

# Lesões da bexiga e do cólon de ratos wistar submetidos à carcinogênese química de duas etapas<sup>1</sup>

## *Bladder and colon lesions in wistar rats submitted to a two-stage chemical carcinogenesis*

Alexandra Procópio Bononi<sup>2</sup>, Camila da Silva Caetano<sup>2</sup>, Noeme de Souza Rocha<sup>3</sup>, Susie Vieira de Oliveira<sup>4</sup>, Daisy Maria Fávero Salvadori<sup>5</sup>, João Lauro Viana de Camargo<sup>5</sup>

### Resumo

Este estudo descreve as lesões morfológicas da bexiga e em cólon em ratos Wistar, de ambos os sexos, submetidos a um teste alternativo para a identificação de cancerígenos químicos. Desenvolvido por pesquisadores japoneses em ratos Fischer 344 machos, em 1996, este teste foi adotado, com algumas modificações, pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), como fonte de evidência de carcinogenicidade química. Os animais foram separados em seis grupos, um deles o controle não-tratado. Os grupos 2, 3 e 4 sofreram iniciação multi-orgânica da carcinogênese pelo tratamento sequencial com N-dietilnitrosamina (DEN, 100 mg/kg i.p.), N-metil-N-nitrosouréia (MNU, 80 mg/kg i.p.), N-butil-N-(4-hidroxibutil)nitrosamina (BBN 0,05 % via água de beber, semanas 1 e 2), dimetil-hidrazina (DMH, 160 mg/kg, s.c.) e dihidroxi-propil-nitrosamina (DHPN 0,1% via água de beber, semanas 3 e 4). A promoção da carcinogênese foi estabelecida à partir da 6a. semana, pela mistura, na ração, de 0,05% fenobarbital (grupos 3 e 5) ou 0,01% 2-acetilaminofluoreno (2-AAF, grupos 4 e 6), até o final do experimento, na 30a. semana. Na bexiga, a lesão vesical mais relevante foi a hiperplasia papilífera/nodular (HPN), particularmente nos grupos machos iniciados e promovidos para a carcinogênese. No cólon, ocorreram focos de criptas aberrantes (FCA), adenomas e adenocarcinomas. As neoplasias do cólon ocorreram em todos os grupos iniciados de ambos os sexos, mas aumento significativo da incidência de adenocarcinomas só ocorreu nos machos promovidos por 2-AAF. Os resultados indicam que a iniciação da carcinogênese foi efetiva nos animais tratados e documentam o padrão de lesões que ocorre na bexiga e cólon de ratos Wistar.

**PALAVRAS-CHAVES:** cancerígenos químicos, teste alternativo, ratos Wistar, bexiga, cólon

<sup>1</sup>Trabalho premiado na Sessão de Temas Livres, 5º Congresso Latino-Americano de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, Curitiba, PR, 1998. Apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos de Iniciação Científica No. 97/02605-2 (A.P.B.) e 97/2615-8 (C.S.C.).

<sup>2</sup>Acadêmica do 6º ano do Curso de Medicina; <sup>3</sup>Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP; <sup>4</sup>Departamento de Biologia, UEFS, Feira de Santana, BA; <sup>5</sup>Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, 18618-000, SP. Fone (014) 820 6238; Fac-símile: (014) 821 2348. E-mail: decam@fmb.unesp.br.

## Abstract

This study describes the morphologic lesions that occur in the urinary bladder and colon of Wistar rats submitted to an alternative medium-term multi-organ assay for chemical carcinogenesis. Developed by Japanese researchers with the Fischer 344 rat strain, in 1996 the bioassay was adopted by the Brazilian Agency for the Environment (IBAMA) as a source of evidence of chemical carcinogenicity. The animals were allocated to six groups, one of them the non-treated control group. Groups 2, 3 and 4 were initiated for carcinogenesis with N-diethylnitrosamine (DEN, 100 mg/kg i.p.), N-methyl-N-nitrosourea (MNU, 80 mg/kg i.p.), N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN 0.05 % drinking water, weeks 1 and 2), dimethylhydrazine (DMH, 160 mg/kg, s.c.) and dihydroxi-propyl-nitrosamine (DHPN 0.1% drinking water, weeks 3 e 4). Promotion of carcinogenesis was accomplished by phenobarbital 0.05% (groups 3 and 5) or 0.01% 2-acetilaminofluorene (2-AAF, groups 4 and 6) mixed in the diet. In the urinary bladder, the most relevant lesion found was the papillary/nodular hyperplasia, which was significantly more frequent in both male groups initiated and promoted for carcinogenesis. Lesions in the colon included aberrant crypt foci (ACF), adenomas and adenocarcinomas. Neoplasia occurred in every male and female group initiated for carcinogenesis, but a significant incidence of adenocarcinomas occurred only in males also promoted by 2-AAF. The results indicate that the initiation of carcinogenesis was effective in the treated groups and document the lesion patterns that occur in the urinary bladder and colon of Wistar rats.

**Key-word:** chemical carcinogens, alternative bioassay, Wistar rats, colon, urinary bladder.

## Introdução

A grande quantidade e variedade de substâncias introduzidas no mercado desde o início deste século, e a preocupação com a saúde pública e integridade do meio ambiente tornaram indispensável a análise sistemática da toxicidade destas substâncias, inclusive de seu potencial cancerígeno. O método experimental padrão para detecção da carcinogenicidade dos agentes químicos é o teste de longa duração *in vivo*, com roedores<sup>(1,2)</sup>. O ensaio leva cerca de cinco anos para a obtenção de seus resultados, dos quais durante dois anos os animais são mantidos em biotério. São usadas duas espécies de roedores, em geral ratos e camundongos, e três doses da substância teste, totalizando cerca de 800 animais por substância testada, incluindo os grupos controle. Os animais são expostos à substância teste, e só a ela, durante quase toda a sua vida. Devido a sua duração prolongada, alta complexidade operacional (biotério e recursos técnicos especializados) e elevado custo final, é duvidoso que este teste venha a ser adotado oficialmente em países como o Brasil, como fonte de evidência da carcinogenicidade de agentes químicos. De fato, nenhum laboratório o executa em nosso país, e não há qualquer perspectiva de que venham a fazê-lo em futuro próxi-

mo<sup>(3,4)</sup>.

Face as dificuldades de execução do teste de longa duração, tornou-se necessário o desenvolvimento de testes alternativos, mais rápidos e menos onerosos que o convencional. Dentre estes, destaca-se um teste de média duração para carcinogênese em múltiplos órgãos, proposto por pesquisadores japoneses<sup>(5-7)</sup>. Diferente do teste de longa duração, este ensaio possui duração máxima de trinta semanas de manutenção dos animais em biotério, utiliza apenas o rato macho e é baseado no conceito de carcinogênese de duas etapas: iniciação e promoção<sup>(8,9)</sup>. Como na etapa de iniciação treze diferentes órgãos são iniciados para a carcinogênese, o teste é denominado "teste de carcinogênese em múltiplos órgãos". Por questão de simplicidade, é também denominado "DMBDD", iniciais dos cinco agentes genotóxicos utilizados para a iniciação da carcinogênese. O ensaio DMBDD tem mostrado forte consistência biológica, i.e., seus resultados mostram concordância com os dos testes de longa duração<sup>(6,7,10)</sup>. Em 1996, reconhecendo as dificuldades do país na execução do teste de longa duração, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) adotou oficialmente o teste DMBDD como fonte de evidência do potencial cancerígeno de substâncias químicas<sup>(11)</sup>.

Isto foi realizado com várias adaptações ao protocolo original, como a adoção da linhagem de ratos Wistar no lugar do Fischer 344, e o uso de animais fêmeas. Recentemente, a Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC), reconheceu que testes alternativos, como o teste de média duração em múltiplos órgãos, são apropriados para a identificação de cancerígenos químicos em roedores<sup>(12)</sup>.

Nosso laboratório tem desenvolvido estudos<sup>(13,14)</sup> para aumentar o conhecimento das lesões específicas que ocorrem na linhagem Wistar submetida ao protocolo DMBDD, o que é importante para a padronização e difusão deste ensaio, e em uma linhagem diferente da Fischer 344. O estabelecimento deste teste no Brasil contribuirá para o aumento da competência nacional em carcinogênese química, com reflexos positivos na pesquisa e no apoio às agências governamentais responsáveis pelo registro e regulamentação de substâncias<sup>(3,4)</sup>. No presente trabalho são apresentadas as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas que ocorrem no cólon e bexiga de ratos Wistar de ambos os sexos submetidos ao protocolo DMBDD.

## Material e métodos

### Animais e ambiente de experimentação

Ratos Wistar, machos e fêmeas, com seis semanas de idade, fornecidos pelo TECPAR (Curitiba, PR), foram mantidos em gaiolas de polipropileno (5 animais/gaiola), forradas com maravalha autoclavada. O ambiente da sala foi controlado a  $22 \pm 2$  °C, com umidade relativa do ar de  $55 \pm 10\%$  e ciclos de luz (12 h claro/escuro) e de exaustão do ar ambiente (4/4 hs) previamente estabelecidos.

Durante todo o período experimental, os animais receberam ração basal peletizada (Nuvilab CR - 1, Nuvital Nutrientes Ltda, Curitiba - PR) e água filtrada *ad libitum*. Além disso, foram submetidos a inspeções diárias de viabilidade e pesados individualmente, a cada semana, ao longo do experimento.

### Agentes químicos

*Agentes iniciadores da carcinogênese:* N-dietil-nitrosamina (DEN), N-metil-N-nitrosouréia (MNU) e dimetil-hidrazina (DMH), foram adquiridos da Sigma Chemical

Co. (St. Louis, MO); N-butil-N-(4-hidroxibutil)nitrosamina (BBN) e dihidroxipropil-nitrosamina (DHPN), foram adquiridos respectivamente da Tokyo Kasei Industries Co. (Tokyo) e da Nacalai Tesque Inc. (Kyoto).

*Agentes promotores da carcinogênese:* Fenobarbital (PB; Tokyo Kasei Industries Co., Tokyo) e 2-acetaminofluoreno (2-AAF; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), foram utilizados, respectivamente, como modelos de cancerígeno não-genotóxico e genotóxico<sup>(7,15)</sup>.

## Delineamento experimental

Foram constituídos seis grupos experimentais (Figura 1). O grupo 1 (Controle Negativo) recebeu somente ração comercial durante todo o experimento. Os grupos 2, 3 e 4 foram tratados com DEN (injeção única de 100 mg/kg i.p., no início do experimento), MNU (quatro injeções de 40mg/kg i.p.) e BBN a 0,05% na água de beber, nas duas primeiras semanas e DMH (quatro injeções de 40mg/kg s.c.) e DHPN 0,1% na água de beber, nas duas semanas seguintes. À partir da quinta semana, e até o final de experimento, os grupos 3 e 5 foram tratados com os agentes promotores PB a 0,05% e os grupos 4 e 6, com 2-AAF a 0,01%, ambos os agentes incorporados à ração. Na 30ª semana, os animais foram anestesiados com éter sulfúrico e sacrificados por secção da veia cava, após abertura da cavidade abdominal.

## Coleta, fixação e processamento do material

No momento da necropsia, a bexiga e o cólon foram retirados e processados, da seguinte maneira: A) Bexiga - ligada no colo, inflada por injeção intraluminal de 1 ml de formalina tamponada a 10%, removida da carcaça e imersa no mesmo fixador. Após fixação, as bexigas foram divididas longitudinalmente ao meio e cada metade cortada em quatro, totalizando oito fitas. B) Cólon - após a ligadura das extremidades, o órgão foi inflado com injeção intraluminal de formalina tamponada a 10%. Após fixação, foram coletados segmentos das porções proximal, média e distal, com cerca de 3 cm de comprimento cada. Após abertura longitudinal pela borda mesentérica, estes fragmentos foram distendidos em papel de filtro e imersos no mesmo fixador. Os fragmentos de bexiga e cólon foram submetidos a

processamento histológico e corados por hematoxilina-eosina (HE).

### Análise histopatológica

As lesões da mucosa urotelial foram classificadas à microscopia óptica como<sup>(16-18)</sup>: a) hiperplasia simples (HS), b) hiperplasia papilífera/nodular (HPN) e c) papiloma. As lesões colônicas foram classificadas como<sup>(19-20)</sup>: a) focos de criptas aberrantes (FCA), b) adenoma e c) adenocarcinoma, tendo sido registrada a topografia de ocorrência da lesão, segundo o segmento proximal, médio ou distal do cólon comprometido.

### Análise estatística

Para comparação dos pesos corpóreos entre os grupos foi usado o teste de Kruskal Wallis<sup>(21)</sup>. As incidências (número da animais com lesão/grupo) de lesões vesicais e colônicas foram comparadas entre os grupos tratados e seus respectivos controles pelo teste de Goodman para comparação entre proporções<sup>(22)</sup>.

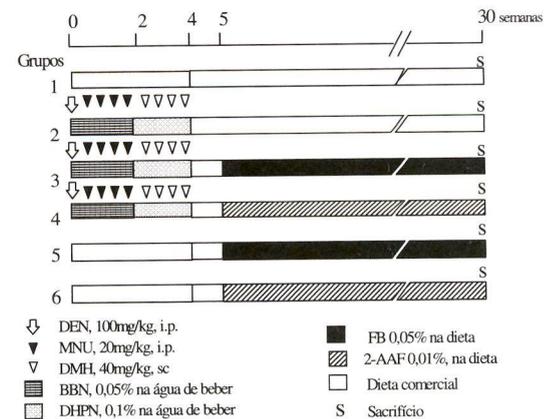


FIGURA 1 - Delineamento do teste de média duração para detecção da carcinogenicidade de compostos químicos em múltiplos órgãos.

## Resultados

### Observações gerais

Os animais adaptaram-se bem às condições do experimento, não tendo sido verificadas alterações da ingestão das rações experimentais ou de água (*dados não apresentados*). Todos os grupos ganharam peso ao longo das 30 semanas de experimento (Tabelas 1 e 2). Dentre os machos, o grupo DMBDD+2-AAF foi o que ganhou menos peso, cerca de 20% menos que o respectivo controle.

TABELA 1. Pesos corpóreos (média  $\pm$  desvio padrão) de ratos wistar machos tratados pelo protocolo DMBDD e/ou com promotores da carcinogênese.

	Nº efetivo De animais	Peso corpóreo Inicial (g)	Peso corpóreo Final (g)	Ganho de peso Absoluto (g)	Ganho de peso Relativo (%)
Controle Negativo	5	143 $\pm$ 12	371 $\pm$ 21	228 $\pm$ 19	---
DMBDD	14	154 $\pm$ 14	391 $\pm$ 47	236 $\pm$ 44	---
DMBDD+FB <sup>a</sup>	12	147 $\pm$ 14	387 $\pm$ 93	240 $\pm$ 47	+2
DMBDD+2-AAF <sup>a</sup>	12	142 $\pm$ 12	331 $\pm$ 62*	190 $\pm$ 63*	-19
FB <sup>b</sup>	10	147 $\pm$ 12	429 $\pm$ 38	282 $\pm$ 29	+24
2-AAF <sup>b</sup>	10	142 $\pm$ 13	381 $\pm$ 25	239 $\pm$ 21	+5

<sup>a</sup>Foram comparados ao DMBDD; <sup>b</sup>Foram comparados ao Controle Negativo. \*p<0,05.

TABELA 2. Pesos corpóreos (média  $\pm$  desvio padrão)\* de ratos Wistar fêmeas tratadas pelo protocolo DMBDD e/ou com promotores da carcinogênese.

	Nº efetivo De animais	Peso corpóreo Inicial (g)	Peso corpóreo Final (g)	Ganho de peso Absoluto (g)	Ganho de peso Relativo (%)
Controle Negativo	5	129 $\pm$ 8	294 $\pm$ 29	166 $\pm$ 28	---
DMBDD	15	127 $\pm$ 10	264 $\pm$ 22	137 $\pm$ 20	---
DMBDD+FB <sup>a</sup>	11	122 $\pm$ 8	248 $\pm$ 17	124 $\pm$ 16	-10
DMBDD+2-AAF <sup>a</sup>	14	132 $\pm$ 9	255 $\pm$ 23	129 $\pm$ 21	-6
FB <sup>b</sup>	7	126 $\pm$ 11	293 $\pm$ 14	162 $\pm$ 14	-2
2-AAF <sup>b</sup>	10	125 $\pm$ 13	273 $\pm$ 16	149 $\pm$ 14	-10

Os grupos não diferem de seus respectivos controles. <sup>a</sup>Foram comparados ao DMBDD;

<sup>b</sup>Foram comparados ao Controle Negativo.

## Lesões uroteliais na bexiga

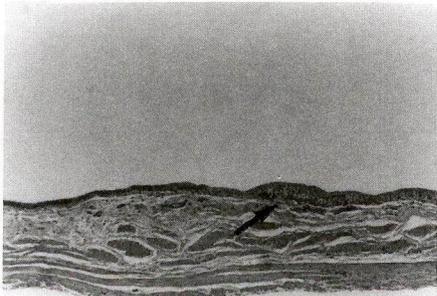


Figura 2 - Hiperplasia simples (HS): aumento focal da espessura do urotélio, por aumento do número de camadas de células epiteliais (seta) (Hematoxilina-eosina, 125X).

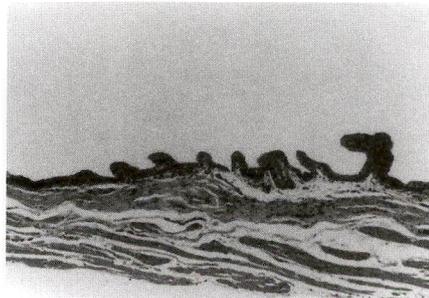


Figura 3 - Hiperplasia papilífera/nodular (HPN): projeções papilíferas digitiformes, constituídas por eixo conjuntivo vascularizado revestido por urotélio normal ou hiperplásico. Neste campo não é observado o componente "nodular" deste tipo de lesão (Hematoxilina-eosina, 125X).

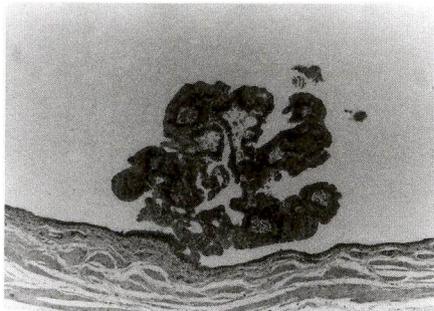


Figura 4 - Papiloma Urotelial: lesão exofítica complexa, com pedículo delgado, constituída por eixos conjuntivo-vascularizados ramificados, revestidos por urotélio hiperplástico (Hematoxilina-eosina 125X).

As Figuras 2 a 4 mostram as lesões encontradas no urotélio dos animais dos diferentes grupos iniciados com o protocolo DMBDD. Em ambos os sexos, a lesão mais freqüente (Tabelas 3 e 4) foi a hiperplasia simples (HS), não ocorrendo diferenças significativas entre as incidências de cada grupo. A hiperplasia papilífera/nodular (HPN) ocorreu de modo variável nos animais iniciados de ambos os sexos, sendo sua incidência significativamente maior nos machos iniciados e promovidos com FB e 2-AAF. Papilomas ocorreram raramente, tendo sido registrados nos grupos DMBDD+2-AAF em ambos os sexos, e no grupo DMBDD, nas fêmeas. Não foram observados carcinomas uroteliais. No conjunto, os dados indicam que a carcinogênese urotelial foi iniciada pelo tratamento DMBDD em ambos os sexos.

TABELA 3. Incidência<sup>1</sup> de ratos Wistar machos com lesões uroteliais na bexiga, após tratamento com protocolo DMBDD e/ou com promotores da carcinogênese.

	Nº efetivo De animais	Hiperplasia Simples (%)	HPN <sup>2</sup> (%)	Papiloma (%)
Controle Negativo	6	1 (17) <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0
DMBDD	23	9 (39) <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0
DMBDD+FB	24	14 (58) <sup>a</sup>	7 (29) <sup>b</sup>	0
DMBDD+2-AAF	12	8 (67) <sup>a</sup>	3 (25) <sup>b</sup>	1 (8)
FB	10	2 (20) <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0
2-AAF	10	3 (30) <sup>a</sup>	1 (10) <sup>ab</sup>	0

<sup>1</sup>Nº de animais com lesão por grupo; índice (a,b) diferentes diferem entre si significativamente (p<0,5%). <sup>2</sup>HPN: Hiperplasia papilífera/nodular.

TABELA 4. Incidência<sup>1</sup> de ratos Wistar machos com lesões uroteliais na bexiga, após tratamento com protocolo DMBDD e/ou com promotores da carcinogênese.

	Nº efetivo De animais	Hiperplasia Simples (%)	HPN <sup>2</sup> (%)	Papiloma (%)
Controle Negativo	9	4 (44) <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0
DMBDD	24	19 (75) <sup>a</sup>	5 (21) <sup>a</sup>	1 (4)
DMBDD+FB	23	14 (61) <sup>a</sup>	3 (13) <sup>a</sup>	0
DMBDD+2-AAF	14	13 (93) <sup>a</sup>	3 (21) <sup>a</sup>	2 (14)
FB	4	3 (75) <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0
2-AAF	8	6 (75) <sup>a</sup>	1 (13) <sup>a</sup>	0

<sup>1</sup>Nº de animais com lesão por grupo; índice (a,b) diferentes diferem entre si significativamente (p<0,5%). <sup>2</sup>HPN: Hiperplasia papilífera/nodular.

## Lesões da mucosa do cólon

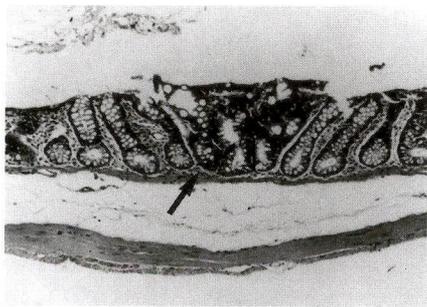


Figura 5 - Foco de criptas aberrantes (FCA, seta): foco com criptas hiperplásicas, deslocando estruturas vizinhas, constituído por células basofílicas, padrão displásico, (Hematoxilina-eosina 125X).

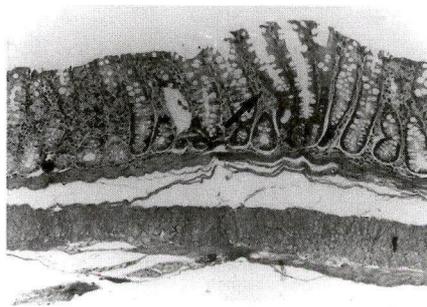


Figura 6 - Foco de criptas aberrantes (FCA, seta): foco com criptas hiperplásicas, tortuosas, com excesso de células caliciformes, distorcendo a estrutura da mucosa e fazendo proeminência para luz intestinal (Hematoxilina-eosina, 125X).

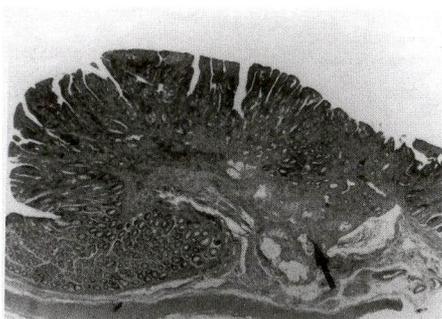


Figura 7 - Adenocarcinoma invadindo a camada muscular da mucosa (seta), em rato Wistar do grupo DMBDD+2-AAF (Hematoxilina-eosina, 80X).

As Figuras 5 a 7 mostram as lesões encontradas no cólon. As mais freqüentes (Tabelas 5 e 6) em ambos os sexos foram os FCA. Nos machos, FCA foram registrados inclusive no grupo Controle Negativo, de modo que as incidências nos outros grupos não diferiram significativamente daquele grupo. Nas fêmeas, FCA ocorreram em incidência aumentada nos grupos iniciados (DMBDD, DMBDD+FB, DMBDD+2-AAF) e naquele só tratado com 2-AAF, quando comparados ao grupo Controle Negativo. Adenomas e adenocarcinomas foram encontrados em ambos os sexos, nos grupos iniciados (DMBDD) e nos iniciados e promovidos (DMBDD+FB e DMBDD+2-AAF). Independentemente do sexo e do tratamento, estes tumores ocorreram nos segmentos médio e distal do cólon, não tendo sido observada qualquer neoplasia no segmento proximal. Histologicamente, eram de padrão tubular, bem diferenciado. O grupo DMBDD+2-AAF macho apresentou incidência significativamente maior de adenocarcinomas em relação ao Controle Negativo e aos grupos tratados somente com os agentes promotores. Nas fêmeas, não foram registradas diferenças significativas entre os grupos. No geral, o desenvolvimento de neoplasias benignas e malignas nestes grupos indica que a iniciação da mucosa colônica com o tratamento DMBDD foi efetiva, em ambos os sexos.

As Figuras 8 e 9 apresentam as incidências de FCA nos diferentes segmentos de cólon, em machos e fêmeas, respectivamente. Nos machos, FCA ocorreram nos três segmentos, em incidência variada e independente do tratamento. Nas fêmeas, houve tendência de os FCA predominarem nos segmentos médio e distal, embora também ocorressem, de modo variado, no segmento proximal.

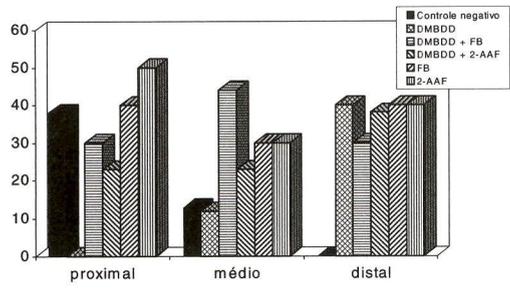


Figura 8 - Distribuição da incidência (percentual de animais com lesão) de focos de criptas aberrantes (FCA) nos segmentos proximal, médio e distal do cólon de ratos Wistar machos tratados com iniciadores ou promotores da carcinogênese.

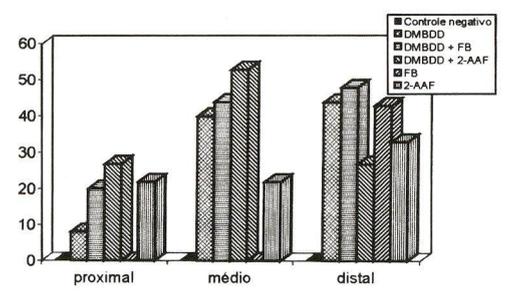


Figura 9 - Distribuição da incidência (percentual de animais com lesão) de focos de criptas aberrantes (FCA) nos segmentos proximal, médio e distal do cólon de ratos Wistar machos tratados com iniciadores ou promotores da carcinogênese.

TABELA 5. Incidência<sup>1</sup> de ratos Wistar machos com lesões na mucosa colônica, após tratamento com protocolo DMBDD e/ou com promotores da carcinogênese.

	Nº efetivo De animais	FCA <sup>2</sup> (%)	Adenoma (%)	Adenocarcinoma (%)
Controle Negativo	9	4 (50) <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>
DMBDD	25	12 (48) <sup>a</sup>	4 (16)	3 (12) <sup>ab</sup>
DMBDD+FB	27	16 (59) <sup>a</sup>	4 (15)	5 (19) <sup>ab</sup>
DMBDD+2-AAF	13	7 (54) <sup>a</sup>	0	6 (46) <sup>b</sup>
FB	10	5 (50) <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>
2-AAF	10	7 (70) <sup>a</sup>	0	0 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Nº de animais com lesão por grupo; índice (a,b) diferentes diferem entre si significativamente (p<0,5%). <sup>2</sup>FCA: focos de cripta aberrantes.

TABELA 6. Incidência<sup>1</sup> de ratos Wistar fêmeas com lesões na mucosa colônica, após tratamento com protocolo DMBDD e/ou com promotores da carcinogênese.

	Nº efetivo De animais	FCA <sup>2</sup> (%)	Adenoma (%)	Adenocarcinoma (%)
Controle Negativo	10	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
DMBDD	25	18 (72) <sup>b</sup>	2 (8) <sup>a</sup>	4 (16) <sup>a</sup>
DMBDD+FB	25	21 (84) <sup>b</sup>	1 (4) <sup>a</sup>	2 (8) <sup>a</sup>
DMBDD+2-AAF	15	10 (67) <sup>b</sup>	1 (7) <sup>a</sup>	3 (20) <sup>a</sup>
FB	7	3 (43) <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
2-AAF	9	6 (67) <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Nº de animais com lesão por grupo; índice (a,b) diferentes diferem entre si significativamente (p<0,5%). <sup>2</sup>FCA: focos de cripta aberrantes.

**Discussão**

O presente estudo documenta as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas que ocorrem na bexiga e cólon de ratos Wistar de ambos os sexos submetidos ao ensaio alternativo de média duração para carcinogênese em múltiplos órgãos (ensaio DMBDD). Este ensaio baseia-se na idéia de que tecidos previamente iniciados

para a carcinogênese têm incidência aumentada de lesões pré-neoplásicas e de neoplasias quando são expostos a agentes que promovem a proliferação dos clones de células iniciadas<sup>(8,9)</sup> e, neste sentido, está estruturado para identificar agentes promotores da carcinogênese<sup>(3-7)</sup>. Por isso, o protocolo adotado pelo IBAMA estabelece que sejam constituídos grupos controles positivo da promoção, expostos ao fenobarbital sódico (FB) ou ao 2-

acetilaminofluoreno (2-AAF), dependendo da substância-teste ser, respectivamente, não-geotóxica ou geotóxica<sup>(11)</sup>. Estes agentes são reconhecidos promotores da carcinogênese no rato, sendo que o FB tem como órgão-alvo direto o fígado, e o 2-AAF, o fígado, a bexiga, a tiróide, o estômago, os rins e as glândulas de Zymbal<sup>(10)</sup>. Para o entendimento do presente trabalho, que enfocou especificamente a bexiga e o cólon, deve ser lembrado que só o 2-AAF tem a bexiga como órgão-alvo, e nenhum dos dois agentes promotores positivos têm ação promotora reconhecida sobre a carcinogênese do cólon. Portanto, não deve ser esperada ação promotora evidente do FB sobre os dois órgãos estudados e do 2-AAF sobre o cólon. A relevância deste estudo está na descrição e registro das lesões que ocorrem naqueles órgãos, em animais de grupos controle positivos e negativos que são sistematicamente analisados, quando o ensaio DMBDD é executado. As lesões que ocorrem nos demais órgãos destes animais também foram analisadas, e estão apresentadas em outro trabalho<sup>(13)</sup>.

Os resultados indicam que a iniciação DMBDD foi efetiva nos órgãos estudados, que desenvolveram incidências variáveis de lesões pré-neoplásicas e neoplasias (Tabelas 3 à 6). Deve ser assumido que, embora os outros agentes utilizados no protocolo de iniciação – DEN, MNU e DHPN – possam ter exercido alguma influência, a iniciação da carcinogênese na bexiga e cólon dependeu da BBN e da DMH que têm, respectivamente, estes órgãos como alvos de sua geotoxicidade<sup>(16-19)</sup>.

As lesões registradas na bexiga – HS e HPN – constituem um contínuo de lesões associadas ao desenvolvimento de neoplasias uroteliais. Isto têm sido verificado em diferentes modelos de carcinogênese vesical, com uma ou mais etapas de carcinogênese química<sup>(16-18)</sup>. O encontro destas lesões nos animais iniciados de ambos os sexos indica que a carcinogênese urotelial estava ocorrendo, independente do tipo de agente promotor a que foram expostos (FB ou 2-AAF). Como o 2-AAF é um agente geotóxico para o urotélio vesical<sup>(10,18)</sup>, é compreensível o encontro de papilomas nos grupos iniciados e promovidos com este agente. A hiperplasia simples (HS) revelou-se menos relevante que a HPN como marcadora da carcinogênese, pois ocorreu em incidência variada e similar em todos os grupos, inclusi-

ve nos grupos Controle Negativo e nos não-iniciados, tratados só com FB ou com 2-AAF. A HPN, no entanto, ocorreu particularmente nos grupos iniciados, nos quais foram encontrados os poucos papilomas verificados neste estudo. Em trabalhos anteriores<sup>(23,24)</sup> já havíamos registrado que ratos da linhagem Wistar são relativamente resistentes à agressão por agentes químicos exógenos e não desenvolvem lesões uroteliais em quantidade tão expressiva como os Fischer 344, nos quais o protocolo DMBDD foi originalmente padronizado<sup>(5-7,10)</sup>. A relativa escassez de lesões uroteliais não permitiu, por exemplo, discriminar significativamente entre os efeitos promotores do FB e do 2-AAF sobre a mucosa vesical, embora o segundo agente seja um reconhecido cancerígeno geotóxico, que tem a bexiga entre seus principais órgãos-alvo<sup>(10)</sup>.

A carcinogênese no cólon do rato também está relativamente bem documentada e parece ocorrer principalmente segundo a seqüência FCA-adenomas-adenocarcinomas<sup>(20,25,26)</sup>, particularmente nos segmentos médio e distal do cólon<sup>(19,26)</sup>. No homem, esta alteração morfológica também é considerada como marcadora de futuro desenvolvimento neoplásico na mucosa colônica<sup>(27)</sup>. É provável, que a via FCA-adenoma-adenocarcinoma de desenvolvimento neoplásico tenha ocorrido no presente estudo, pois os três tipos de lesão foram verificados nos animais iniciados, e nos iniciados e promovidos, em ambos os sexos. A ocorrência de neoplasias benignas e malignas no cólon dos animais iniciados, independente de terem sido tratados ou não com os promotores, indica que a iniciação foi efetiva e que o processo de carcinogênese estava ocorrendo nestes animais.

O entendimento do papel dos FCA como lesão pré-neoplásica neste estudo deve ser feito de modo cauteloso. Esta lesão ocorreu em incidência variada e relativamente alta, inclusive nos machos dos grupos Controle Negativo e nos tratados somente com os promotores FB e 2-AAF (Tabelas 5 e 6). Embora esteja referido que os FCA predominam nos segmentos médio e distal de ratos Wistar machos<sup>(19)</sup>, esta distribuição preferencial não foi verificada no presente estudo (Figura 8). Nas fêmeas, houve tendência das lesões predominarem nos segmentos médio e distal, mas esta distribuição não foi consistente (Figura 9). De fato, a distribuição de FCA foi difusa e irregular ao lon-

go do cólon nos animais de ambos os sexos, nos diferentes grupos. Como os grupos Controle Negativo e os tratados somente com FB e 2-AAF não foram iniciados, e nenhum dos dois agentes promotores têm o cólon como órgão-alvo reconhecido, é possível que os FCA encontrados sejam de origem espontânea, já que, no final do experimento, os animais eram adultos, com cerca de 8 meses de vida. Assim, o conjunto de observações sugere que não é possível assumir os FCA como marcadores absolutos do processo de carcinogênese intestinal, neste trabalho.

A elevada incidência de FCA verificada pode ser devida à metodologia empregada, que foi a verificação histológica. Em geral, o estudo da frequência de FCA é feito sob estereoscópios, em cólons corados com azul de metileno<sup>(19,26)</sup>. Esta abordagem semi-macroscópica pode, eventualmente, subestimar o número de lesões pré-neoplásicas em determinada amostra. Além disso, os FCA são muito heterogêneos quanto a sua natureza e morfologia<sup>(19,25,26)</sup>, tal como é demonstrado nas Figuras 5 e 6. É interessante observar que todos os adenocarcinomas encontrados neste estudo, em ambos os sexos, localizavam-se nos segmentos médio e distal do

cólon. Existe a possibilidade, dependendo do segmento do cólon onde se desenvolvem, de que alguns subtipos de FCA estejam ligados à carcinogênese, mas outros subtipos, não. Para o esclarecimento de quais subtipos histológicos de FCA têm relevância para o desenvolvimento neoplásico na mucosa colônica, faz-se necessária a realização de estudos bem delineados e especificamente voltados para este objetivo.

Concluindo, o presente estudo indica que o protocolo DMBDD é efetivo para desencadear a carcinogênese na bexiga e cólon de ratos Wistar de ambos os sexos. Na bexiga, a hiperplasia papilífera/nodular documenta este processo e pode ser utilizada como um parâmetro no teste de média-duração para carcinogênese de múltiplos órgãos, particularmente nos animais machos. No cólon, os focos de cripta aberrantes, por serem abundantes e variados, não devem ser considerados marcadores absolutos da carcinogênese. Pelo fato de constituírem um grupo de lesões similares, mas de natureza variada<sup>(19,26)</sup>, deverão ter seu significado biológico melhor esclarecido, para uso adequado como parâmetro no ensaio DMBDD com ratos Wistar.

### Referências Bibliográficas

1. IARC - Long-term and short-term assays for carcinogens. A critical appraisal. Editors R, Montesano, H. Bartsh, H. Vanio, J. Wilbourn and H. Yamasaki, eds. *IARC Scientific Publications No. 83*, Lyon, p. 1-46, 1986.
2. CHHABRA, R.S.; HUFF, J.E.; SCHWERTZ, B.S. and SELKIEK, J.- An overview of prechronic and chronic toxicity/carcinogenicity experimental study designs and criteria used by the National Toxicology Program. *Environ. Health Perspect.*, 86: 313-321, 1990.
3. de CAMARGO, J.L.V.; de OLIVEIRA, M.L.C.S.; ROCHA, N.S. & ITO, N. - A detecção de substâncias cancerígenas em estudos experimentais. *Rev. Bras. Cancerol.*, 40 (1): 21-30, 1994.
4. de CAMARGO, J.L.V.; SALVADORI, D.M.F.; ROCHA, N.S.; BARBISAN, L.F.; RIBEIRO, L.R. - The detection of chemical carcinogens in alternative, accelerated bioassays. *Ciência e Cultura*, no prelo.
5. ITO, N.; IMAIDA, K.; TSUDA, H. et al. - Wide-spectrum initiation models: possible applications to medium-term multiple organ bioassays for carcinogenesis modifiers. *Jpn. J. Cancer Res.*, 79 (4): 413-417, 1988.
6. SHIRAI, T.; HIROSE, M.; ITO, N. - Medium-term bioassays in rats for rapid detection of the carcinogenic potential of chemicals. In: McGregor DB, Rice JM, and Venitt S, eds. The use of short- and medium-term tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation. *IARC Scientific Publications No. 146*, International Agency for Research on Cancer, Lyon, p. 251-272, 1999.
7. ITO, N.; SHIRAI, T.; HASEGAWA, R. - Medium-term bioassays for carcinogens. In: Vainio, H, Magee PN, McGregor DB and McMichael AJ, eds. Mechanisms of carcinogenesis in risk assessment. *IARC Scientific Publications No. 116*, International Agency for Research on Cancer, Lyon, p. 345-380, 1992.

8. PITOT, H. C. & DRAGAN, Y. P. - Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J.*, 5: 2280-2286, 1991.
9. PITOT, H. C. - The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*, 72: 962-970, 1993.
10. HAGIWARA, A.; TANAKA, H.; IMAIDA, K. et al. - Correlation between medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay data and long-term observation results in rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 84 (3): 237-245, 1993.
11. BRASIL - Instituto Brasileiro do Meio-Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Portaria Normativa nº 84 de 15 de outubro de 1996, *Diário Oficial da União* Nº203 Seção 1, p. 21358-21366, de 18 de outubro de 1996.
12. IARC - Consensus Report. In: McGregor DB, Rice JM and Venitt S. The use of short- and medium-term tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation. *IARC Scientific Publications No. 146*, p. 1-18, 1999.
13. ROCHA, N.S. - Padronização morfológica de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas em *Rattus norvegicus* (Wistar) submetidos ao protocolo de carcinogênese de média duração em múltiplos órgãos. *Tese de Doutorado*, Curso de Pós Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, 95 pp., 1998.
14. SPINARDI, A.L.T.; KANENO, R.; RODRIGUES, M.A.M.; SALVADORI, M.F.; ROCHA, N.S.; BARBISAN, L.F.; RIBEIRO, L.R.; de CAMARGO, J.L.V. - Natural killer activity in a medium-term multi-organ bioassay for carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 1-7, 1999.
15. FUKUSHIMA, S.; HAGIWARA, A.; HIROSE, M. et al. - Modifying effects of various chemicals on preneoplastic and neoplastic lesion development in a wide-spectrum organ carcinogenesis model using F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 82(6): 642-648, 1991.
16. FUKUSHIMA, S.; HASHIWARA, G.; OGISO, T. et al. - Promoting effects of various chemicals in rat urinary bladder carcinogenesis initiated by N-nitroso-N-butyl(4-hydroxybutyl)amine. *Food Chem. Toxic.*, 21: 59-68, 1983.
17. COHEN, S. M. - Multistage carcinogenesis in the urinary bladder. *Food Chem. Toxic.*, 23:521-28, 1985.
18. FUKUSHIMA, S.; MUTAI, M.; HASEGAWA, R. et al. - Enhancing effects of carcinogens or promoters on bladder carcinogenesis in rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 4: 159-164, 1991.
19. PARK H-S.; GOODLAD R.; WRIGHT N. - The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site-specific manner and depends on tumor histology. *Cancer Res.*, 57: 4507-4510, 1997.
20. WHITELEY, L.O.; HUDSON, L.; PRETLOW, T.P. - Aberrant crypt foci in the colonic mucosa of rats treated with a genotoxic and nongenotoxic colon carcinogen. *J. Toxicol. Pathol.*, 24: 681-89, 1996.
21. ZAR, J.H. - *Biostatistical Analysis*. 2a. ed. Englewood Cliffs. Prentice Hall, 718, 1984.
22. CAMPOS, H. - *Estatística Experimental Não-Paramétrica*. 4ª. ed., Piracicaba, FEALQ, 349, 1983.
23. OLIVEIRA, M.L.C.S.; ROCHA, N.S.; FUKUSHIMA, S.; de CAMARGO, J.L.V. - Absence of promoting potential of bracken fern (*Pteridium aquilinum*) in rat urinary bladder carcinogenesis induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine and uracil. *Teratogenesis Carcinog Mutagen*, 15: 191-199, 1995.
24. de OLIVEIRA, S.V.; de CAMARGO, J.L.V.; CARDOSO, P.R.; PADOVANI, C.R.; FUKUSHIMA, S. - Effects of uracil calculi on cell growth and apoptosis in the BBN-initiated Wistar rat urinary bladder mucosa. *Teratogenesis Carcinog Mutagen*, no prelo.

25. CHANG, W.W.L. - Histogenesis of colon cancer in experimental animals. *Scand. J. Gastroenterol.*, 19 (suppl. 104): 27-43, 1984.
26. BIRD, R.P. - Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett.*, 93: 55-71, 1995.
27. BOUZORENE H.; CHAUBERT P.; SEELTAG W.; BOSMAN, F. T.; SARAGA, E. - Aberrant crypt foci in patients with neoplastic and nonneoplastic colonic disease. *Human Pathol.*, 30 : 66-71, 1999.