patogênese do câncer de pulmão. São receptores da tirosina quinase, frequentemente expressada e ativada em estado fosforilado no câncer de células não pequenas. A atividade da tirosina quinase fosforilada nos receptores dos fatores de crescimento epidérmico resultam em inibição protéica desencadeadora de proliferação celular, invasão, metástase e inibição da apoptose<sup>30</sup>.

Nos últimos anos, o entendimento a respeito das bases moleculares da patologia do câncer de pulmão tem avançado rapidamente, aumentando o conhecimento a respeito das alterações adquiridas durante sua patogênese. Vários genes e suas proteínas correspondentes têm sido identificados, incluindo oncogenes, genes supressores tumorais, fatores de crescimento e seus receptores, e genes envolvidos no reparo do DNA<sup>26,31</sup>.

Os oncogenes são definidos como genes com habilidade de indução de características específicas de câncer em células normais. Os oncogenes podem se codificar utilizando diferentes efetores, como quinases, fatores de crescimento ou fatores de transcrição. Em muitos tumores, o RNAm ligado ao oncogene é estabilizado, levando a elevada produção de proteínas e à predisposição à divisão celular irrestrita. Esta estabilização pode ser a consequência ou a causa da transformação celular<sup>32</sup>.

Recentemente a recombinação de células tumorais pelo sistema imunológico tem sido considerada como um dos eventos biológicos na progressão do câncer de pulmão, uma vez que o mesmo responde debilmente a intervenções imunoterapêuticas normalmente utilizadas em outras neoplasias. A resposta imunológica durante a oncogênese resulta em variações tumorais seletivas, capazes de resistir aos mecanismos de resposta imunológica mesmo em pacientes imunocompetentes<sup>33</sup>.

### 2.1.1.2 Inflamação e Câncer

A inflamação é um complexo e indispensável mecanismo de defesa contra agentes biológicos, químicos, físicos e irritantes endógenos, sendo normalmente auto limitada. Entretanto, a inflamação persistente pode causar dano celular, resultando em muitas doenças que afetam o homem, incluindo doenças cardiovasculares, desordens inflamatórias e autoimunes, condições neurodegenerativas, infecção e câncer<sup>34</sup>.

A patogênese das doenças pulmonares induzidas por poluentes ambientais é mediada em grande parte pelos macrófagos alveolares, espécies reativas de oxigênio e citocinas inflamatórias, que podem ter papel crucial no desencadeamento da inflamação aguda<sup>35</sup>.

A associação funcional entre inflamação e câncer foi feita inicialmente por Virchow em 1863, que defendeu a hipótese que o câncer inicia-se em locais cuja inflamação provocada por irritação prolongada e lesões teciduais favoreceriam a proliferação celular. Ainda que atualmente entende-se que nem toda proliferação celular resulta em câncer, é também claro que a proliferação celular em um ambiente abundante em células inflamatórias, fatores de crescimento, estroma ativado, incremento da angiogênese e agentes danosos ao DNA promovem as condições necessárias à formação e progressão do tumor. Realmente, estima-se que mais de um terço dos casos de câncer é precedido por inflamação crônica<sup>36</sup>.

Recentes estudos apontam a inflamação aguda como um fator contribuinte à regressão do câncer, entretanto, estudos epidemiológicos reforçam que doenças inflamatórias crônicas são frequentemente associadas com aumento do risco de câncer, e a relação entre inflamação e câncer embasa-se na hipótese que espécies reativas de oxigênio e nitrogênio geradas pelas células inflamatórias (leucócitos, por exemplo) podem causar eventos mutagênicos que resultem na iniciação tumoral. Atualmente aceita-se que o desenvolvimento de câncer devido à inflamação é um processo causado por células inflamatórias, bem como uma variedade de mediadores, incluindo citocinas e enzimas, que de um modo geral são responsáveis pelo micro-ambiente inflamatório<sup>37</sup>.

### **2.1.1.3 Classificação**

A classificação do câncer de pulmão é baseada na aparência histológica do tumor corado por hematoxilina e eosina. O esquema de classificação mais amplamente aceito é o da Organização Mundial de Saúde<sup>38</sup>.

As alterações histológicas associadas com o desenvolvimento do câncer de pulmão consistem em hiperplasia de células basais, metaplasias escamosas, displasia e cacinoma *in situ*. O número de lesões metaplásicas escamosas, bem como o grau de displasia aumentam com o número de cigarros consumidos. Esta relação é mais evidente em cacinomas celulares escamosos, que derivam diretamente de células epiteliais bronquiais, não sendo tão clara em outros tipos de câncer de pulmão<sup>39</sup>.

Existem diversas classificações histológicas para câncer de pulmão, e a mais frequentemente utilizada é a classificação da Organização Mundial de Saúde, que reconhece 07 tipos maiores de câncer de pulmão, e está representada no quadro 01<sup>40</sup>.

Quadro 01 – Classificação histológica do Câncer de Pulmão. (WHO, 1999)

1) Carcinoma de células escamosas (SqCC) <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Papilífero</li> <li>b. Céulas Claras</li> <li>c. Pequenas células</li> <li>d. Basalóide</li> </ul>
2) Carcinoma de pequenas células (SCC) <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Carcinomas de pequenas células combinado</li> </ul>
3) Adenocarcinoma <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Acinar</li> <li>b. Papilífero</li> <li>c. Carcinoma bronquioalveolar</li> <li>d. Não-mucinoso</li> <li>e. Mucinoso</li> <li>f. Misto mucinoso e não mucinoso</li> <li>g. Sólido com produção de mucina</li> <li>h. Adenocarcinoma com subtipos mistos</li> </ul>
4) Carcinoma de grandes células ou carcinoma de não-pequenas células (NSCC) <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Carcinoma de grande células neuroendócrino</li> <li>b. Carcinoma de grandes células neuroendócrino combinado</li> <li>c. Carcinoma basalóide</li> <li>d. Carcinoma de células claras</li> <li>e. Carcinoma de grandes células com características rabdóides</li> </ul>
5) Carcinoma adenoescamoso
6) Carcinoma com elementos pleomórficos e sarcomatóides <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Carcinomas com células gigantes ou fusiformes</li> <li>b. Carcinossarcoma</li> <li>c. Blastoma pulmonar</li> </ul>
7) Tumor carcinóide <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Carcinóide típico</li> <li>b. Carcinóide atípico</li> </ul>

Clinicamente, são mantidas apenas duas categorias mais importantes e influentes na forma de tratamento: carcinoma de pequenas células e carcinomas de não-pequenas células<sup>17, 25, 41</sup>.

Esses dois tipos de câncer apresentam evidentes diferenças em suas características histopatológicas, explicada pelos distintos padrões de lesão genética encontrados entre as duas categorias. A responsividade ao tratamento quimioterápico e/ou radioterápico é também significativamente diferente entre o carcinoma de pequenas células e o carcinoma de não-pequenas células, representando respostas diferenciadas aos efeitos do tratamento clínico<sup>42</sup>.

O câncer de não-pequenas células representa cerca de 80% de todos os casos de câncer de pulmão, e é mais bem descrito como um grupo de entidades clínicas heterogêneas que partilha sua origem em causas moleculares e celulares, porém com diferentes comportamentos clínicos e prognósticos. Mais de 90% dos pacientes apresentam-se com um ou mais sintomas e sinais, e o curso clínico da doença pode variar grandemente. A variação na apresentação clínica e a potencial progressão são, em suma, devido às múltiplas manifestações do tumor primário, dos sítios de metástases e de síndromes paraneoplásicas<sup>43</sup>.

Em geral, o tratamento locorregional (cirurgia ou radioterapia) é recomendado para os pacientes com doença localizada. Os pacientes com carcinoma pulmonar de não-pequenas células metastático necessitam de tratamento quimioterápico. A maioria dos pacientes com câncer pulmonar de não-pequenas células apresenta doença em estádios avançados na ocasião do diagnóstico, sendo este um dos

motivos da sua alta taxa de mortalidade. Estima-se que, no momento do diagnóstico, 20% dos pacientes tem doença localizada, 25% tem extensão da neoplasia aos linfonodos mediastinais e 55% já apresentam metástase à distância<sup>44</sup>.

#### **2.1.1.4 Marcadores Biológicos no Câncer de Pulmão**

Marcadores biológicos são componentes celulares, estruturais e bioquímicos, presentes não só em células tumorais como também em células normais, que podem ser medidos quantitativamente por métodos bioquímicos, imunológicos, morfométricos, ultra-estruturais e moleculares nos fluidos ou nos tecidos corporais, associados a neoplasias e possivelmente ao órgão de origem. Nas células tumorais, definem alterações celulares e moleculares associadas à transformação maligna. Podem ser de dois tipos: (1) marcadores intermediários, que medem alterações celulares e moleculares antes do aparecimento da malignidade; (2) marcadores diagnósticos, presentes em associação com a malignidade<sup>45</sup>.

A imunistoquímica dos tumores pulmonares consiste em uma poderosa ferramenta diagnóstica usada para detectar marcadores epiteliais, mesenquimais, linfóides, melanocíticos, neuroendócrinos hormonais e moleculares. Au et al. (2004) relata que dos 18 marcadores imunistoquímicos frequentemente utilizados na investigação do câncer de pulmão (synaptophysin, chromogranin, bombesin, NSE, GFI1, ASH-1, p53, p63, p21, p27, E2F-1, cyclin D1, Bcl-2, TTF-1, CEA, HER2/neu, cytokeratin 5/6 e pancytokeratin), p53, p63, cyclin D1 e HER2/neu foram os mais significantes na identificação de câncer de pulmão dos subtipos carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma. O autor relata, entretanto, que o uso da

imunoistoquímica como preditor prognóstico para esse tipo de câncer deve ser feito com cautela, pois a expressão desses marcadores pode variar grandemente entre seus diferentes subtipos morfológicos<sup>46</sup>.

Apesar de não constituir uma reação imunoistoquímica, a técnica de AgNORs pode ser uma medida da atividade de proliferação nuclear. As regiões organizadoras do nucléolo (NORs) são constituídas por segmentos de DNA que contém os genes para a produção do ácido ribonucléico ribossômico (RNAr) e representam os nucléolos celulares. Usando-se técnica de impregnação com prata, estas estruturas são visualizadas à microscopia ótica como pontos escuros (AgNOR). O número e a área de NORs no núcleo são relacionadas com a síntese de proteínas e, portanto, as NORs expressam-se mais nos tumores de alto grau<sup>45, 47</sup>.

NORs podem ser demonstrados em tecidos embebidos em parafina, fixados em formalina e corados com prata, resultando em pontos pretos denominados AgNORs<sup>48, 49</sup>.

A expressão de AgNOR pode facilmente ser quantificada por procedimentos morfométricos, tornando possível a obtenção de um indicador quantitativo da atividade proliferativa celular, que pode ser expressa tanto pela área de AgNOR quanto pelo número de pontos AgNOR positivos<sup>50</sup>.

A técnica de AgNOR pode ser empregada objetivando-se simplificar a metodologia empregada como complemento da simples análise morfológica, além

de diminuir os custos do uso de anticorpos monoclonais na diferenciação de benignidade e malignidade celular<sup>51</sup>.

## 2.2. MODELOS ANIMAIS DE DOENÇA

Embora muitos casos de câncer de pulmão possam ser prevenidos, o tratamento desta entidade é ainda desapontador, sendo necessário o advento de novas modalidades de tratamento e novas drogas. No estudo do câncer humano, a eficácia de novas idéias de tratamento em várias linhagens celulares tem sido investigada, proporcionando informações preliminares úteis, mas não oferecendo informações acerca da efetividade dos agentes utilizados na prevenção, tratamento, prevenção de metástases e diminuição da mortalidade. Modelos animais de câncer de pulmão poderiam acelerar a investigação de novas idéias, oferecendo ainda menor custo e diminuição do risco observado em estudos humanos<sup>8</sup>.

Os modelos animais de doença atuam como uma ponte entre estudos laboratoriais *in vitro* e estudos em humanos, e tem tido um maior impacto sobre a investigação de muitas condições patológicas. Os ratos representam a melhor opção para um modelo animal, pois o genoma do rato tem sido extensivamente estudado e sua seqüência mostra similaridades com o genoma humano. Entretanto, modelos animais têm um número de limitações que devem ser sempre consideradas, principalmente as diferenças anatômicas entre o trato respiratório humano e o de ratos. Estes últimos não apresentam cílios em grande quantidade, têm número reduzido de glândulas submucosas na traquéia e não possuem células caliciformes. Ratos não expectoram secreções, e são respiradores nasais obrigatórios. Possuem filtração ineficiente e têm menos ramificações em sua árvore traqueobrônquica. Portanto, a extrapolação de achados clínicos em ratos a modelos humanos devem sempre levar essas diferenças em consideração<sup>14</sup>.

Tumores espontâneos de pulmão em ratos são similares em morfologia, histopatologia e características moleculares dos adenocarcinomas humanos. Modelos de câncer de pulmão em ratos podem desta forma, servir como uma valiosa ferramenta não apenas para a compreensão das bases biológicas desses tumores, mas também para o desenvolvimento e validação de novas intervenções e estratégias no tratamento do câncer, bem como na identificação de marcadores para o diagnóstico precoce<sup>42</sup>.

Dentre os métodos mais frequentemente utilizados para produção de câncer de não-pequenas células em modelos animais, encontra-se a instilação intra-traqueal de materiais carcinogênicos ou radioativos. Nestes modelos, o local da alteração pré-neoplásica inicial não pode ser determinado, exigindo múltiplas secções de todo o pulmão nos animais induzidos<sup>52, 53</sup>.

A incidência de câncer pulmonar em ratos está intimamente relacionada ao nível de inflamação no pulmão, genotoxicidade do agente carcinogênico, quantidade de partículas depositada e absorção dos carbonáceos presentes nas partículas aderidas ao tecido. Outras espécies de roedores, como hamsters e camundongos têm sido utilizadas em estudos envolvendo o câncer de pulmão, porém mostram-se com menor susceptibilidade e sensibilidade ao desenvolvimento deste tipo de neoplasia<sup>54</sup>.

Alguns estudos optam pela indução de câncer de pulmão em cães, e apesar das vantagens em relação ao tamanho do animal, permitindo a indução da doença em locais conhecidos e de mais fácil acesso, permitindo a implantação do HAP em

locais selecionados na mucosa traqueal, a quantidade de metástases observadas em sítios distantes, o alto índice de mortalidade e o alto custo de pesquisa tornam quase sempre inviáveis trabalhos com animais desse porte<sup>15</sup>.

## 2.3. BENZO[a]PIRENO

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) são reconhecidos como a maior classe de poluentes carcinogênicos ambientais e ocupacionais, sendo encontrados em diferentes apresentações e, dependendo da sua estrutura, causando distintas atividades carcinogênicas. A relação quantitativa entre disposição, metabolismo e aderência tecidual dos HAP e outros carcinogênicos relacionados ao tabaco evocam dúvidas sobre a importância isolada dos HAP no câncer de pulmão, tanto pela alta dose necessária à produção dos efeitos carcinogênicos quanto pela necessidade de ativação metabólica dos mesmos, função fracamente observada no tecido pulmonar<sup>55, 56, 57</sup>.

Os HAP carcinogênicos são conhecidos como agentes carcinogênicos completos, pois podem induzir tumores em tecido epidérmico sem a necessidade de intervenções adicionais, e seu uso na produção de tumores de pulmão experimentais em animais é relatado na literatura desde a década de 50, e foram os primeiros componentes puros de composição conhecida identificados como indutores de câncer em modelos experimentais<sup>58</sup>.

O benzo[a]pireno (B[a]P) constitui um dos mais estudados HAP, por ser comumente encontrado em produtos contaminantes advindos da queima de combustíveis fósseis, especialmente carvão mineral, bem como nos produtos de exaustão de motores de combustão interna. É capaz de produzir uma ampla variedade de lesões tóxicas, incluindo a carcinogênese em modelos experimentais<sup>11</sup>.

O benzo[a]pireno é um elemento químico encontrado no tabaco cuja relação com o desenvolvimento do câncer tem sido mostrada em diversos estudos. Sua concentração ocorre normalmente entre 20 e 40 ng/cigarro e pode levar à formação do tumor por mecanismos multifatoriais. Após iniciadas as reações à sua presença, o B[a]P reage preferencialmente com a ligação guanina nos códons 157, 248 e 273 do gene p53 das células normais do epitélio bronquial, e esta reação tem sido identificada como um ponto chave na mutagênese do câncer de pulmão<sup>16</sup>.

Shamsuddin e Gan (1988) identificaram alterações antigênicas no DNA em vinte por cento das células epiteliais bronquiais retiradas de cinco pacientes com câncer de pulmão submetidos a biópsia pulmonar, com particular reação imunistoquímica ao antígeno B[a]P-DNA, resultados que reforçam o papel deste HAP como agente carcinogênico<sup>6</sup>.

Nos últimos anos, diversos estudos envolvendo modelos animais de câncer de pulmão utilizando B[a]P têm sido descritos, e a influência do método de indução e da dose utilizada é observada como um importante componente na carcinogênese pulmonar<sup>42, 59</sup>.

Harrigan et al. (2004) realizaram injeção intra-pulmonar de B[a]P dissolvido em acetona nas doses de 10 e 50 mg/kg em ratos *Sprague-Dawley*. Vinte e quatro e quarenta e oito horas após a injeção, os ratos foram sacrificados e a adesão do B[a]P ao DNA no tecido pulmonar analisada. Os resultados mostraram que os níveis de adesão do carcinogênico ao DNA foram menores após 48 horas que nas 24

horas, indicando reação metabólica com eliminação de parte do B[a]P nos animais estudados<sup>60</sup>.

Garçon et al. (2001) reforçam a importância da participação de outras substâncias indutoras de liberação dos mediadores pró-inflamatórios em modelos experimentais utilizando a exposição ao B[a]P, demonstrando em seu estudo que a associação do carcinogênico a óxido férrico ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) produz maior expressão do RNAm, níveis maiores de stress oxidativo e maior síntese de mediadores inflamatórios que a instilação do B[a]P isolado<sup>35</sup>.

Em estudo confirmatório, Garçon et al. (2001) demonstraram que após instilação intra-traqueal de B[a]P (3mg) ou B[a]P (3mg) associado a  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  observou-se peroxidação lipídica e inativação da superóxido dismutase (uma enzima antioxidativa) significativamente maior no grupo com associação da  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , indicando que esta associação resulta em maior formação de tumores pulmonares em roedores quando comparada à instilação do B[a]P isoladamente<sup>12</sup>.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Elaborar um modelo experimental de carcinogênese pulmonar em ratos *Wistar*.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a ocorrência de proliferação celular pós injeção intra-pulmonar de benzopireno através da expressão argirofílica das regiões organizadoras nucleolares.
- Avaliar os efeitos da injeção intra-pulmonar de benzopireno em ratos *Wistar*.
- Estabelecer a dose de benzopireno e tempo de aplicação necessários para a indução de alterações celulares compatíveis com câncer pulmonar em ratos *Wistar*.

## 4. MÉTODO

### 4.1 Procedimento Experimental

O experimento foi realizado no laboratório de fisiologia animal da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP), em Campo Grande – MS, no período compreendido entre os meses de janeiro e setembro de 2006.

Foram estudados *Rattus norvegicus albinus*, linhagem *Wistar*, procedentes do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS. Todos animais eram machos e tinham idade entre dois e três meses (sessenta a noventa dias), com peso variando entre cento e cinquenta e duzentos gramas.

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com dimensões de trinta e três centímetros de largura, quarenta centímetros de profundidade e dezessete centímetros de altura, com tampas/grades de aço inoxidável contendo espaço para ração e água – Brasholanda ®. Cada caixa abrigou no máximo cinco animais.

A oferta alimentar e hídrica foi realizada de forma contínua, *ad libitum* e substituída uma vez ao dia. A ração ofertada foi da marca Nuvilab CR1 – Nuvital Nutrientes.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA/UFMS pelo certificado nº 72/2005, e todos os procedimentos respeitaram as normas internacionais para experimentação animal.

Os animais de cada grupo foram submetidos à injeção intra-pulmonar única (pulmão esquerdo) via toracocentese da solução obtida pela diluição de B[a]P cristalino 98% (3,4-benzo[a]pireno) em álcool 70%.

As doses utilizadas no preparo da solução de B[a]P foram preparadas com pesagem e separação em frascos estéreis com capacidade de 10ml de 10 e 20 mg de B[a]P ( $C_{20}H_{12}$  – Fluka Chemie – Sigma-Aldrich – St Louis, USA), diluídos em 10 ml de álcool 70% e agitados até completa homogeneização. Para pesagem das doses foi utilizada balança milimesimal de grama Ohaus – Analytical Standard.

A injeção intra-pulmonar foi realizada após sedação com injeção intraperitoneal de solução da associação de Cloridrato de Xilazina (Sespo Ind. e Com. Ltda, Jacareí, SP) e Cloridrato de Cetamina (Sespo Ind. e Com. Ltda, Jacareí, SP) (1:1) em dose de 0,01 ml/kg. Com o animal contido em decúbito dorsal foi realizada toracocentese à esquerda na linha axilar anterior em nível médioesternal, utilizando-se seringa estéril de 1ml e agulha 13X4,5, introduzida cerca de 0,8cm perpendicularmente à superfície do tórax.

A eutanásia dos animais foi realizada através de injeção letal da associação de solução injetável de Cloridrato de S(+) Cetamina (Cristália – Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. – Campinas, SP) e Tiopental Sódico (Cristália – Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. – Campinas, SP) pó estéril diluído em Solução Fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9% em concentração de 100mg/ml.

A retirada dos pulmões foi realizada com os animais posicionados e fixados em decúbito dorsal, submetidos à incisão mediana partindo da região cervical anterior e estendendo-se até aproximadamente um centímetro abaixo do apêndice xifóide. O acesso à cavidade torácica foi feito a partir de incisão sub-xifóide e osteotomia costal paraesternal. Antes de se proceder à pleurotomia, a traquéia foi

clampeada com pinça hemostática para prevenir-se o colapamento maciço do tecido pulmonar.

Após cuidadosa ressecção, os pulmões foram submersos em formol tamponado a 10% e enviados para processamento dos cortes histológicos.

Os cortes foram analisados por um profissional patologista e os achados histopatológicos descritos para posterior análise. As imagens de cada campo em ambas colorações (AgNOR e HE) foram obtidas a partir de um microscópio de luz ZEISS® - ICS/KSZ com lente Achromat-0,25 com objetiva de imersão e aumento final de 1000X.

A contagem das NORs foi feita por meio de sistema computadorizado utilizando-se o *software* ImageLab 2000. As imagens foram captadas por uma câmera acoplada ao microscópio ótico e transferidas para um computador.

#### **4.1.1 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada através de Análise de Variância (ANOVA) com *post test* de Dunnet para comparação da dose-resposta. Quando aplicado, foi realizado o teste t de Student para comparações paramétricas. As diferenças foram consideradas significativas para os valores de  $p \leq 0,05$ . Para análise estatística foi utilizado o *software* Bioestat 3.0.

#### **4.1.2 Preparo e Análise Histológica – AgNOR**

Os pulmões foram submetidos a emblocamento em parafina e secções longitudinais de 3 µm de espessura foram estendidas sobre lâminas de microscopia e desparafinizados em xilol durante 30 minutos em estufa a 57°C e posteriormente mantidos em temperatura ambiente por 20 minutos, sendo submersas em etanol absoluto por 20 minutos, em solução de ácido acético/etanol (1:3) por 05 minutos, lavadas 03 vezes sem intervalo em etanol absoluto.

Posteriormente as lâminas foram imersas em celuidina a 1% diluída em etanol/éter (1:1) durante 01 minuto e submetidas a secagem por 01 hora. O endurecimento da celuidina foi feito por imersão em etanol 70% por 05 minutos, após o que as lâminas foram lavadas em água destilada. Após gotejamento de preparo de 2 g/dl de gelatina em 2 g/dl de ácido fórmico aquoso, misturado a 50 g/dl de solução aquosa de nitrato de prata (1:2), os cortes foram mantidos em estufa a 45°C em câmara úmida por 45 minutos.

As lâminas foram retiradas e lavadas vigorosamente com água destilada a 45° e desidratadas com etanol em concentrações crescentes e clareadas em xilol.

#### **4.1.3 Preparo e Análise Histológica – HE**

O processo histológico foi iniciado após 24 horas de imersão em formaldeído, com 01 hora de imersão em álcool etílico a 90%, 01 hora de imersão em álcool etílico a 95%, e 04 sessões de imersão com uma 01 hora de duração cada em álcool etílico absoluto.

Posteriormente as peças foram submersas em 02 sessões de 01 hora cada em xilol, seguida de imersão em parafina I durante 02 horas, parafina II durante 02 horas e emblocamento com parafina histológica acrescida de 20% de cera de abelha em 02 sessões de 2,5 minutos.

Os blocos foram cortados com navalha de 04 micras, os cortes resultantes foram colocados em lâminas e posteriormente em estufa a 60°C por aproximadamente 12 horas.

Após desparafinização, os cortes sofreram coloração com hematoxilina-eosina (HE). Inicialmente as lâminas foram submersas durante 02 minutos em xilol I seguido de 02 minutos em xilol II, hidratadas com imersão por 1,5 minutos em álcool etílico absoluto; 1,5 minutos em álcool etílico a 90%; 1,5 minutos em álcool etílico a 80%; 1,5 minutos em álcool etílico a 70%; 02 minutos em água e imersão em hematoxilina por 1,5 minutos.

O processo de desidratação foi realizado com imersão em água seguido de imersão por 04 minutos em eosina. Foram realizadas sessões de imersão com duração de 1,5 minutos em álcool etílico a 80%; 90%; e 03 sessões em álcool etílico absoluto. Novamente banho de xilol I durante 01 minuto, banho de xilol II durante 01 minuto e imersão em xilol III durante aproximadamente 20 minutos.

## 4.2 Proliferação Celular – AgNOR

Foram estudados 12 animais, ditribuídos em três grupos de 04 animais cada.

- Grupo 01(controle): álcool 70% em dose aproximada de 1ml/kg.
- Grupo 02: 10 mg/kg de benzo[a]pireno;
- Grupo 03: 20 mg/kg de benzo[a]pireno.

Os animas (02 por grupo) foram submetidos à eutanásia no sétimo e vigésimo primeiro dia após a instilação, e os pulmões submetidos à técnica de coloração em AgNOR.

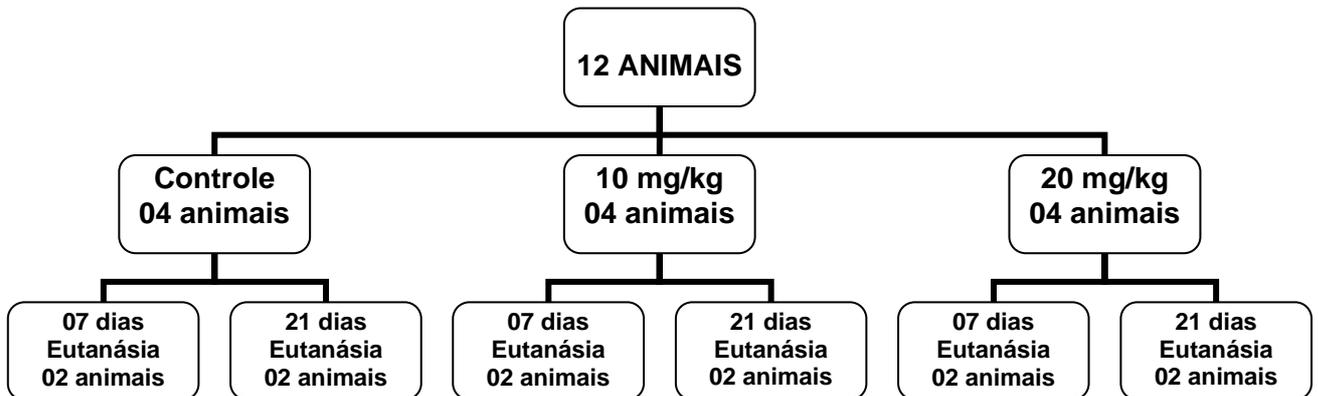


Figura 01: Caracterização do grupo Proliferação Celular – AgNOR

## 4.3 Análise Histopatológica – HE

Para análise das alterações teciduais pulmonares pós injeção de B[a]P, foram utilizados 24 animais de mesmas características, distribuídos em três grupos de 08 animais e repetindo-se o procedimento de injeção intra-pulmonar e as doses anteriormente utilizadas. Os animais (02 por grupo) sofreram eutanásia após oito, dez, doze e quatorze semanas após o procedimento.

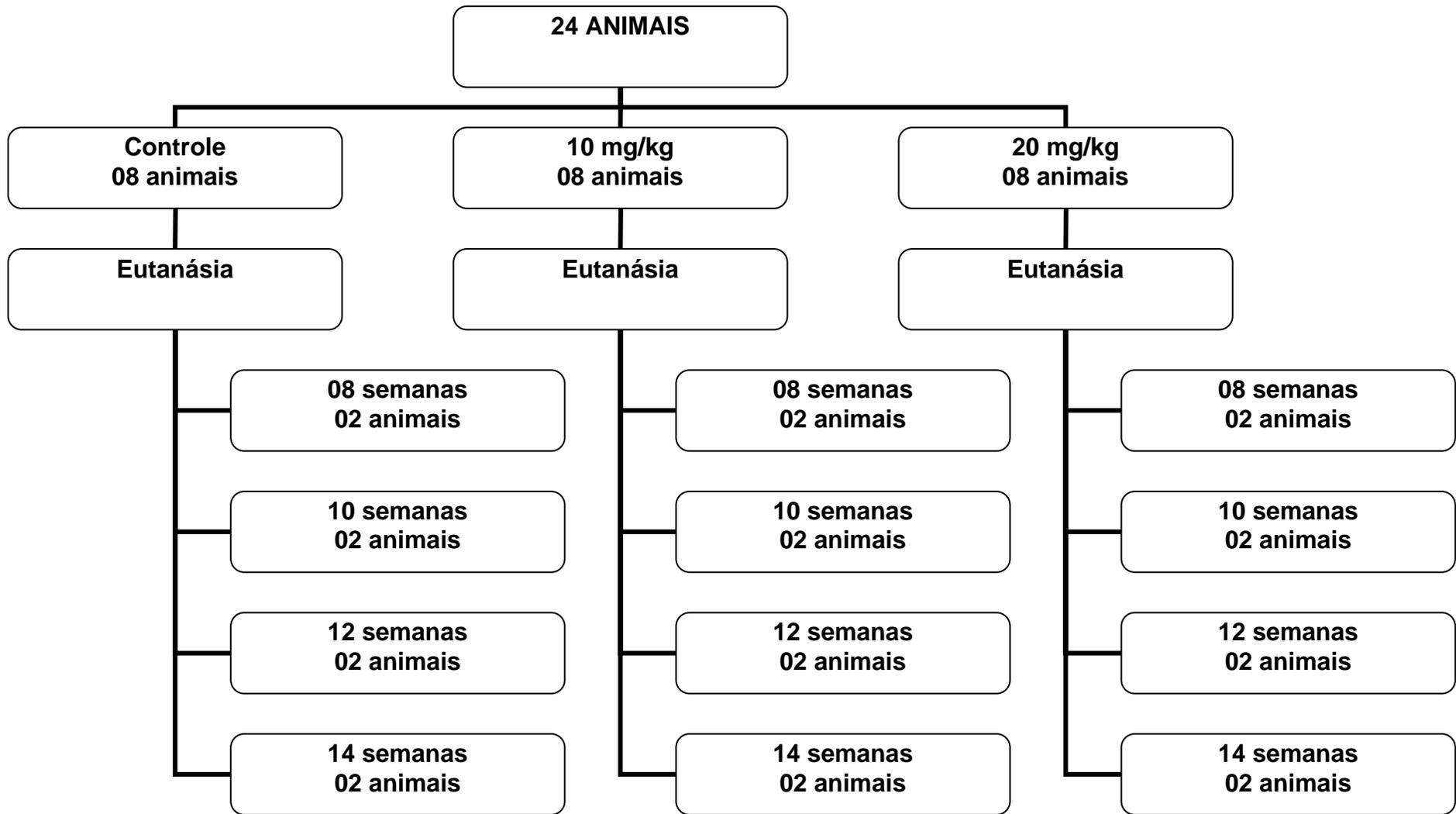


Figura 02: Caracterização do grupo Análise Histopatológica – HE

## 5. RESULTADOS

Pontos escuros de coloração pelo nitrato de prata foram identificados em todos os cortes do grupo proliferação celular. Não foram observadas alterações significantes no grupo controle. A análise estatística demonstrou haver diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,001$ ; ANOVA)

A análise pareada dos grupos em relação ao tempo de exposição mostrou diferença significativa entre os grupos submetidos à injeção do B[a]P. O grupo controle não mostrou diferença significativa em relação ao tempo de exposição. A figura 03 mostra os valores de média  $\pm$  desvio padrão da contagem dos pontos AgNOR do grupo experimental 10mg/kg decorridos 07 e 21 dias após a instilação do B[a]P, mostrando diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,009$ ; Teste t de Student).

Tabela 01: Média  $\pm$  desvio padrão da quantidade de pontos NOR por célula entre os grupos controle, 10mg/kg e 20mg/kg após 07 e 21 dias.

	Pontos NOR por célula	
	07 Dias	21 Dias
<b>Controle</b>	0,81 $\pm$ 0,13	0,71 $\pm$ 0,21
<b>10 mg/kg</b>	1,51 $\pm$ 0,86	1,84 $\pm$ 0,13
<b>20 mg/kg</b>	1,63 $\pm$ 0,11	2,48 $\pm$ 0,28

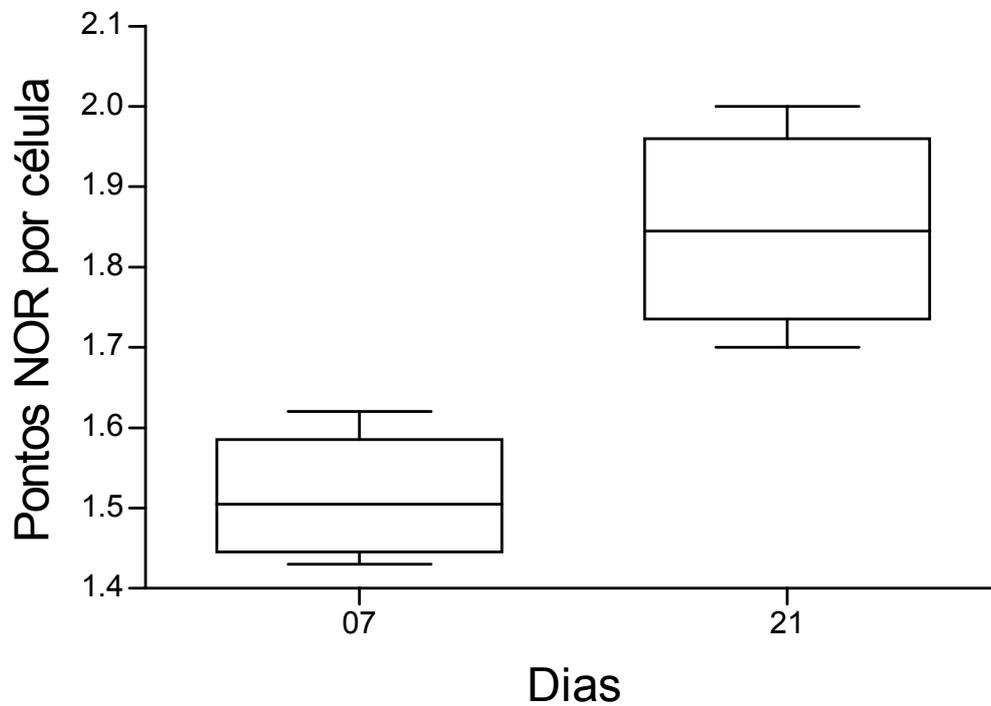


Figura 03 – Média e desvio padrão dos pontos NOR por células, comparação entre grupos experimentais 10mg/kg após 07 ( $1,51 \pm 0,86$ ) e 21 ( $1,84 \pm 0,13$ ) dias da injeção de B[a]P.

A figura 04 mostra a média  $\pm$  DP da quantidade de pontos AgNOR no grupo experimental 20mg/kg após 07 e 21 dias da injeção do B[a]P. Observa-se diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,006$ ; Teste t de Student)

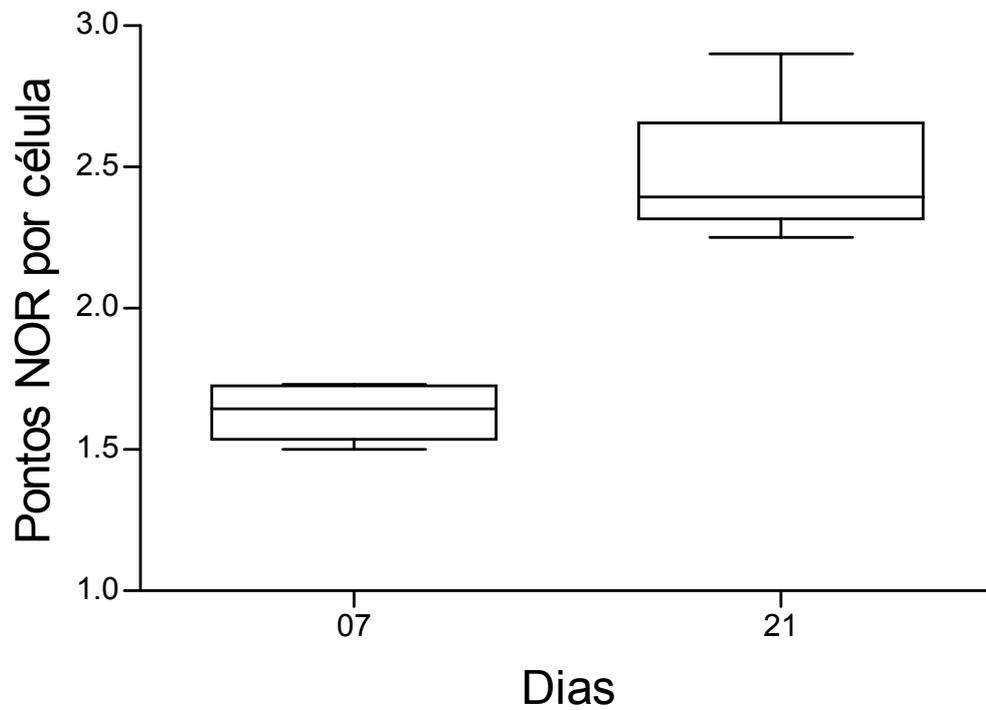


Figura 04 – Média e desvio padrão dos pontos NOR por células, comparação entre grupos experimentais 20mg/kg após 07 ( $1,63 \pm 0,11$ ) e 21 ( $2,48 \pm 0,28$ ) dias da injeção de B[a]P.

A figura 05 mostra a média  $\pm$  DP da quantidade de pontos AgNOR no grupo controle após 07 e 21 dias da injeção de álcool 70%. Observa-se ausência de significância entre os grupos ( $p = 0,47$ ; Teste t de Student)

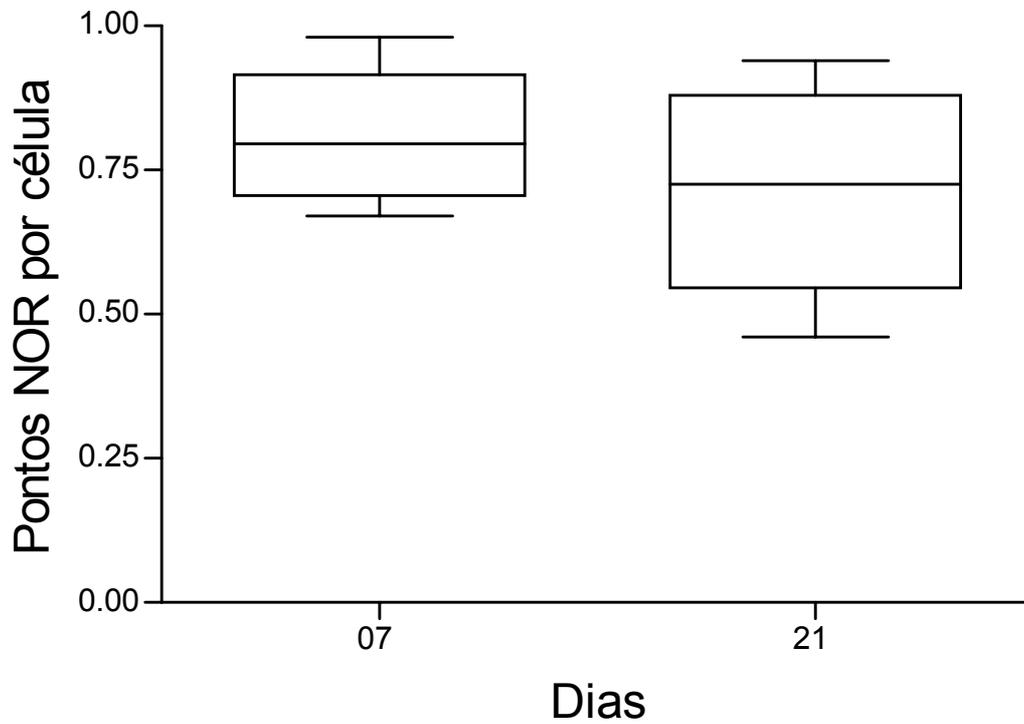


Figura 05 – Média e desvio padrão dos pontos NOR por células, comparação entre grupos controle após 07 (0,81±0,13) e 21 (0,71±0,21) dias da injeção de álcool 70%.

A figura 06 mostra média  $\pm$  DP da quantidade de pontos AgNOR entre os 03 grupos controle após 07 dias. A figura 07 mostra média  $\pm$  DP da quantidade de pontos AgNOR entre os 03 grupos controle após 21 dias.

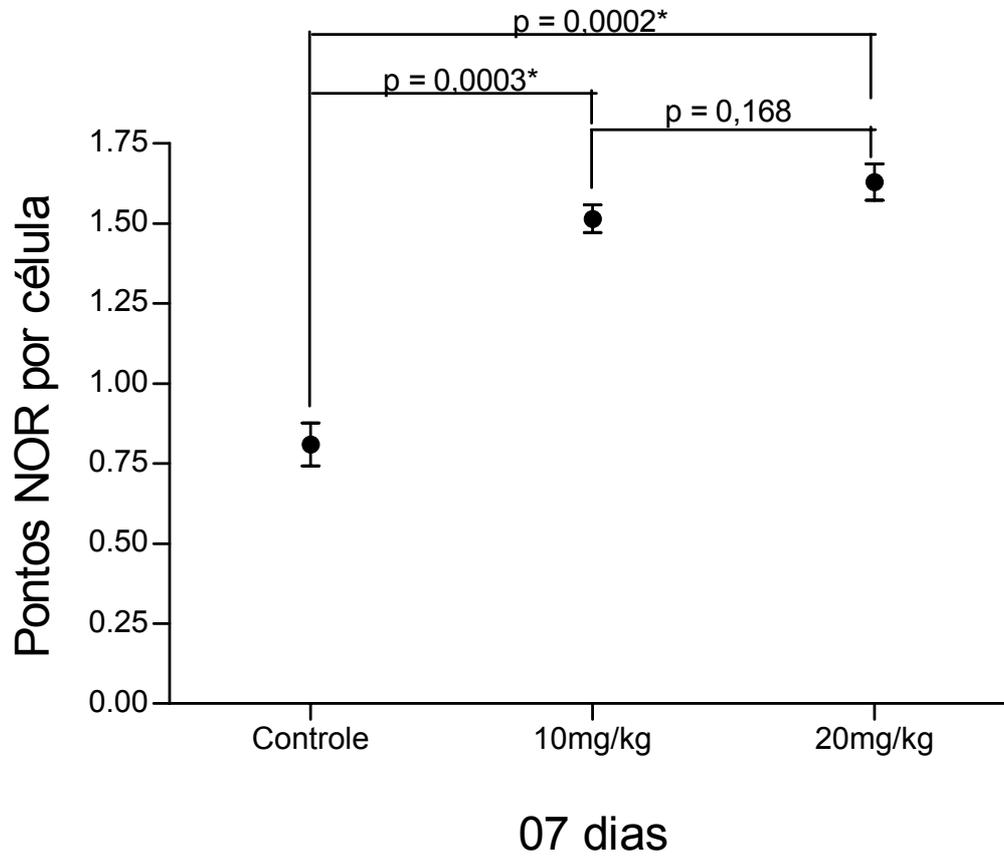


Figura 06 – Média e desvio padrão dos pontos NOR por células, comparação entre os três grupos controle após 07 dias. \* Diferença estatisticamente significativa.

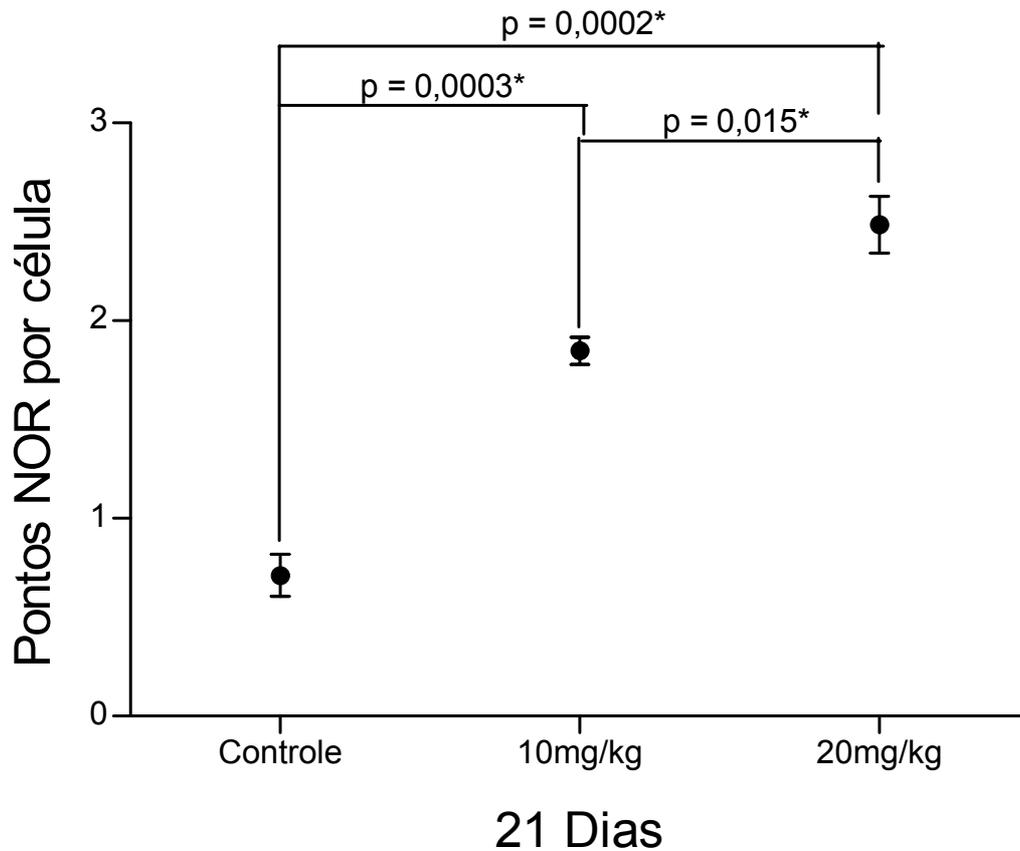


Figura 07 – Média e desvio padrão dos pontos NOR por células, comparação entre os três grupos controle após 21 dias. \* Diferença estatisticamente significativa.

Os achados da análise histopatológica nos grupos experimentais observados nas secções coradas por HE estão descritos no quadro 02. Alterações inflamatórias foram observadas em todos os animais dos grupos analisados, em três animais do grupo experimental 10mg (08, 10 e 14 semanas) e três do grupo experimental 20mg (08, 12 e 14 semanas) foram observadas hiperplasias nodulares linfóides (BALT, *bronchial associated lymphoid tissue*). (Figuras 06, 07 e 08)

Lesão sugestiva de indução tumoral foi observada em apenas um animal (grupo experimental 20mg, 12 semanas), que apresentou pleomorfismo sugestivo de adenocarcinoma *in situ* no epitélio traqueal. (Figura 09)

Quadro 02 – Descrição dos achados histopatológicos por grupo estudado nos períodos 8, 10, 12 e 14 semanas.

<b>GRUPO CONTROLE</b>	
08 Semanas	Ácinos alveolares com exudato protéico, infiltrados inflamatórios mononucleares e hemorragia e hiperermia vascular
10 Semanas	Processo inflamatório crônico, com espessamento dos sacos alveolares, infiltrados mononucleares, hemólise intravascular, áreas de enfisema.
12 Semanas	Espessamento dos sacos alveolares, infiltrados mononucleares, hemólise intravascular, áreas de enfisema.
14 Semanas	Espessamento dos sacos alveolares, infiltrados mononucleares, hemólise intravascular, áreas de enfisema
<b>GRUPO EXPERIMENTAL 10mg/kg</b>	
08 Semanas	Hiperplasia de BALT
10 Semanas	Infiltrados inflamatórios mononucleares, hiperemia vascular, hiperplasia de BALT
12 Semanas	Processos inflamatórios focais. Espessamento de parede alveolar.
14 Semanas	Processos inflamatórios focais. Hiperplasia de BALT.
<b>GRUPO EXPERIMENTAL 20mg/kg</b>	
08 Semanas	Ácinos alveolares com exudato protéico, infiltrados inflamatórios mononucleares. Hiperplasia de BALT.
10 Semanas	Enfisema pulmonar, congestão vascular, áreas focais de inflamação.
12 Semanas	Pleomorfismo em parede traqueal, compatível com adenocarcinoma <i>in situ</i> . Hiperplasia de BALT.
14 Semanas	Hiperplasia de BALT, enfisema pulmonar, congestão vascular, exudato proteico.

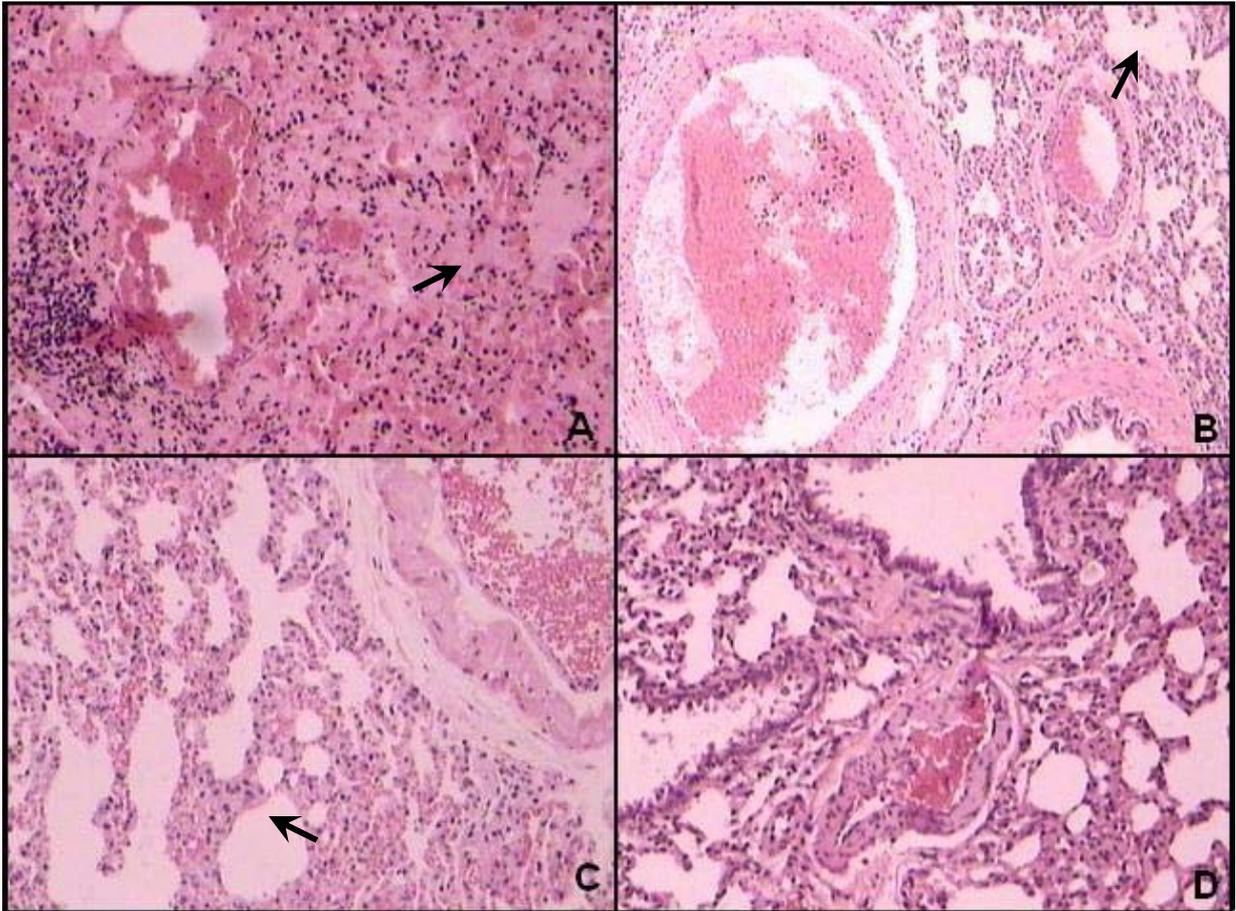


Figura 08: Microscopia das secções pulmonares do grupo Controle. A) 08 semanas. Nota-se processo inflamatório crônico difuso, a seta mostra ácidos alveolares com presença de exudato protéico. B) 10 semanas. Processo inflamatório crônico difuso. A seta indica área de enfisema pulmonar. C) 12 semanas. Processo inflamatório crônico difuso. A seta indica espessamento da parede alveolar secundário à inflamação. D) 14 semanas. Processo inflamatório crônico difuso, com áreas de enfisema e espessamento de paredes alveolares. (HE, 100X)

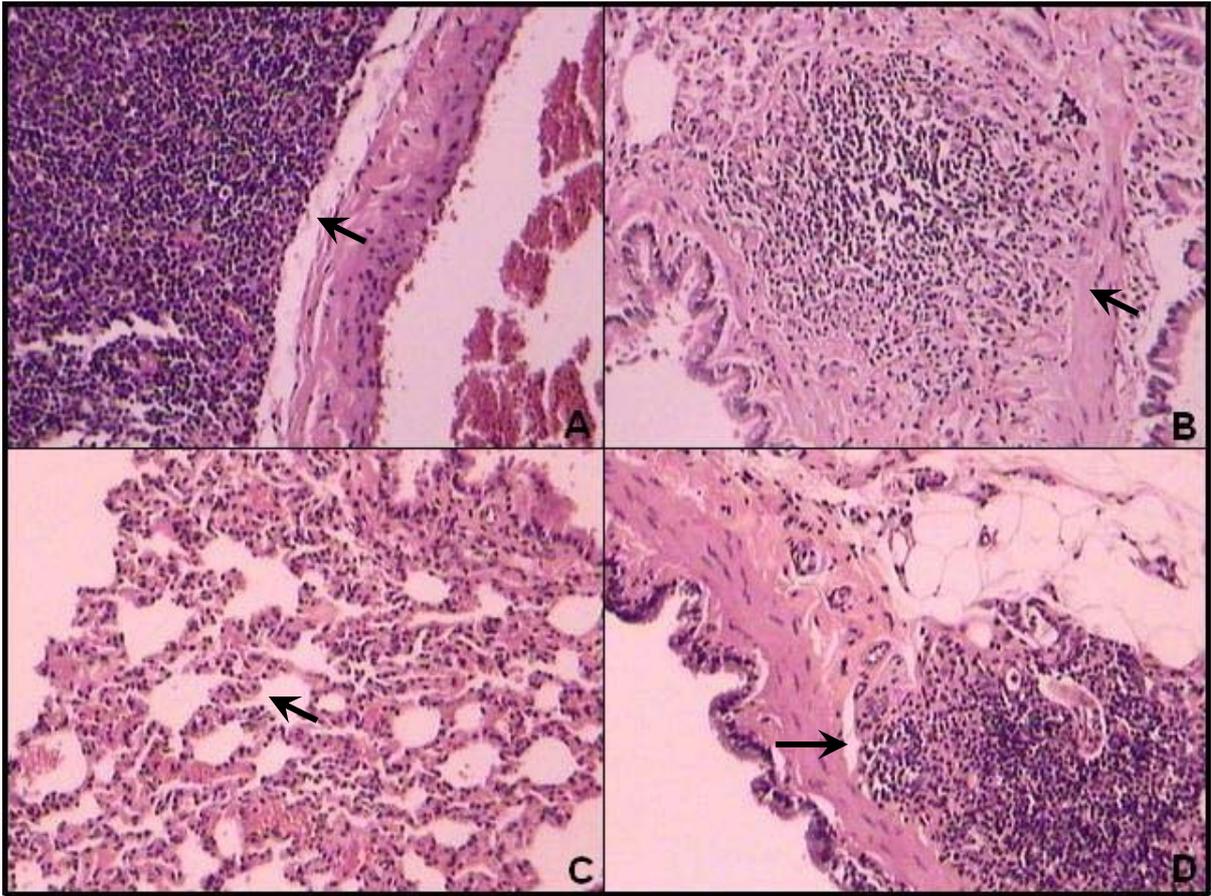


Figura 09: Microscopia das secções pulmonares do grupo 10mg/kg. A) 08 semanas. A seta mostra hiperplasia nodular linfóide (hiperplasia de BALT). B) 10 semanas. Processo inflamatório crônico difuso. A seta indica hiperplasia nodular linfóide (BALT). C) 12 semanas. Processos inflamatórios crônicos focais. A seta indica espessamento da parede alveolar. D) 14 semanas. Hiperplasia nodular linfóide (BALT). (HE, 100X)

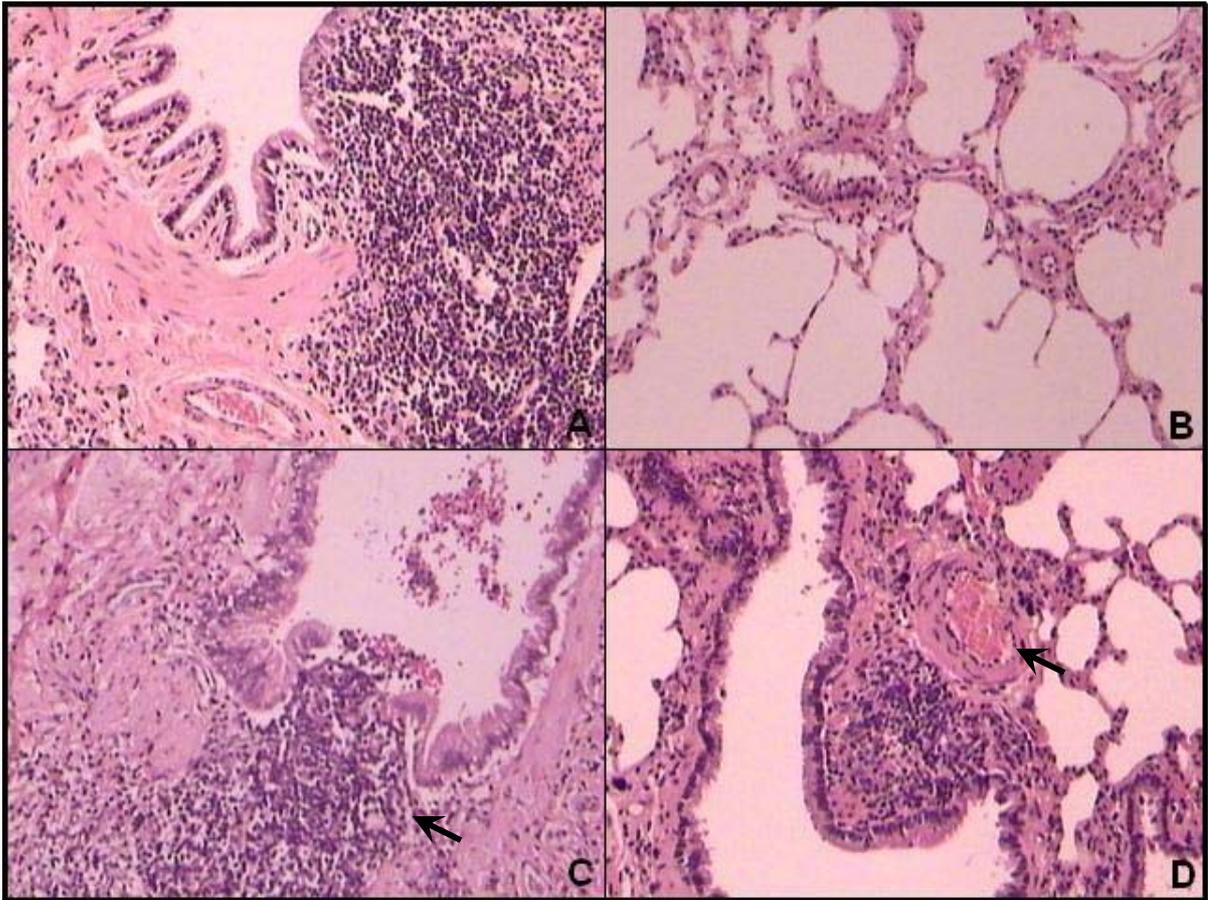


Figura 10: Microscopia das secções pulmonares do grupo 20mg/kg. A) 08 semanas. Hiperplasia nodular linfóide (BALT). B) 10 semanas. Enfisema pulmonar com áreas focais de inflamação. C) 12 semanas. Processo inflamatório crônico difuso. A seta mostra hiperplasia nodular linfóide (BALT). D) 14 semanas. Processo inflamatório crônico difuso, com áreas de enfisema e espessamento de paredes alveolares. Hiperplasia nodular linfóide (BALT). Vaso sanguíneo congestionado (seta). (HE, 100X)

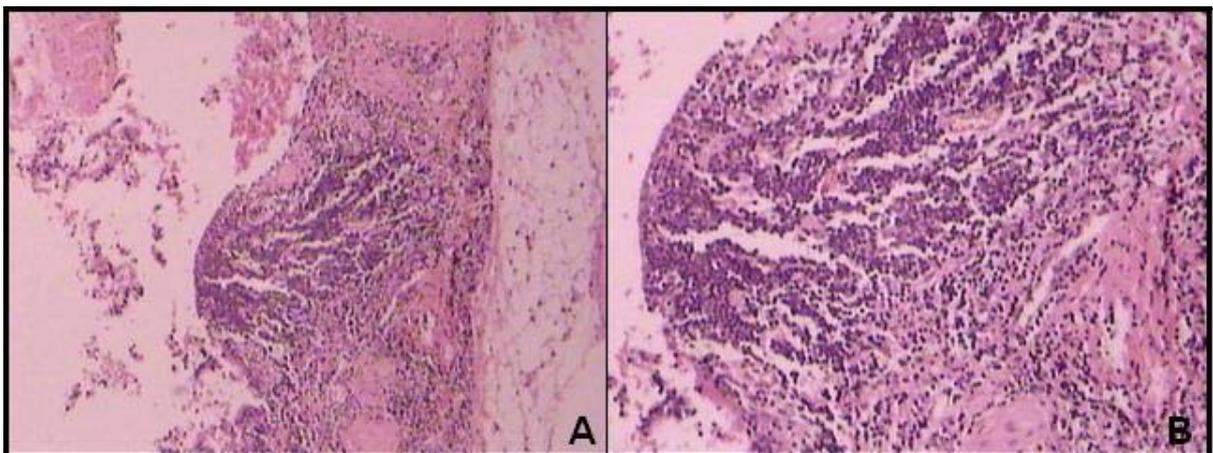


Figura 11: Microscopia de secção pulmonar. Grupo 20mg/kg, 12 semanas. Pleomorfismo compatível com adenocarcinoma *in situ*. (HE, A: 50X; B: 100X)

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo, optou-se pelo uso de ratos no desenvolvimento do modelo experimental. Segundo Dawkins e Stockley (2001), os ratos representam a melhor opção para modelos animais de doença, pois seu genoma tem sido extensivamente estudado e sua seqüência mostra similaridades com o genoma humano<sup>14</sup>.

Meuwissen e Berns (2005) afirma que os tumores espontâneos de pulmão em ratos são similares em morfologia, histopatologia e características moleculares dos adenocarcinomas humanos. Modelos de câncer de pulmão em ratos podem desta forma, servir como uma valiosa ferramenta não apenas para a compreensão das bases biológicas desses tumores, mas também para o desenvolvimento e validação de novas intervenções e estratégias no tratamento do câncer, bem como na identificação de marcadores para o diagnóstico precoce<sup>42</sup>.

Optou-se neste estudo pela injeção do B[a]P diluído via toracocentese, quando Garçon et al. (2001) oferece a instilação traqueal como opção de estudo sobre os efeitos dos HAP sobre o tecido pulmonar<sup>35</sup>.

Metodologia semelhante à deste estudo foi utilizada por Harrigan et al. (2004). Os autores relatam que, apesar da injeção via toracocentese ser aparentemente um método mais eficaz de indução do câncer, a baixa ativação metabólica encontrada no tecido pulmonar pode impossibilitar a ação do B[a]P enquanto carcinogênico<sup>60</sup>.

Gerde et al. (1997) enfatiza o papel do metabolismo tecidual na eliminação dos HAP, relatando em seu estudo que apenas 23% da dose instilada no epitélio traqueal é efetivamente absorvida<sup>56</sup>. Estudos utilizando administrações intra-traqueais repetidas de HAP mostraram-se incapazes de obter a dose resposta necessária à indução de câncer de pulmão com exatidão<sup>52</sup>.

O método de indução e a dose utilizada são referidos como um componente grandemente influente na carcinogênese pulmonar<sup>42</sup>.

A doses inicialmente aplicadas de B[a]P neste estudo foram 10mg/kg e 20mg/kg, e análise da proliferação celular (AgNOR) confirmou a dose-dependência na indução de alterações celulares pelo B[a]P, mostrando que os animais nos quais foi utilizada dose de 20mg/kg apresentaram contagem significativamente maior de pontos NOR ( $2,48 \pm 0,28$ ) que os animais do grupo 10mg/kg ( $1,84 \pm 0,13$ ) no vigésimo primeiro dia após instilação.

Durante a fase de detecção de proliferação celular, optou-se pela utilização da verificação da expressão de AgNOR como forma de identificar as alterações celulares nos animais submetidos à instilação do B[a]P. Muitos estudos têm mostrado o valor da avaliação morfométrica na diferenciação de alterações celulares como hiperplasias ou na detecção de lesões pré-malignas no epitélio brônquico<sup>61, 62</sup>.

A técnica de AgNOR tem sido investigada na patologia e citologia pulmonar como um marcador quantitativo, para diagnóstico e prognóstico da proliferação tumoral<sup>47</sup>. Rocher, Blanco e Palaoro (2000) relata que a expressão de AgNOR é um

importante discriminador da diferenciação entre células malignas e benignas em derrames pleurais serosos, e Kaneko et al. (1991) demonstrou correlação positiva entre contagem de AgNOR e sobrevida em pacientes em estágio I de câncer pulmonar de células não pequenas<sup>51, 63</sup>.

A contagem máxima da expressão de AgNOR observada neste estudo ( $2,48 \pm 0,28$ /célula), e sua diferença quando comparada a menor tempo de exposição sugere ter havido indução à proliferação celular. Entretanto, quando comparada à contagem relatada por Rocher. Blanco e Palaoro (2000) na confirmação de células mesoteliais reativas ( $4,88 \pm 1,5$ /célula), supõe-se subestimação do tempo de indução necessário à maior proliferação celular<sup>51</sup>.

Na análise da literatura disponível, não foram encontrados relatos sobre a dose-resposta exata de B[a]P necessária à indução de carcinogênese pulmonar, porém observa-se que nos trabalhos cujos resultados relacionaram a instilação de B[a]P a alterações teciduais, moleculares ou genéticas nos pulmões, as doses variaram entre 10mg/kg e 50mg/kg<sup>12, 56, 60</sup>.

Utilizou-se coloração por HE para a análise histopatológica. De acordo com Franklin (2000) a análise dos achados microscópicos das secções tumorais coradas por HE constitui ainda o método mais comumente utilizado para classificação do câncer de pulmão<sup>38</sup>.

Em apenas um dos animais estudados foram encontradas alterações sugestivas de neoplasia (pleomorfismo sugestivo de adenocarcinoma *in situ*),

observadas especificamente no epitélio traqueal. Rubin (2001) relata que quase a totalidade dos HAP são carcinogênicos completos, não necessitando de outras intervenções na indução experimental do câncer, porém ressalta diversas vezes em seu estudo que tal propriedade é condicionada à presença de tecido epitelial<sup>58</sup>.

A não observação de alterações compatíveis com câncer de pulmão (a exceção de um animal do grupo experimental 20mg/kg), pode ser explicada pela ausência de ativação metabólica. Garçon et al. (2001) sugerem que a exposição a um agente oxidante associado aos carcinogênicos induz maior liberação de mediadores pró-inflamatórios, contribuindo para o processo de ativação da carcinogênese<sup>12</sup>.

Em três animais dos grupos experimentais foi observada a presença de hiperplasia de BALT. Apesar de normalmente constituírem lesões inespecíficas, Ponticiello et al. (2000) e Miranda et al., (2003) consideram a lesão hiperplásica como uma das alterações associadas ao desenvolvimento do câncer de pulmão<sup>28, 39</sup>. Como outros linfomas, acredita-se que a hiperplasia de BALT origina-se a partir de uma hiperplasia linfóide por seleção neoplásica anormal, frequentemente associada a interação antigênica com poluentes ambientais<sup>64, 65, 66</sup>.

Todos animais estudados (inclusive do grupo controle) apresentaram algum grau de processo inflamatório. A inflamação tem sido associada ao desencadeamento de diversas doenças pulmonares, incluindo o câncer. Especialmente em experimentos utilizando-se ratos, o processo inflamatório

pulmonar é freqüente e diretamente relacionado à incidência de câncer de pulmão<sup>36</sup>.

56 .

Neste estudo foi realizada instilação simples da solução de diluição, provavelmente levando a processo inflamatório agudo. Miranda et al., (2003) relata que as frequentes mutações genéticas secundárias a agressão tecidual ocorrem continuamente e são reparadas pelo mecanismo de defesa celular, que exerce controle sobre o crescimento, a latência e a apoptose celular, reforçando a necessidade da continuidade do processo inflamatório na indução da carcinogênese<sup>28</sup>.

Observou-se neste estudo que respostas inflamatórias de diversos graus puderam ser observadas em todos os momentos analisados (8, 10, 12 e 14 semanas após a instilação). Lu, Ouyang e Huang (2006), reforçam a necessidade da agressão continua na indução do câncer, afirmando que em muitos casos a inflamação aguda pode contribuir para regressão da carcinogênese<sup>37</sup>.

Para estabelecimento da dose-resposta ideal ao desenvolvimento do câncer de pulmão, faz-se necessária a associação a um agente ativador da resposta metabólica pulmonar, sem a qual a reação ao B[a]P provavelmente será insuficiente para desencadeamento do processo de indução de neoplasias pulmonares via mutagênese.

## 7. CONCLUSÕES

A injeção intra-pulmonar de Benzopireno é um método de fácil realização, mas a observação de lesão carcinogênica ocorreu em apenas um animal (20mg/kg, 12 semanas). Hiperplasias nodulares linfóides do tipo BALT (considerada por alguns autores como possível lesão pré-carcinogênica) ocorreu em seis animais, sugerindo que a injeção intra-pulmonar possa constituir um modelo adequado quando utilizadas doses e períodos maiores de observação.

Para as doses utilizadas neste estudo foram observadas diferenças significativas na proliferação celular após a injeção intra-pulmonar de B[a]P. Tais diferenças mostraram-se tempo e dose-dependentes.

As principais alterações secundárias à instilação intra-pulmonar de B[a]P em ratos *Wistar* observadas neste estudo foram: proliferação celular, alterações inflamatórias de diversos graus e hiperplasias nodulares linfóides.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Spiro S, Porter JC. Lung Cancer – Where are we today? *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166: 1166-1196.
2. Alberts WM. Lung cancer guidelines. *Chest.* 2003; 123: S1-2.
3. Rom WN, Hay JG, Lee TC, Jiang Y, Tchou-Wong KM. Molecular and genetic aspects of lung cancer. *Am J Res Crit Care Med.* 2000; 161:1355-1367.
4. Rivera P, Detterbeck F, Metha A. Diagnosis of lung cancer. *Chest.* 2003; 123: 129-133.
5. Massion PP, Carbone DP. The molecular basis of lung cancer: molecular abnormalities and therapeutic implications. *Respir Res.* 2003; 4: 1-15.
6. Shamsuddin AKM, Gan R. Immunocytochemical localization of benzo(a)pyrene-DNA adducts in human tissues. *Hum Pathol.* 1988; 19: 309-315.
7. Dragnev K H, Stover D, Dmitrovsky E. Lung cancer prevention. *Chest.* 2003; 123: S60-71.
8. Lenox RJ. A model of human lung cancer. *Chest.* 2003; 123: 986-987.
9. Hetch SS, Issacs S, Trustin N. Lung tumor induction in A/J mice by the tobacco smoke carcinogens 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and benzo(a)pyrene: a potentially useful model for evaluation chemopreventive agents. *Carcinogenesis.* 1994; 15: 2721-2725.
10. Oga, S. Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Atheneu, 1996.
11. Kong LY, Luster MI, Dixon D, O'Grady J, Rosenthal GJ. Inhibition of lung immunity after intratracheal instillation of benzo(a)pyrene. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 150: 1123-1129.
12. Garçon G, Garry S, Gosset P, Zerimech F, Martin A, Hannotiaux MH, Shirali P. Benzo(a)pyrene-coated onto Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles-induced lung tissue injury: role of free radicals. *Cancer Lett.* 2001; 167: 7-15.
13. Wolterbeek APM. Effects of vitamin A and beta-carotene on respiratory tract carcinogenesis in hamsters: in vivo and in vitro studies. WAU Dissertation no. 1924. 1995.
14. Dawkins PA, Stockley RA. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2001; 56: 972-977.
15. Benfield JR, Hammond WG. Bronchial and pulmonary carcinogenesis at focal sites in dogs and hamsters. *Cancer Research.* 1992; 52: S2687-2693.

16. Agen BV, Maas LM, Zwingmann IH, Schooteen FJ, Kleinjans JCS. B[a]P-DNA adduct formation and induction of human epithelial lung cell transformation. *Environ. Mol. Mutagen.* 2001; 30: 287-292.
17. Uehara C, Jamnik S, Santoro IL. Câncer de pulmão. *Med, Ribeirão Preto.* 1998; 31: 266-276.
18. World Health Organization. Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. *Rev Panam Salud Publica.* 2002; 12(5): 366-370.
19. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2005.
20. Castro MSM, Vieira VA, Assunção RM. Padrões espaço-temporais da mortalidade por câncer de pulmão no sul do Brasil. *Rev Bras Epidemiol.* 2004; 7(2): 131-143.
21. Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer.* 2002; 97(1): 72-81.
22. Guerra MR, Gallo CVM, Mendonça GAS. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Rev Bras Cancerol.* 2005; 51(3): 227-234.
23. Barros JA, Valladares G, Faria AR, Fugita EM, Ruiz AP, Vianna AGD, Trevisan L, Oliveira FAM. Diagnóstico precoce do câncer de pulmão: o grande desafio. Variáveis epidemiológicas e clínicas, estadiamento e tratamento. *J Bras Pneumol.* 2006; 32(3): 221-227.
24. Duarte RLM, Paschoal MEM. Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. *J Bras Pneumol.* 2005; 32(1): 56-65.
25. Oliveira TB, Cury PM. Câncer de pulmão. *HB Cient.* 2002; 9(1): 25-38.
26. Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax Surg.* 2003; 76: 167-174.
27. Tammemagi CM, Neslund-Dudas C, Simoff M, Kvale P. Smoking and lung cancer survival: the role of comorbidity and treatment. *Chest.* 2004; 125: 27-37.
28. Miranda DGN, Jamnik S, Santoro IL, Uehara C. Avaliação do escarro induzido no diagnóstico do carcinoma brônquico. *Rev Bras Cancerol.* 2003; 49(2): 91-98.
29. Filley GF. Premalignant evolution of lung cancer. *Chest.* 2004; 125: S90-94.
30. Dowell JE, Minna JD. Chasing mutations in the epidermal growth factor in lung cancer. *N Engl J Med.* 2005; 352: 830-832.

31. Forgacs E, Zöchbauer-Müller S, Oláh E, Minna JD. Molecular genetic abnormalities in the pathogenesis of human lung cancer. *Pathol Oncol Res.* 2001; 7(1): 6-13.
32. Audic Y, Hartley RS. Post-transcriptional regulation in cancer. *Biol Cell.* 2004; 96: 479-498.
33. Germenis AE, Karanikas V, Gourgoulialis KI. Lung cancer: immunosurveillance, immunoediting or immunoepigenetics?. *Pneumon.* 2005; 3(18): 291-297.
34. Smith GR, Missailidis S. Cancer, inflammation and the AT1 and AT2 receptors. *J Inflamm.* 2004; 1: 1-13.
35. Garçon G, Gosset P, Garry S, Marez T, Hanothiaux MH, Shirali P. Pulmonary induction of proinflammatory mediators following the rat exposure to benzo(a)pyrene-coated onto Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles. *Toxicol Lett.* 2001; 121: 107-117.
36. Leibovici D, Grossman HB, Dinney CP, Millikan RE, Lerner S, Wang Y, Gu J, Dong Q, Wu X. Polymorphisms in inflammation genes and bladder cancer: from initiation to recurrence, progression, and survival. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 5746-5756.
37. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res.* 2006; 4(4): 1-13.
38. Franklin WA. Diagnosis of lung cancer – pathology of invasive and preinvasive neoplasia. *Chest.* 2000; 117: S80-89.
39. Ponticelli A, Barra E, Giani U, Bocchino M, Sanduzzi A. p53 immunohistochemistry can identify bronchial dysplastic lesions proceeding to lung cancer: a prospective study. *Eur Respir J.* 2000; 15: 547-552.
40. World Health Organization. Histological typing of lung tumors. 3<sup>th</sup> ed. Geneva: World Health Organization, 1999.
41. Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest.* 1997; 111: 1710-1717.
42. Meuwissen R, Berns A. Mouse models for human lung cancer. *Genes & Dev.* 2005; 19: 643-664.
43. Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Chest.* 2002; 122:1037-1057.
44. Capelozzi VL. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. *J Pneumol.* 2001; 27(6): 321-328.
45. Capelozzi VL, Saber AMA, Silva AGP, Gallo CP, Brandão F. Requisitos mínimos para o laudo de anatomia patológica em câncer de pulmão: justificativa na patogênese. *J Pneumol.* 2002; 28(4): 201-218.

46. Au NHC, Cheang M, Huntsman DG, Yorida E, Coldman A, Elliott WM, Bebb G, Flint J, English J, Gilks CB, Grimes HL. Evaluation of immunohistochemical markers in non-small cell lung cancer by unsupervised hierarchical clustering analysis: a tissue microarray study of 284 cases and 18 markers. *J Pathol.* 2004; 204(1): 101-109.
47. Chern JH, Lee YC, Yang MH, Chang SC, Perng RP. Usefulness of argyrophilic nucleolar organizer regions score to differentiate suspicious malignancy in pulmonary cytology. *Chest.* 1997; 111: 1591-1596.
48. Rodrigues OR, Antonangelo L, Yagi N, Minamoto H, Fernandes S, Capelozzi VL, Goldenberg S, Saldiva PHN. Prognostic significance of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) in resected non-small cell lung cancer (NSCLC). *Jpn J Clin Oncol.* 1997; 27(5): 298-304.
49. Palomo-González MJ, Pérez-Requena J, Rego-González M, López-Nieto M, Benites CC. Evaluación de regiones organizadoras nucleolares argirófilas (AgNORs) en neoplasias foliculares tiroideas. *Rev Esp Patol.* 2002; 35(1): 95-100.
50. Antonangelo L, Bernaldi FDC, Capelozzi VL, Takagaki TY, Younes RN, Yagi N, Saldiva PHNS. Morphometric evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions in useful in predicting long-term survival in squamous cell carcinoma of the lung. *Chest.* 1997; 111: 110-114.
51. Rocher AE, Blanco AM, Palaoro LA. Utilidad de la técnica de AgNOR en la interpretación de los derrames de cavidades serosas. *Rev Méd Chile.* 2000; 128(9): 963-968.
52. Hammond WG, Teplitz RL, Benfield JR. A step section method for full histopathological assessment of carcinogen-affected target tissue during respiratory carcinogenesis. *Microsc Res Tech.* 1993; 26: 466-471.
53. Garry S, Nesslany F, El Moukhtar A, Haguenoer JM, Marzin D. Potent genotoxic activity of benzo[a]pyrene coated onto hematite measured by unscheduled DNA synthesis in vivo in the rat. *Mutagenesis.* 2003; 18(5): 449-455.
54. Gerde P, Muggenburg BA, Lundborg M, Dahl AR. The rapid alveolar absorption of diesel soot-absorbed benzo[a]pyrene: bioavailability, metabolism and dosimetry of an inhaled particle-borne carcinogen. *Carcinogenesis.* 2001; 22(5): 741-749.
55. Wong DTW, Biswas DK. Mechanism of benzo[a]pyrene induction of alpha-human chorionic gonadotropin gene expression in human lung tumor cells. *J Cell Biol.* 1985; 101: 2245-2252.
56. Gerde P, Muggenburg BA, Thornton-Manning JR, Lewis JL, Pyon KH, Dahl AR. Benzo[a]pyrene at an environmentally relevant dose is slowly absorbed by, and extensively metabolized in, tracheal epithelium. *Carcinogenesis.* 1997; 18(9): 1825-1832.

57. Hetch SS. Metabolically activated carcinogens and mutations in the p53 tumor suppressor gene in lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(10): 782-783.
58. Rubin H. Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis.* 2001; 22(12): 1903-1930.
59. Roggebrand R, Wolterbeek AP, Melis OW, Wittekoek ME, Rutten AA, Feron VJ, Baan RA. DNA adduct formation and repair in hamster and rat tracheas exposed to benzo[a]pyrene in organ culture. *Carcinogenesis.* 1994; 15: 661-665.
60. Harrigan JA, Vezina CM, McGarrigle BP, Ersing N, Box HC, Maccubbin AE, Olson JR. DNA adduct formation in precision-cut rat liver and lung slices exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicol Sci.* 2004; 77(2): 307-314.
61. Abe S, Ogura S, Kunikane H, Suko N, Watanabe N, Nakajima I, et al. Nucleolar organizer regions in precancerous and cancerous lesions of the bronchus. *Cancer.* 1991; 67: 472-475.
62. Fisseler-Eckhoff A, Becker T, Sudhoff H, Muller KM. AgNOR counts in preneoplastic lesions of the bronchus. *Pathol Res Pract.* 1994; 190: 389-393.
63. Kaneko S, Ishida T, Sugio K, Yokoyama H, Sugimachi K. Nucleolar organizer regions as a prognostic indicator for stage I non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1991; 51: 4008-4011.
64. Salinas J, Leiva IR, González SB. Proliferaciones linforreticulares del pulmón. *Rev Chil Enf Respir.* 2006; 22: 108-116.
65. Swigris JJ, Berry GJ, Raffin TA, Kischner WG. Lymphoid interstitial pneumonia. *Chest.* 2002; 122: 2150-2164.
66. Porter DW, Hubbs AF, Mercer R, Robinson VA, Ramsey D, McLaurin J et al. Progression of lung inflammation and damage in rats after cessation of silica inhalation. *Toxicol Sci.* 2004; 79: 370-380.

## **APÊNDICE**



Figura 12: Posicionamento e incisão utilizados para retirada do pulmão.

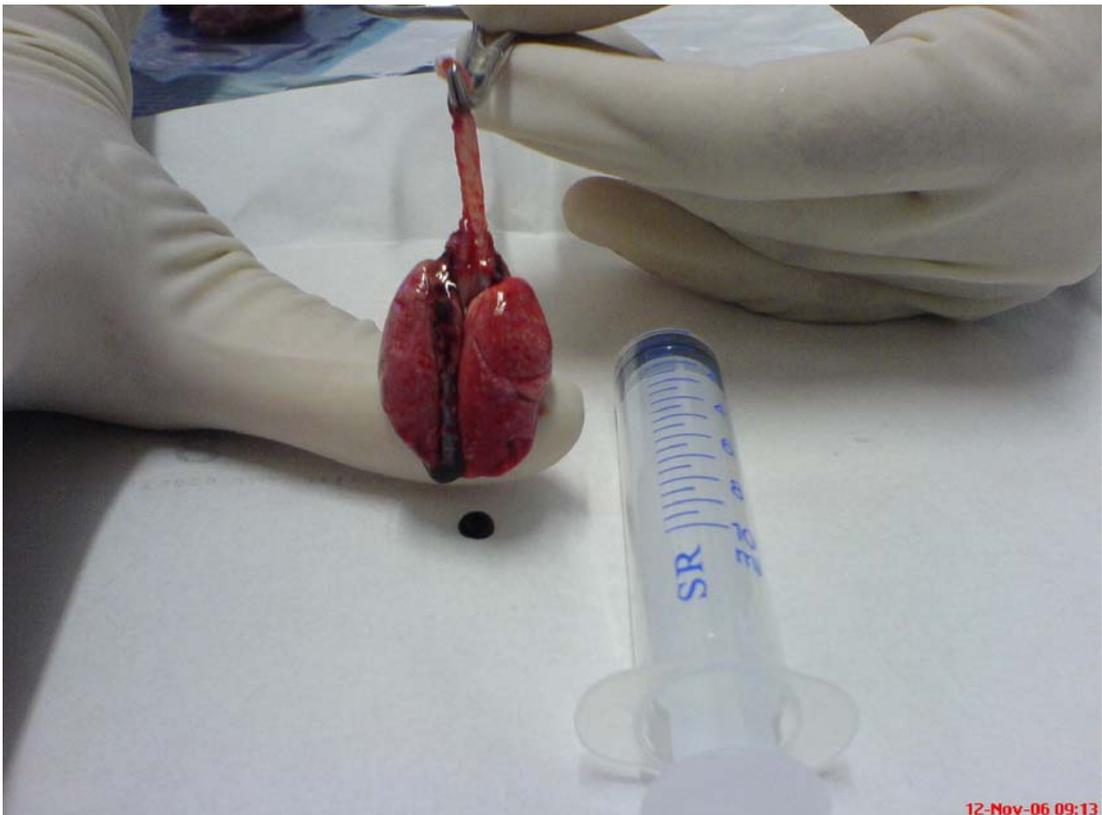
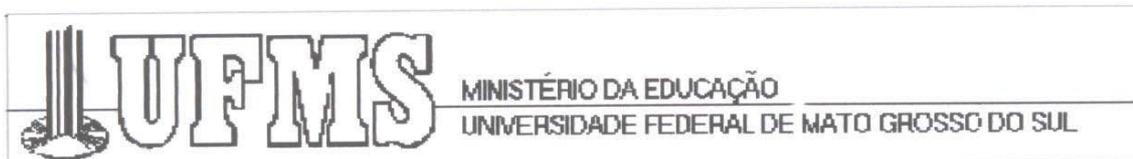


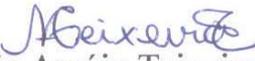
Figura 13: Sistema respiratório após retirada. Notar insuflação pulmonar mantida pelo pinçamento traqueal.

## **ANEXOS**

**ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA****C E R T I F I C A D O**

Certificamos que o Protocolo n.º. 72/2005 do Mestrando **Baldomero Antonio Kato da Silva**, sob a Orientação da Prof<sup>a</sup> Iandara Schettert da Silva, referente ao projeto de pesquisa "**Elaboração de um modelo experimental de carcinogênese pulmonar em ratos wistar**", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS**, em reunião de 21 de fevereiro de 2005.

Campo Grande (MS), 25 de fevereiro de 2005.

  
Dr<sup>a</sup> Maria Araújo Teixeira  
Presidente da CEUA

  
Prof<sup>a</sup> Joice Stein  
Vice-Presidente da CEUA

## ANEXO B – ARTIGO

### Usefulness of Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions in detection of lung cells alterations after Benzo[a]Pyrene instillation

Baldomero Antonio Kato da Silva<sup>1</sup>

landara Schettert Silva<sup>2</sup>

Daniel Martins Pereira<sup>3</sup>

Ricardo Dutra Aydos<sup>4</sup>

Paulo de Tarso Camillo de Carvalho<sup>5</sup>

1. Fellow Master Degree in Health Sciences Post-Graduation from UnB/UFMS/UFG; Associate Professor at UNIDERP.
2. PhD in Experimental Surgery from UNIFESP; Associate Professor at UNIDERP.
3. Fellow Master Degree in Health and Development Post Graduation from UFMS; Associate Professor at UNIDERP.
4. PhD in Experimental Surgery from UNIFESP; Associate Professor at Clinical Surgery/UFMS.
5. PhD in Orthopedics, Traumatology and Rehabilitation from USP; Associate Professor at UNIDERP.

#### Abstract

**Objective:** This study aimed to verify the relationship between AgNOR expression and lung tissues changes of *wistar* rats after pulmonary instillation of benzo[a]pyrene (B[a]P). **Methods:** Male *Rattus norvegicus albinus*, *Wistar* lineage were given a single intrapulmonary instillation of B[a]P at doses of 10 and 20 mg/kg in a volume of approximately 0,3 ml. After 7 and 21 days the rats were killed and the lung slices submitted to a histological technique of AgNOR. AgNOR dots were quantified and the result analyzed by statistical tests;  $p \leq 0,05$  was considered significant. **Results:** The mean values of AgNOR dots for the experimental groups 10/7 ( $1,51 \pm 0,86$ ) and 10/21 ( $1,84 \pm 0,13$ ) were statistically different ( $p = 0,009$ ). Among the groups 20/7 ( $1,63 \pm 0,11$ ) and 20/21 ( $2,48 \pm 0,28$ ) was observed statistically significant difference ( $p = 0,003$ ). **Conclusion:** Results suggest that the AgNOR technique can be useful in identification of cells changes induced by B[a]P.

**Key words:** Benzo[a]pyrene, Biological Markers, Nucleolus Organizer Regions

Correspondence to: Baldomero Antonio Kato da Silva. Gardênia No. 129, BI F, Ap 202, Cidade Jardim, CEP 79040-570, Campo Grande, MS, Brazil.

## Introduction

Lung cancer is the major cause of cancer related mortalities in the Western world. In the United States an estimated 170.000 individuals will die from this deadly disease despite the best current treatment approaches<sup>1</sup>.

In the study of cancer, the efficacy of new treatment ideas in various cell lines can be investigated<sup>2,3</sup>, and a animal model of tumor permits the evaluation *in vivo* of new chemotherapeutic drugs in the treatment of bronchogenic lung cancer<sup>4</sup>.

Clinically evident lung cancers have clonal genetic changes involving mutations or expression abnormalities in multiple genes. If we can detect some of these genetics alterations in preneoplastic respiratory epithelial lesions before cancer develops, early intervention and chemoprevention in such high risk individuals could greatly increase survival rates<sup>5</sup>.

Environmental air pollution and smoking habits are the main sources of inhalation exposure to carcinogenic agents such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)<sup>6</sup>. PAHs are currently recognized as one of major classes of environmental carcinogenic pollutants<sup>7</sup>.

Benzo[a]pyrene (B[a]P) is a member of PAH family, and is often used as a model compound for PAH toxicity studies and has been shown to be a potent lung carcinogen in animal models of lung cancer. The selective carcinogenesis of the lung following exposure to B[a]P may be a consequence of many biochemical factors, including those that affect absorption, metabolism, and DNA repair<sup>8</sup>.

The pathogenesis of lung cancer involves the accumulation of multiple molecular abnormalities over a long period of time. The alterations can happen at the level of gene silencing through methylation, DNA sequence changes, DNA segment amplification or deletion or whole chromosome gains or losses. These changes occur early in normal-appearing tissues that do not have the characteristics of cancer cells<sup>9</sup>.

Determining the prognosis for an individual patient with lung cancer is difficult, in part because of the marked clinical heterogeneity of patients with the disease. This variation in clinical presentation and potential progression are, in turn, due to the multiple potential manifestation of the primary tumor, of involved metastatic sites, and

of paraneoplastic syndromes. Despite of the clinical manifestations of lung cancer, the prognosis for a population of patients with lung cancer is remarkably predictable<sup>10</sup>.

The inability to decide on the presence or absence of malignant cells in cytologic specimens cast a difficult problem in clinical management<sup>11</sup>. Biological markers are studied in diverse primary neoplasms. However, few of them proved to be clinically valuable, and the role of biological markers in lung cancer remains unclear because only a small number of markers has been properly assessed<sup>12</sup>.

Argyrophilic staining for nucleolar organizer regions (AgNOR) is a technique to detect the argyrophilia of nucleolar organizer regions (NOR)-related proteins<sup>11</sup>. NORs are segments of DNA coding ribosomal genes and are situated on the short arms of acrocentric chromosomes. They can be demonstrated in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by one-step silver staining, the resulting black dots being termed AgNORs<sup>13</sup>.

NORs identified by means of an AgNOR were shown to be of value in determining prognosis in malignant tumors. Due to its sharp optical contrast, AgNOR expression can be easily quantified by morphometric procedures, making it possible to obtain a numeric indicator of the proliferative activity of the cells under study<sup>14</sup>.

The aim of this study is to verify the relationship between AgNOR expression and lung tissues changes of *wistar* rats after pulmonary instillation of benzo[a]pyrene.

## Methods

Male *Rattus norvegicus albinus*, *Wistar* lineage 08 to 12 weeks of age were obtained from UFMS central bioterio. Animals were housed four per cage on hardwood chip bedding and were given food and purified tap water ad libitum. Rats were randomized into treatment groups and were quarantined for 2 weeks prior to treatment, during which time they were acclimatized to 12-h light-dark cycles.

B[a]P was suspended in alcohol 70% solution to obtain 10 and 20 mg/ml concentrations. Rats were anesthetized with a mixture of ketamine and xilazine, positioned in supine and a thoracocentesis with a 13X4,5 needle was realized in left lung.

Rats (four per group) were given a single intrapulmonary instillation of B[a]P at doses of 10 and 20 mg/kg in a volume of approximately 0,3 ml using a 1-ml sterile

syringe that was attached to the needle. The animals were divided in four groups: 10/7 (10 mg of B[a]P, killed after 7 days); 10/21 (10 mg of B[a]P, killed after 21 days); 20/7 (20 mg of B[a]P, killed after 7 days); 20/21 (20 mg of B[a]P, killed after 21 days). A group of 04 rats (control) were also instilled with alcohol 70%.

Until their sacrifice, all animals were maintained four per cage under controlled ambient conditions and with free access to food and water. Rats were killed by intraperitoneal infusion of lethal dose of sodium pentobarbital on days 7 and 21 after intrapulmonary instillation.

Sections of 3  $\mu\text{m}$ , obtained from each paraffin block of the longitudinal cut of left lung were selected and stained by the one-step silver colloid method. The sections were dewaxed in xylene and rehydrated through decreasing concentration of ethanol to distilled water. The AgNOR solution was freshly prepared by dissolving gelatin at a concentration of 2 g/dl aqueous formic acid. This solution was added to 50 g/dl aqueous silver nitrate solution. This final solution was then immediately poured on to the slides, which were left in the dark at room temperature for 45 min. The silver colloid was washed from the sections with distilled water and the sections were dehydrated through a graded series of ethanol to xylene<sup>13</sup>. The slices were examined by light microscopy at 1000X magnification and an oil-immersion lens.

Statistical evaluation was performed using Analysis of Variance followed Dunnet's multiple comparison test for dose-response data. If applicable, Student's *t* test was used for pairwise comparison. The difference was considered significant when  $p \leq 0,05$ . The statistical procedures were followed with the aid of Bioestat 3.0 statistical software.

All experiments respected the international rules for animal experimentation.

## Results

Black silver-stained dots for AgNOR were clearly identified in all slices of the experimental group. The AgNOR dots were identified as black points within the nuclei. Significant alteration wasn't observed in control group. There is a statistically significant difference among all the experimental groups ( $p < 0,001$ ; ANOVA).

Figure 1 shows the mean values (and standard deviation) of AgNOR values for the different days of the 10/7 and 10/21 experimental groups. There is a statistically significant difference among the groups ( $p = 0,009$ ; Student's *t* test).

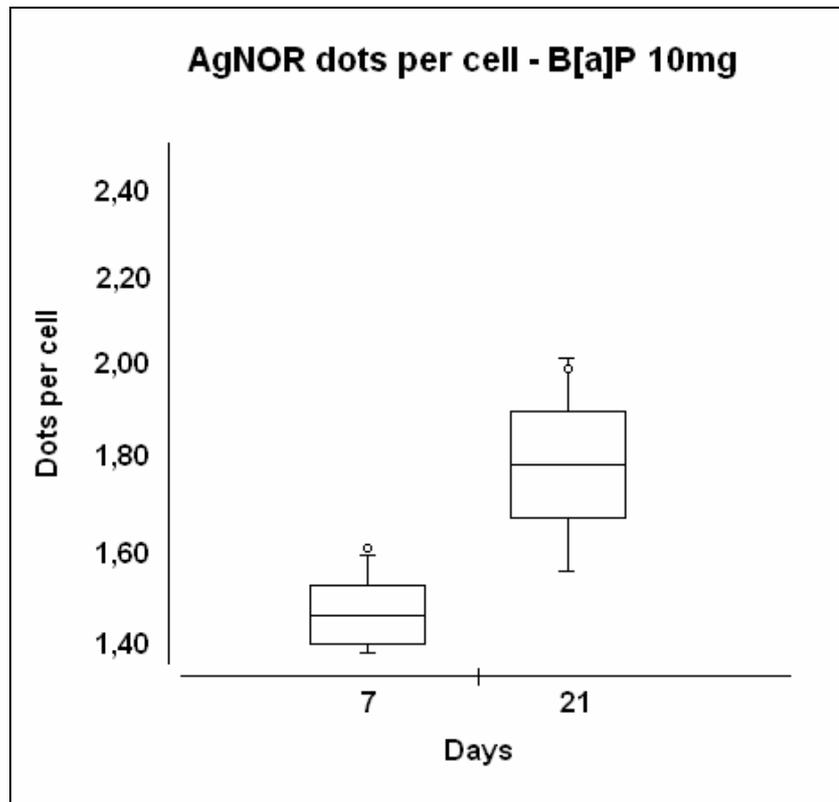


Figure 1. Mean and standard deviation of 10/7 ( $1,51 \pm 0,86$ ) and 10/21 ( $1,84 \pm 0,13$ ) experimental groups.

Figure 2 shows the mean values (and standard deviation) of AgNOR values for the different days of the 20/7 and 20/21 experimental groups. There is a

statistically significant difference among the groups ( $p = 0,003$ ). 10/21 and 20/21 ( $p = 0,006$ ; Student's  $t$  test).

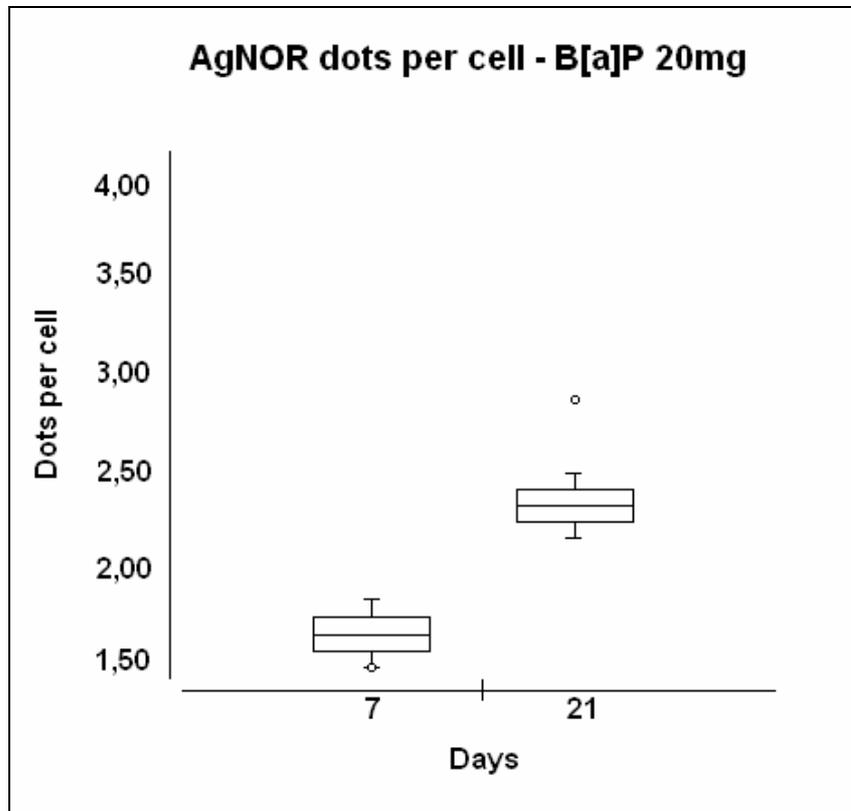


Figure 2. Mean and standard deviation of 20/7 ( $1,63 \pm 0,11$ ) and 20/21 ( $2,48 \pm 0,28$ ) experimental groups.

## Discussion

The present study was designed to verify the expression of AgNOR in cellular alterations of wistar rats submitted to intrapulmonary instillation of B[a]P.

Many studies have proved the value of morphometric evaluation of AgNOR in the differentiation of hyperplasia from incipient cellular alterations or in the detection of premalignant lesions of bronchial epithelium<sup>15,16</sup>.

The AgNOR technique has been investigated in pulmonary pathology and cytology as a quantitative diagnostic aid and a marker of tumor proliferating capacity and prognosis<sup>11</sup>.

Rocher *et al*<sup>17</sup> found the expression of AgNOR such a important discriminator between benign and malignant cells in serous effusion. Kaneko *et al*<sup>18</sup> demonstrated

a positive correlation between AgNOR and survival of patients at stage I of non-small cell lung cancer.

B[a]P has been used as a prototype carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons since its isolation from coal tar in the 1930's. It produce a wide range of toxicities, including carcinogenicity in experimental animals, and acute inhalation induces squamous cell papillomas and carcinomas in the trachea<sup>19</sup>.

Many studies have been reported animal B[a]P exposure by a single intratracheal instillation. However, in this study was performed intrapulmonary instillation of B[a]P by thoracocentesis, although inhalation is one of the primary routes of its exposure.

The differences between AgNOR area per  $\mu\text{m}^2$  have been used in some studies as a method of quantify the number of malignant cells<sup>11</sup>. Rocher *et al* describe an average of  $4,88 \pm 1,5$  AgNOR particles for each reactive mesothelial cells<sup>17</sup>. The low amount of AgNOR spots observed in this study ( $2,48 \pm 0,28$  per cell) suggest underestimate exposition time of animals to B[a]P.

## **Conclusion**

Results suggest that the AgNOR technique can be useful in identification of cells changes induced by B[a]P. Further studies will help clarify the real value of AgNOR technique in the pathogenesis identification of lung neoplastic diseases.

## RESUMO

**Objetivo:** o objetivo deste estudo foi verificar a relação entre a expressão de AgNOR e alterações teciduais pulmonares em ratos *wistar* após instilação pulmonar de benzo[a]pireno (B[a]P). **Métodos:** *Rattus norvegicus albinus*, linhagem *Wistar* machos foram submetidos à instilação pulmonar única de B[a]P em doses de 10 e 20mg/kg, em um volume aproximado de 0,3 ml. Os animais foram sacrificados após 7 e 21 dias e o tecido pulmonar submetido a técnica histológica de AgNOR. Os pontos AgNOR foram quantificados e os resultados analisados estatisticamente; foram considerados significantes os valores de  $p \leq 0,05$ . **Resultados:** Os valores médios de pontos AgNOR no grupo experimental 10/7 ( $1,51 \pm 0,86$ ) e 10/21 ( $1,84 \pm 0,13$ ) foram estatisticamente significantes ( $p = 0,009$ ). Entre os grupos 20/7 ( $1,63 \pm 0,11$ ) e 20/21 ( $2,48 \pm 0,28$ ) a diferença observada foi também considerada significativa ( $p = 0,003$ ). **Conclusão:** Os resultados sugerem que a técnica de AgNOR pode ser útil na identificação de alterações celulares induzidas pelo B[a]P.

**Descritores:** Benzo[a]pireno, Marcadores Biológicos, Região Organizadora do Nucléolo

## References

1. Duarte RLM, Paschoal MEM. Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. *J Bras Pneumol*. 2005; 32(1): 56-65.
2. Silva LFG, Soares FSD, Anselmo JNN, Fé DMM, Cavalcante JLBG, Moraes MO, Vasconcelos PRL. Modelo de tumor experimental em rim de ratos. *Acta Cir Bras [serial online]*. 2002 Jan-Fev; 17(1).
3. Lenox RJ. A model of human lung cancer. *Chest*. 2003; 123(4): 986-987.
4. Alves APNN, Guedes RC, Costa-Lotufo LV, Moraes MEA, Pessoa CO, Ferreira FVA, Moraes MO. Modelo experimental de tumor na cavidade oral de ratos com carcinossarcoma de Walker 256. *Acta Cir Bras [serial online]*. 2004 Jul-Ago; 19(4).
5. Forgacs E, Zöchbauer-Müller S, Oláh E, Minna JD. Molecular genetic abnormalities in the pathogenesis of human lung cancer. *Pathol Oncol Res*. 2001; 7(1): 6-13.
6. Agen B, Maas LM, Zwingmann IH, Schooten FJV, Kleinjans JCS. B[a]P adduct formation and induction of human epithelial lung cell transformation. *Environ Mol Mutagen*. 1997; 30: 287-292.
7. Wong DTW, Biswas DK. Mechanism of benzo(a)pyrene induction of alpha-human chorionic gonadotropin gene expression in human lung tumor cells. *J Cell Biol*. 1985; 101:2245-2252.
8. Harrigan JA, Vezina CM, McGarrigle BP, Ersing N, Box HC, Maccubbin AE, Olson JR. DNA adduct formation in precision-cut rat liver and lung slices exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicol Sci*. 2003; 77: 307-314.
9. Massion PP, Carbone DP. The molecular basis of lung cancer: molecular abnormalities and therapeutic implications. *Respir Res*. 2003; 4(12): 1-15.
10. Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. *Chest*. 2002 ; 122(3) : 1037-1057.
11. Chern JH, Lee YC, Yang MH, Chang SC, Perng RP. Usefulness of argyrophilic nucleolar organizer regions score to differentiate suspicious malignancy in pulmonary cytology. *Chest*. 1997; 111(6): 1591-1596.
12. Capelozzi VL. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. *J Pneumol*. 2001; 27(6): 321-328.

13. Rodrigues, OR, Antonangelo L, Yagi N, Minamoto H, Schmidt AF, Capelozzi VL, Goldenberg S, Saldiva PHN. Prognostic significance of argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) in resected non-small cell lung cancer (NSCLC). *Jpn J Clin Oncol.* 1997; 27(5): 298-304.
14. Antonangelo L, Bernardi FDC, Capelozzi VL, Takagaki TY, Younes RN, Yagi N, Saldiva PHN. Morphometric evaluation of argyrophilic nucleolar organizer region is useful in predicting long-term survival in squamous cell carcinoma of the lung. *Chest.* 1997; 111:110-114.
15. Abe S, Ogura S, Kunikane H, Suko N, Watanabe N, Nakajima I. Nucleolar organizer regions in precancerous and cancerous lesions of the bronchus. *Cancer.* 1991; 67:472-475.
16. Fisseler-Eckhoff A, Becker T, Sudhoff H, Muller KM. AgNOR counts in preneoplastic lesions of the bronchus. *Pathol Res Pract.* 1994; 190: 389-393.
17. Rocher AE, Blanco AM, Palaoro LA. Utilidad de la técnica de AgNOR en la interpretación de los derrames de cavidades serosas. *Rev Med Chile.* 2000; 128: 963-968.
18. Kaneko S, Ishida T, Sugio K, Yokoyama H, Sugimachi K. Nucleolar organizer regions as a prognostic indicator for stage I non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1991; 51: 4008-4011.
19. Kong LY, Luster MI, Dixon D, O'Grady J, Rosenthal GJ. Inhibition of lung immunity after intratracheal instillation of benzo(a)pyrene. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 150: 1123-1129.

Interest conflict: none  
Financing source: none