

## A detecção de substâncias cancerígenas em estudos experimentais

JOÃO LAURO VIANA DE CAMARGO<sup>1</sup>, MARIA LUIZA COTRIM SARTOR DE OLIVEIRA<sup>2</sup>, NOEME SOUZA ROCHA<sup>3</sup>, NOBUYUKI ITO

Apresentado no Simpósio Latino-Americano "Importância dos Valores Limiares em Avaliação Toxicológica", organizado pelo International Life Science Institute (ILSI/Brasil), promovido pelo ECO/OPAS, ITAL, UNICAMP e UNESP, julho/1993, Campinas, SP.

### Resumo

*Atualmente, o método mais importante para a identificação de agentes químicos cancerígenos é o teste de longa duração in vivo, com roedores. No Brasil não há condições para a sua execução, devido à inexistência de especialistas e de infra-estrutura adequada. Em consequência, o país é dependente dos conhecimentos gerados no exterior sobre o risco que determinados compostos químicos impõem às populações e ao meio ambiente. Por outro lado, as desvantagens inerentes ao protocolo deste teste, como a complexidade na execução, o tempo prolongado para obtenção das conclusões e custo elevado, entre outras, levam à procura de alternativas mais convenientes. No presente trabalho são apresentados dois testes in vivo para detecção de cancerígenos químicos em ratos, que têm como vantagens o tempo de execução e o custo, menores que os do teste convencional. Os sistemas propostos têm só o fígado ou vários órgãos-simultâneos como órgãos-alvo do eventual cancerígeno. Ambos os testes foram avaliados respectivamente com centenas e dezenas de substâncias químicas e reproduziram os resultados já obtidos em testes de longa duração, mostrando forte consistência biológica. Os autores destacam as vantagens de sua adoção em países como o Brasil e propõem sua inclusão na seqüência de testes necessários para caracterizar um agente químico como cancerígeno.*

**Unitermos:** cancerígenos; meio ambiente; detecção; testes; ratos; câncer; experimentação; agentes químicos

### Introdução

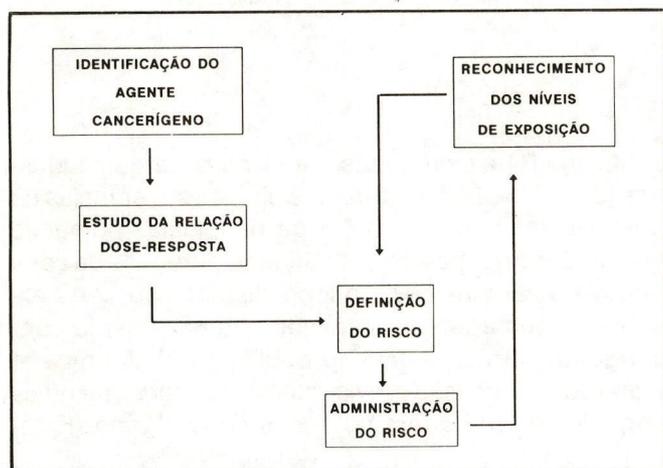
No Brasil, o câncer ocupa o terceiro lugar (9%) na lista de causas de morte, precedido por óbitos devidos a causas externas e causas mal definidas (32,3%), e pela doença aterosclerótica cardiovascular e cerebral (27,8%) [1, 2]. Como o câncer no ser humano leva, desde seu início, algumas décadas para se manifestar, é provável que medidas de intervenção sejam mais eficazes que medidas terapêuticas para o controle da morbimortalidade pela doença. Estas medidas de intervenção baseiam-se na detecção precoce do câncer e na identificação e controle dos fatores de risco. Entre os fatores de risco estão hábitos culturais, como tabagismo e alguns tipos de dieta, alguns vírus, como o da hepatite B, algumas substâncias naturais, como a

aflatoxina B1 e os agentes químicos de origem industrial [3-5]. A participação destas últimas substâncias no desenvolvimento de 1 a 8% das neoplasias humanas (incluindo as ocupacionais) obriga os governos de cada país a regulamentar a produção, distribuição, uso e eliminação dos agentes químicos potencialmente cancerígenos, em benefício do público [5-7]. A primeira etapa deste processo é, evidentemente, identificar quais daqueles agentes têm potencial cancerígeno (Figura 1).

Para se identificar a carcinogenicidade de substâncias químicas há dois tipos básicos de estudo: os clínico-epidemiológicos, que enfocam populações humanas, e os experimentais, que se utilizam particularmente de roedores [6, 8, 9]. Ambos os tipos de estudo caracterizam-se por ter como parâmetro final de análise o de-

<sup>1</sup>Professor Adjunto, Médico Patologista; <sup>2</sup>Bióloga. Mestre em Patologia; <sup>3</sup>Médica Veterinária; <sup>4</sup>Professor and Chairman, First Department of Pathology, Nagoya City University Medical School, Nagoya, 467, Japan. Endereço do autor para correspondência: Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina - UNESP - Botucatu - SP - CEP 18618-000

envolvimento do câncer propriamente dito. Quando os estudos clínico-epidemiológicos identificam um agente cancerígeno, o pior já aconteceu, i.e., os grupos humanos estudados já foram atingidos pelo efeito nocivo daquela substância. Desta maneira, os estudos experimentais com roedores são os verdadeiros testes prospectivos, aos quais os agentes químicos devem ser submetidos antes de serem utilizados em qualquer atividade humana. Existem outros testes, que podem sugerir o potencial cancerígeno de uma substância, como os testes de mutagenicidade [10-13]. No entanto, o que estes testes de fato analisam é a genotoxicidade do agente, ou seja, sua toxicidade aos cromossomos ou ao DNA. Eles foram adotados como testes preditivos de carcinogenicidade devido à íntima relação que existe entre os potenciais mutagênico e cancerígeno dos compostos químicos. Contudo, nos últimos anos ficou claro que cerca de 25-30% dos cancerígenos não têm potencial mutagênico: são os cancerígenos não-genotóxicos, cujo mecanismo de ação difere daqueles dos cancerígenos genotóxicos e, naturalmente, não são detectáveis pelos testes de mutagenicidade [10-12]. Além de não detectar todos os agentes potencialmente cancerígenos, os testes de mutagenicidade, por usarem sistemas relativamente simples, como bactérias ou células de mamíferos, têm como parâmetro final (*end-point*) o desenvolvimento de lesões que são biologicamente muito diferentes da neoplasia completamente instalada.



**Figura 1.** Etapas para administração do risco imposto ao meio ambiente e às populações humanas por substâncias cancerígenas.

De acordo com as evidências sobre seu potencial cancerígeno, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classifica os agentes químicos em quatro grupos [6]: grupo 1) quando há evidências suficientes, obtidas em estudos clínico-epidemiológicos, de que as substâncias são cancerígenas para o homem; grupos 2A e 2B) quando as evidências no homem são

limitadas, e as evidências em animais de experimentação são respectivamente suficientes ou não-disponíveis, sendo os agentes considerados respectivamente prováveis ou possíveis cancerígenos; excepcionalmente, um agente pode ser colocado nesta categoria quando não existem evidências humanas, mas as evidências experimentais são suficientes e expressivas; grupo 3) inclui agentes que não são classificáveis quanto a sua carcinogenicidade para o homem; grupo 4) engloba os agentes que provavelmente não são cancerígenos para o homem. Uma classificação similar é adotada pelo Programa Nacional Norte-americano de Toxicologia (NTP) [7, 8]. Estas classificações são qualitativas, i.e., indicam que o agente está relacionado com o desenvolvimento do câncer, mas não seu mecanismo de ação nem a potência da carcinogenicidade. É importante destacar que o grupo 2 baseia-se principalmente nos estudos experimentais para definir o agente como cancerígeno, quando os estudos clínico-epidemiológicos são inconclusivos ou inexistentes.

#### Teste de longa duração *in vivo* para detecção de cancerígenos

O estudo experimental padrão, para definir se uma substância é um cancerígeno químico, dura cerca de cinco anos, desde o delineamento até o estabelecimento de suas conclusões (teste de longa duração em roedores) [8, 9]. O protocolo determina que devem ser utilizados os dois sexos de duas espécies animais (em geral, ratos e camundongos), e no mínimo duas doses de substância a ser testada. No total, chega-se a cerca de 600 roedores, se são considerados também os grupos-controle não-tratados. Os animais são sacrificados após um e meio a dois anos de tratamento e submetidos à necrópsia completa. A substância-teste será definida como cancerígena se associar-se às taxas elevadas de neoplasias malignas ou à antecipação do aparecimento de neoplasias nos animais tratados, quando comparados com controles não-tratados.

Internacionalmente há uma rede de laboratórios e de serviços envolvidos na execução dos testes de longa duração de agentes químicos selecionados. No entanto, a capacidade destes laboratórios é limitada e paulatinamente aumenta a lista de substâncias que aguardam ser testadas antes de colocadas à disposição do público [8]. No Brasil - não há qualquer possibilidade de realizarem-se testes de longa duração, pois não há número suficiente de profissionais habilitados, não existem linhagens adequadas de animais de experimentação e são deploráveis as condições dos biotérios, que não têm infra-estrutura para manter os animais vivos durante até dois anos. Foram estas as

limitações enfrentadas pela Portaria Normativa 349 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), baseada na Lei 7802, de 1989, e no Decreto nº 98.818, de 1990, que determinam que, para registro, renovação de registro e uso de qualquer pesticida, é necessária a apresentação dos resultados que o agente obteve em testes de longa duração com roedores, executados conforme o Manual de Testes para Avaliação de Ecotoxicidade de Agentes Químicos [14]. Aquela portaria, para superar a contradição de exigir um teste que não era possível ser realizado no país, previu um prazo para aceitação dos testes executados no exterior. O prazo esgotou-se e nenhum laboratório nacional adquiriu condições para desenvolver estudos de longa duração sobre carcinogenicidade. A inexistência de massa crítica na área torna difícil ao país acompanhar o desenvolvimento dos conhecimentos sobre o potencial cancerígeno dos agentes químicos que ocorre no exterior. Pode-se chegar até ao ponto de não se conseguir analisar os relatórios técnicos produzidos por laboratórios estrangeiros, tornando esta área de avaliação toxicológica inacessível para as comunidades científica e governamental brasileiras.

De qualquer maneira, existem várias desvantagens nos estudos de longa duração (Tabela 1). Uma crítica maior a ele é que uma das doses propostas para o teste deve ser próxima ou equivalente à dose máxima tolerada, em geral associada à toxicidade tecidual e à proliferação celular (mitogênese) reparativa, que pode associar-se às taxas elevadas de mutação, provocadas por estímulos diferentes da substância testada, culminando com o desenvolvimento de tumores [15]. Isto pode levar várias substâncias a serem consideradas cancerígenas, quando na verdade são basicamente citotóxicas nas doses em que são testadas. Também estes testes têm o inconveniente de não considerar no seu delineamento o caráter de múltiplas etapas da carcinogênese química, o que é importante para entender o mecanismo de ação de um agente cancerígeno. A compreensão dos mecanismos da carcinogênese por um determinado agente é cada vez mais im-

**Tabela 1.** Desvantagens do teste de longa duração para detectar a carcinogenicidade de substâncias químicas.

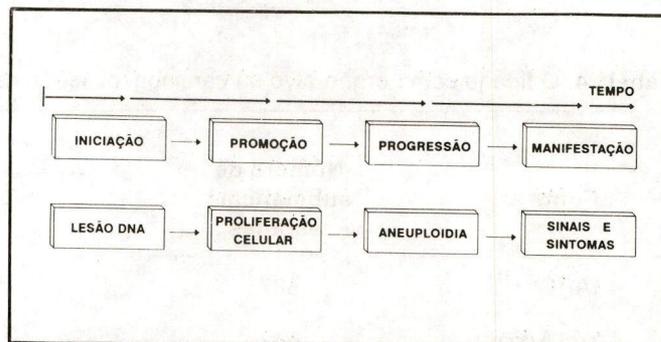
1. Duração longa:	cerca de cinco anos para o primeiro laudo de resultados
2. Onerosos:	US\$ 1,000,000 por substância testada (ST). Muitos animais, grande quantidade de ST, manutenção cara
3. Execução complexa:	biotério, diagnóstico anatomopatológico, equipe grande

*Em consequência:* muitos agentes químicos esperando para serem examinados

portante para definir e administrar o risco imposto por ele.

### Carcinogênese de múltiplas etapas e cancerígenos químicos

Um avanço significativo no delineamento dos testes para avaliação da carcinogenicidade dos agentes químicos foi o desenvolvimento de protocolos baseados no conceito de carcinogênese por múltiplas etapas. Este conceito traduz a idéia de que o desenvolvimento do câncer é um processo que ocorre por etapas seqüenciais, denominadas respectivamente de iniciação, promoção, progressão e manifestação (Figura 2). A carcinogênese por múltiplas etapas está bem caracterizada experimentalmente [16, 17] e é provável que também ocorra no ser humano [18, 19, 20]. Nos protocolos experimentais, a administração sucessiva de diferentes substâncias químicas leva à modificação (promoção ou inibição) do processo de carcinogênese, induzido por um cancerígeno inicial. A iniciação está associada a uma alteração mais ou menos permanente do DNA, induzida pela exposição a um cancerígeno. Assim, agentes iniciadores são genotóxicos. Na promoção as células iniciadas proliferam focalmente, uma ou mais delas evoluindo para as etapas posteriores da carcinogênese. Assume-se que os agentes promotores em geral não são genotóxicos e atuam de maneira epigenética, principalmente alterando os sinais moleculares envolvidos no controle da proliferação celular [16, 17]. No entanto, cancerígenos genotóxicos também podem ser promotores, pois podem modificar quantitativamente o processo da carcinogênese iniciada com outros agentes químicos [21, 22]. Na progressão, as células em multiplicação evoluem para a malignidade, documentada pela anaplasia, infiltração e metástases. Esta é a última fase na qual a neoplasia manifesta-se clinicamente. A Tabela 2 apresenta uma proposta de classificação dos cancerígenos químicos, de acordo com o seu potencial iniciador e/ou promotor da carcinogênese.



**Figura 2.** Etapas da carcinogênese química e fenômenos biológicos mais importantes associados a cada uma delas.

### Testes de média duração *in vivo* para detecção de cancerígenos

Os testes baseados no conceito de carcinogênese por múltiplas etapas caracterizam-se por tempo de execução reduzido a algumas semanas ou meses (testes de média duração). Em geral, seu protocolo caracteriza-se por ter duas etapas (iniciação e promoção), e pelo uso de um sexo de uma só espécie animal: o rato. Em consequência, estes testes permitem economia de instalações, de reagentes, de animais, etc., reduzindo consideravelmente o custo da avaliação da carcinogenicidade para cerca de US\$ 20.000-25.000/substância testada. Os conceitos básicos destes testes elaborados por Ito e colaboradores [21] estão na Tabela 3.

Dentre os testes de média duração propostos por vários autores destacam-se os que têm o fígado como órgão-alvo [21, 23-26]. Como grande parte dos cancerígenos identificados pela IARC e pelo NTP são também hepatocancerígenos (Tabela 4) [6, 8, 10], este teste é muito prático para a detecção rápida de cancerígenos ambientais e industriais, principalmente se usado em combinação com os resultados dos testes de mutagenicidade.

No protocolo proposto por Ito e colaboradores [21, 24, 26], a iniciação é realizada pela dietilnitrosamina (DEN), um hepatocancerígeno genotóxico (Figura 3). Os animais são colocados em repouso e depois expostos à substância que se quer testar (substância-teste, ST), em geral via dieta e em doses definidas segundo

**Tabela 2.** Classificação dos cancerígenos químicos baseados nos efeitos de iniciação e promoção da carcinogênese.

Efeitos		Classificação	Carcinogenicidade
Iniciação	Promoção		
Forte	Forte	Cancerígeno primário	++++
	Fraca	Cancerígeno primário	++
	Nula	Iniciador puro	±
Fraca	Forte	Cancerígeno primário	+++
	Fraca	Cancerígeno primário	+
	Nula	Iniciador puro	±
Nula	Forte	Cancerígeno secundário (promotor)	++
	Fraca	Cancerígeno secundário (promotor)	+
	Nula	Não-cancerígeno	-

**Tabela 3.** Princípios conceituais dos testes de média duração para avaliação da carcinogenicidade de substâncias químicas.

1. Cancerígenos completos têm atividade iniciadora e promotora da carcinogênese.
2. Substâncias iniciadoras podem ser detectadas em testes de mutagenicidade, de curta duração.
3. A carcinogenicidade e o organotropismo de agentes cancerígenos podem ser detectados por sua atividade promotora.
4. O potencial cancerígeno das substâncias químicas pode ser melhor avaliado pela detecção do seu potencial promotor, em associação com testes de mutagenicidade.

**Tabela 4.** O fígado como órgão-alvo da carcinogenicidade de agentes químicos.

Fonte	Número de substâncias testadas	Substâncias cancerígenas		
		Total	Teste de Ames +	Neoplasia no fígado
IARC*	587	147	110 (75%)	87 (59%)
NCI/NTP*	224	149	80 (54%)	80 (54%)

\*IARC, International Agency for Cancer Research; NCI/NTP, National Cancer Institute/National Toxicology Program [6, 8, 10].

dados toxicológicos já conhecidos. Desta maneira, o que se avalia é o potencial da ST promover o crescimento de populações celulares iniciadas. A estrutura do teste consiste de três grupos, com 15 animais cada: o primeiro é o grupo experimental, com toda a seqüência de tratamentos; o segundo é o controle da iniciação, não exposto à ST e o terceiro é o controle da exposição à ST, não tratado com o agente iniciador da carcinogênese.

A duração relativamente curta do experimento - 8 semanas - é conseguida com hepatectomia parcial (HP) e com o estabelecimento de *end-points* precoces. A HP desencadeia proliferação celular difusa no órgão, inclusive das células previamente iniciadas, o que estimula a promoção da carcinogênese. *End-points* precoces são lesões já caracterizadas como pré-neoplásicas, como são os focos de hepatócitos que expressam a forma placentária da enzima glutiona S-transferase (GST-P), detectada imuno-histoquimicamente (Figura 4). Existem outras enzimas e fenótipos citológicos que podem servir como marcadores destes focos, mas a GST-P é considerada a melhor delas [21, 25, 26]. O resultado do teste é expresso em número e tamanho dos focos por cm<sup>2</sup> de corte histológico analisado. Oferecendo resultados quantitativos, este teste permite até que se avalie a magnitude relativa do potencial cancerígeno dos agentes químicos [22]. Muito importante, seus resultados correlacionam-se bem com os resultados obtidos em testes de longa duração [27]. O

protocolo DEN-HP foi avaliado em 242 compostos, distribuídos em quatro classes, independentemente de serem genotóxicos ou não-genotóxicos: cancerígenos hepáticos já conhecidos, cancerígenos específicos para órgãos que não o fígado, agentes não-cancerígenos e agentes com carcinogenicidade não conhecida [21, 24, 26] (Tabela 5). Nestas avaliações, 97% dos hepatocancerígenos genotóxicos e 86% dos não-genotóxicos foram positivos. Os hepatocancerígenos falsos-negativos (10%) ficaram por conta dos agentes proliferadores de peroxissomos, que atuam negativamente sobre a expressão da GST-P e do 4,4'-diaminodifenilmetano (DDPM), uma substância intermediária em vários processos industriais. Os resultados demonstram uma taxa pequena (5%) de falsos-positivos, o que vem a ser uma vantagem prática do ensaio. No entanto, o sistema foi ineficiente em detectar cancerígenos que não são específicos para o fígado. Dos 54 cancerígenos genotóxicos analisados, 65% revelaram-se positivos, a maioria (80%) dos quais hepatocancerígenos, i.e., só foram detectados 20% dos cancerígenos genotóxicos que não têm o fígado como órgão-alvo. Dos 41 cancerígenos não-genotóxicos examinados, 63% mostraram-se positivos no sistema, demonstrando o potencial deste teste em relação a este grupo de agentes químicos. A Tabela 6 apresenta várias vantagens do teste de média duração com o protocolo DEN-HP na determinação da carcinogenicidade das substâncias químicas.

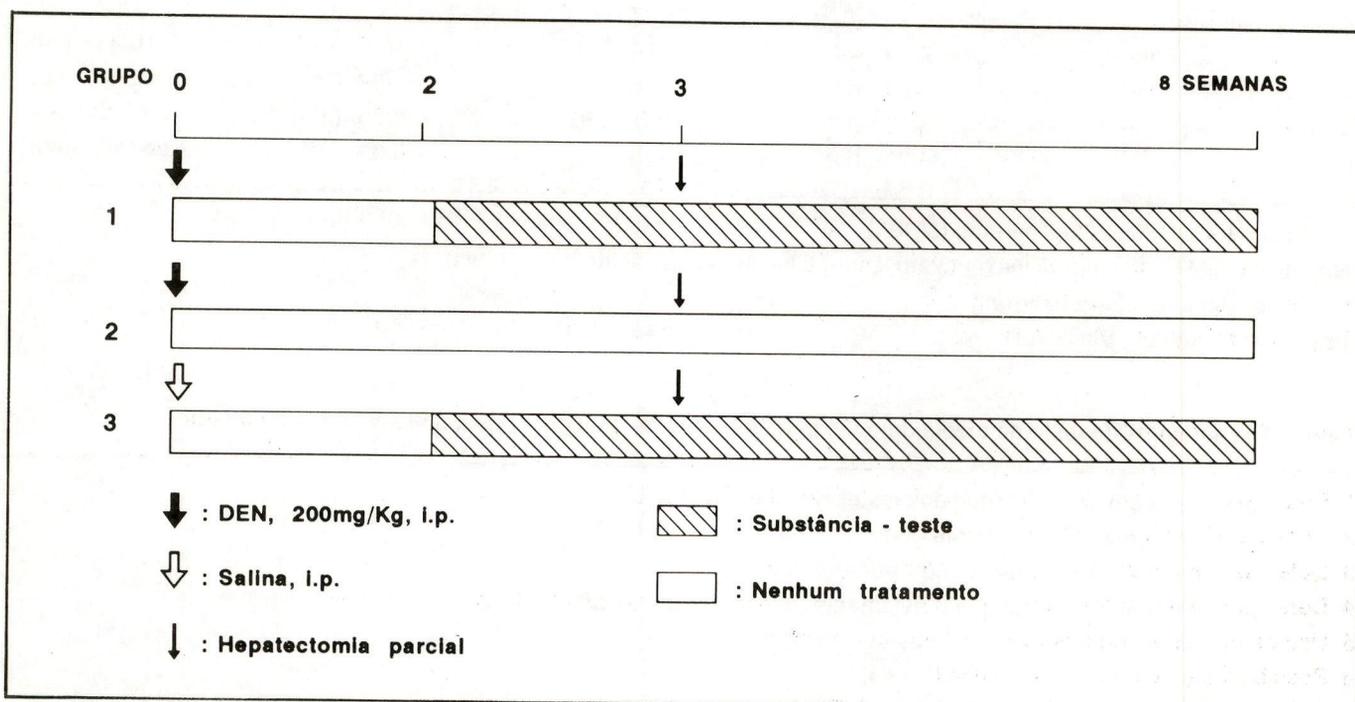
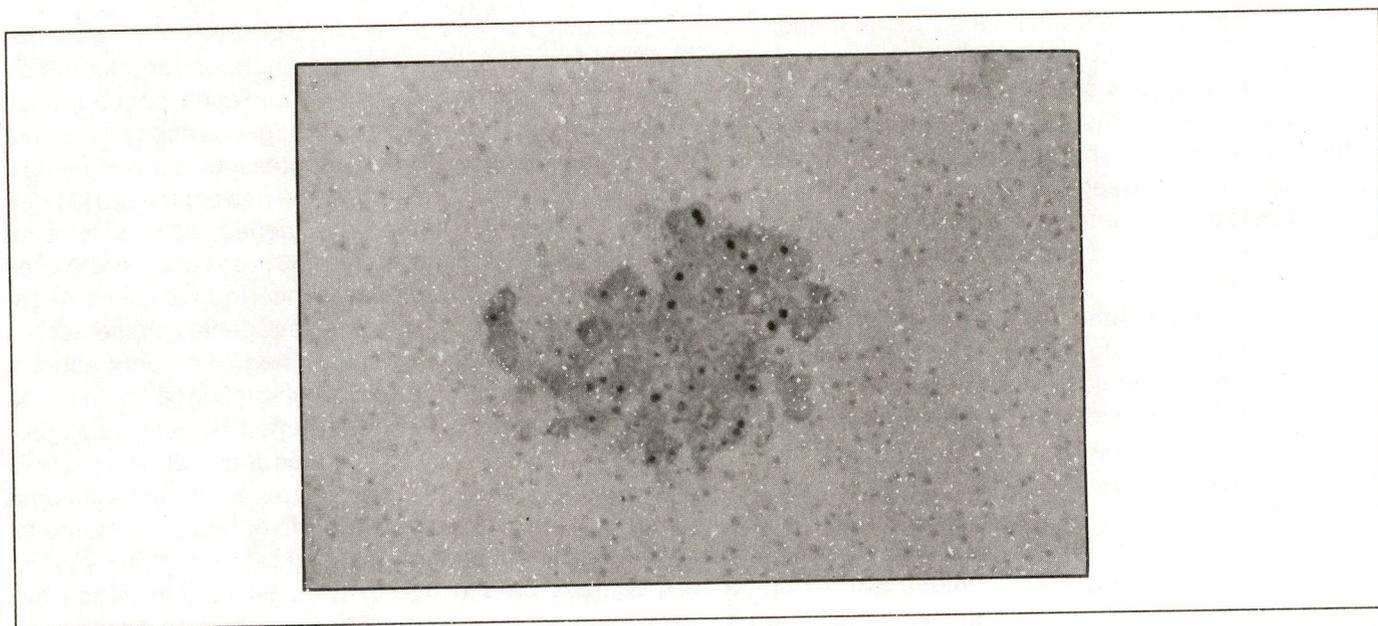


Figura 3. Protocolo experimental do teste de média duração no fígado para detecção da carcinogenicidade de agentes químicos.



**Figura 4.** Foco de hepatócitos expressando a enzima glutationa s-transferase, forma placentária, em fígado de rato tratado com dietilnitrosamina (200 mg/kg de peso, i.p) (x150, reação imuno-histoquímica pela avidina-biotina-peroxidase).

**Tabela 5.** Taxa de positividade (%) de 242 compostos químicos no teste de média duração (protocolo DEN-HP), distribuídos segundo resultados do teste de Ames e do potencial cancerígeno observado em teste de longa duração.

Potencial cancerígeno	Teste de Ames			Total
	+	-	Desconhecido	
Hepatocancerígeno	28/29 (97) <sup>a</sup>	23/27 (86) <sup>b</sup>	0/1 (0) <sup>c</sup>	51/57 (89)
Não-hepatocancerígeno	7/25 (28)	3/14 (21)	0/2 (0)	10/41 (24)
Não-cancerígeno	0/6 (0)	2/36 (06) <sup>d</sup>	0/2 (0)	2/44 (05)
Desconhecido	3/13 (23)	22/61 (36)	8/26 (31)	33/100 (33)
Total	38/73 (52)	50/138 (36)	8/31 (26)	96/242 (40)

<sup>a</sup>Negativo; 4,4'-diaminodifenilmetano (DDPM)

<sup>b</sup>Negativos; clofibrato, Di(2-etilhexil)ftalato, Di(2-etilhexil)adipato, ácido tricloacético

<sup>c</sup>Negativo; Dehidroepiandrosterona

<sup>d</sup>Positivos; Malathion, Vinclozolin

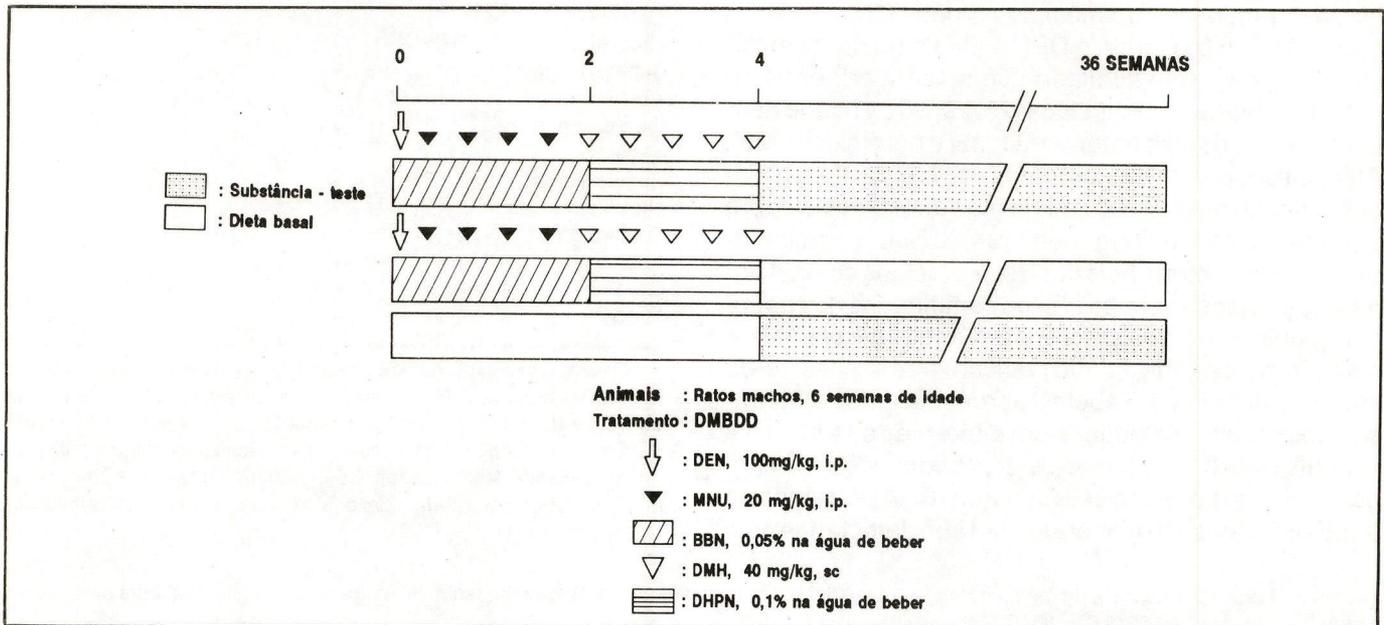
**Tabela 6.** Vantagens do teste de média duração para detecção de cancerígenos químicos no fígado do rato.

1. Boa correlação com os resultados dos testes de longa duração.
2. Conclusões em prazo relativamente curto.
3. Detecção de hepatocancerígenos não-genotóxicos.
4. Detecção de hepatocancerígenos previamente detectados só no camundongo.
5. Uso de pequenas quantidades de substância-teste.
6. Possibilidade de quantificação das lesões.
7. Relação dose-resposta nítida, com previsibilidade da dose cancerígena.
8. Economia de animais, tempo e recursos.

### Teste de média duração *in vivo* para detecção da carcinogenicidade em múltiplos órgãos

A extrema especificidade do órgão-alvo no protocolo DEN-HP, dependente do agente iniciador da carcinogênese, é uma limitação do teste, como apontado no item anterior. Para superar esta limitação, Ito e colaboradores desenvolveram um teste de média duração, que se caracteriza por desencadear a iniciação da carcinogênese em múltiplos órgãos, às custas da utilização de agentes iniciadores com diferentes órgãos-alvo [21, 28, 29] (Figura 5). Sua duração é de 20 a 28, no máximo 36 semanas. Para a iniciação pode-se usar, quase simultaneamente, a DEN (para o fígado), a N-metil-N-nitrosourea (MNU) (esôfago, estômago anterior e glandu-

lar, intestino delgado, rins, bexiga, tecido nervoso e órgãos hematopoiéticos), aN-butil-N-(4-hidroxibutil)-nitrosamina (BBN) (bexiga), a dihidroxi-di-propilnitrosamina (DHPN) (pulmões, tireóide e rins) e a dimetilhidrazina (DMH) (cólon). Dependendo do número dos agentes iniciadores, existem protocolos com cinco (variante DMBDD) e com três (variante DMD) agentes. Em correspondência à variedade de órgãos iniciados, há também uma grande variedade de *end-points* para avaliação da positividade do composto-teste (Tabela 7). Algumas destas lesões têm evidente caráter (pré-)neoplásico, como as displasias, hiperplasias, adenomas, papilomas e carcinomas; neste caso, a natureza dos *end-points* é qualitativa. Outras lesões têm natureza mais quantitativa, i.e., traduzem o potencial cancerí-



**Figura 5.** Protocolo do teste de média duração em múltiplos órgãos para detecção da carcinogenicidade de substâncias químicas.

**Tabela 7.** Parâmetros para avaliação da carcinogenicidade de agentes químicos no teste de média duração em múltiplos órgãos.

Órgão	Para análise quantitativa	Para análise da incidência
Cavidade nasal		Hiperplasia PN, papiloma, carcinoma
Pulmão	Adenoma, adenocarcinoma	Adenoma, adenocarcinoma
Língua, esôfago	Hiperplasia PN	Hiperplasia PN, papiloma, carcinoma
Estômago anterior		Hiperplasia, papiloma, carcinoma
Estômago glandular	PAPG	Hiperplasia adenomatosa, adenoma, adenocarcinoma
Intestino	Criptas aberrantes	Hiperplasia adenomatosa, adenoma, adenocarcinoma
Fígado	Focos GST-P positivos	Nódulo hiperplásico, carcinoma
Pâncreas	Focos de ácinos alterados	Foco alterado, adenoma, adenocarcinoma
Rim	Túbulos alterados	Adenoma, adenocarcinoma
Bexiga	Hiperplasia PN, papiloma	Hiperplasia PN, papiloma, carcinoma
Tiróide		Adenoma, adenocarcinoma
Mama		Adenoma, adenocarcinoma
Próstata		Displasia, adenocarcinoma
Útero		Adenocarcinoma

PN, papilífera ou nodular; PAPG, glândulas pilóricas alteradas, sem pepsinogênio tipo 1

geno do agente testado se ele provocar aumento significativo do número destas lesões nos animais tratados.

A Tabela 8 demonstra a vantagem que a variante DMD apresenta em relação ao protocolo DEN-HP: substâncias negativas neste teste revelam-se cancerígenas para outros órgãos que não o fígado. Aquela tabela também indica o forte organotropismo específico que em geral os cancerígenos químicos têm, e demonstra que seu potencial cancerígeno pode não ser detectado, quando se adota somente um órgão como o alvo do teste. O Caprolactam, que é o único agente colocado no grupo IV da IARC [6], também foi negativo nesta variante do teste em múltiplos órgãos. Desta maneira, verifica-se grande consistência entre os resultados apresentados pelas substâncias listadas em testes de longa duração e no de múltiplos órgãos [30].

Assim como o modelo DEN-HP, o modelo de múltiplos órgãos foi avaliado com cancerígenos e anticancerígenos conhecidos [28, 29, 30], e usado para testar antioxidantes naturais [31, 32] e agrotóxicos [33]. Além disso, permitiu documentar os efeitos da associação de baixas doses de diferentes substâncias sobre o processo da carcinogênese [34], o que é particularmente interessante, pois com os protocolos convencionais os estudos sobre os efeitos combinados dos agentes químicos requerem grande número de animais e duração prolongada, sendo praticamente impossível de serem realizados. A Tabela 9 apresenta uma comparação dos resultados obtidos em diferentes sistemas e a variante DMBDD. Algumas delas, os cancerígenos não-genotóxicos hidroxianisole butilado (BHA), o catecol, o 3-metoxicatecol e o clofibrato, não são detectadas pelo

sistema DEN-HP, mas o foram no teste de múltiplos órgãos. As aminas heterocíclicas (PhIP, Glu-P-1 e MelQ), que são mutagênicas e cancerígenas em testes de longa duração, são também positivas neste sistema de média duração. Nestes vários experimentos, as substâncias testadas apresentaram, em todos os casos, o organotropismo esperado, demonstrando a consistência do protocolo apresentado.

Tabela 9. Consistência relativa entre dois testes de média duração para carcinogenicidade.

Composto	C	M	Sistema DEN + HP	Sistema DMBDD
BHA	+	-	-	+
Catecol	+	-	-	+
Catequinas	?	-	-	-
3-metoxi-catecol	+	-	NE	+
Ácido elágico	?	-	NE	-
Quercetina	?	+	-	-
Vanilina	?	-	NE	+
Sulfeto dialfílico	?	-	+	+
Dissulfeto dialfílico	?	-	-	-
Clofibrato	+	-	-	+
PhIP	+	+	-	+
Glu-P-1	+	+	+	+
MelQ	+	+	+	+

C = Carcinogenicidade, registrada em estudos *in vivo* de longa duração; M = Mutagenicidade; NE = não examinado; Sistema DEN + HP = estudo de média duração no fígado; Sistema DMBDD = estudo de média duração em múltiplos órgãos; BHA = hidroxianisole butilado; PhIP = 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol-[4,5-b]piridina; GLU-P-1 = 2-amino-6-metil-dipirido-[1,2-a:3',2'-d]imidazol; MelQ = 2-amino-3,8-dimetilimidazo-[4,5-f]quinoxaline

Tabela 8. Resultados do teste de média duração em múltiplos órgãos, variante DMD, para substâncias negativas no teste de média duração no fígado.

Substância-teste	Carcinogenicidade*	Teste de Ames**	Órgãos						Conclusão
			Fígado	Pulmão	Tiróide	Estômago anterior	Estômago glandular	Bexiga	
BBN	+	+	↑	→	→	→	→	↑	+
3-MC	+	+	↑	→	→	→	→	→	+
DDPM	+	+	↑	→	↑	→	→	→	+
DMBA	+	+	↑	→	→	→	→	→	+
Catecol	+	-	↓	→	→	↑	↑	→	+
Clofibrato	+	-	↓	→	↓	→	→	↑	+
Propineb	+	-	→	→	↑	→	→	→	+
Folpet	+	?	→	→	↑	↑	→	→	+
Caprolactam	-	-	→	→	→	→	→	→	-

\*Estabelecida por testes de longa duração; \*\*Teste de mutagenicidade com *Salmonella thyphimurium*.

↑: Aumento evidente; ↑ Aumento; ↓ Inibição → Sem efeito

BBN: N-butil-N-(4-dihidroxibutil)-nitros amina; 3-MC = 3-metilcolantremo;

DDPM = Diaminodifenilmetano; DMBA = dimetilbenzoantraceno.

## Conclusões e propostas

Em conseqüência do exposto, Ito e colaboradores propuseram incluir os testes de média duração no fluxograma de decisões sobre a carcinogenicidade dos agentes químicos [21] (Figura 6). Neste fluxograma modificado, os testes de mutagenicidade constituem uma etapa importante, mas não decisiva. A primeira etapa decisiva é o teste de média duração com o protocolo DEN-HP. Se o agente químico for positivo neste teste, deve ser tratado como cancerígeno. Se não o for, a substância deve ser submetida ao teste em múltiplos órgãos quando, sendo um cancerígeno, terá chance de revelar-se positiva, já que este teste verifica a possibilidade de estar ocorrendo o processo de carcinogênese em praticamente todo o organismo, através da iniciação múltipla e de necrópsias completas. Somente se

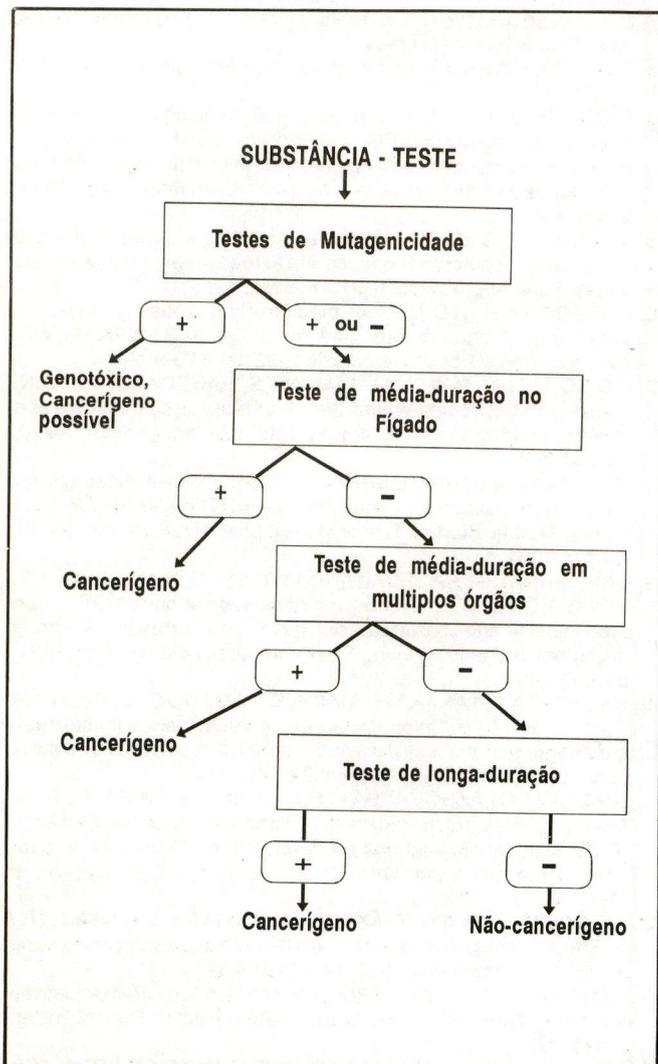


Figura 6. Fluxograma para identificação de agentes cancerígenos.

continuar negativa esta substância deverá ser submetida ao teste de longa duração, particularmente se for de grande relevância sócio-econômica, ou implicar em exposição ampla e prolongada.

No Brasil existem vários laboratórios habilitados a executar os testes de mutagenicidade. Resta equacionar a maneira de definir a periculosidade e de administrar o risco cancerígeno dos agentes químicos, considerando que os testes de longa duração não são realizados no país. O governo brasileiro poderia utilizar os conhecimentos e os laudos gerados no exterior e adotar, caso a caso, as regulamentações dos países de origem, adaptando algumas medidas às condições nacionais, após ouvir especialistas da área. Esta situação é muito próxima da existente hoje; é uma solução prática, imediata e pouco onerosa. Isoladamente, porém, apresenta desvantagens, pois dificilmente fornecerá condições para realizarmos análise de risco ajustadas ao nosso país. Uma das razões reside no fato de que as informações importadas em geral referem-se a produtos técnicos e não às formulações utilizadas no mercado. Também nunca estaremos cientes por completo das circunstâncias que envolvem a liberação e regulamentação das substâncias químicas, naqueles países. Principalmente, não será criada no Brasil a massa crítica necessária para executar testes de carcinogenicidade, com resultados aceitáveis internacionalmente, ou que possa assessorar adequadamente o governo.

Como alternativa, as agências de fomento à pesquisa e as indústrias deveriam investir no desenvolvimento de testes de carcinogênese de média duração em laboratórios de instituições públicas e privadas. Estes são os testes mais adequados para avaliar o potencial cancerígeno dos produtos que têm importância sócio-econômica no contexto nacional. A adoção desta política, sem desconsiderar os resultados dos testes de longa duração obtidos no exterior, com análise caso-a-caso dos produtos, resultará, numa redução mais veloz do que a atual, do volume de substâncias que aguardam definição sobre seu potencial cancerígeno, para fins de registro e uso no país.

O aumento do *know-how* local propiciará um ambiente mais adequado para a discussão da carcinogenicidade dos agentes químicos: por um lado, ajudará na regulamentação daqueles agentes que potencialmente podem ser cancerígenos para o homem e, por outro, permitirá desmontar a idéia de periculosidade de algumas substâncias que estão e devem continuar no mercado. No geral, toda a questão de registrar ou não um agente químico no Brasil será encaminhada de maneira a beneficiar o público e os produtores, que são ambos vítimas da desinformação e da ausência de conhecimento técnico no território nacional.

## Summary

The most important currently available experimental tool to identify environmental chemical carcinogens is the long-term *in vivo* test with rodents. Brazil doesn't have enough expertise and/or suitable facilities to run such test. Consequently, this country is absolutely dependent on technical knowledge generated abroad about human and environmental risks imposed by chemical compounds. On the other hand, several disadvantages of the long-term test, such as the complexity of its protocol, excessive time for obtaining the conclusions and cost, imply in more convenient, alternative testing procedures. Herein, two *in vivo* tests with rats, more advantageous than the long-term test for massive detection of chemical carcinogens, are presented. They are shorter running and less expensive than the conventional test. These systems have respectively only-the-liver or multiple-simultaneous-organs as the targets for the carcinogenic action of the chemical agent. Both systems were validated by testing many chemical compounds and the results reproduced those obtained in long-term studies. The authors point the advantage of using such testing systems in countries like Brazil and suggest their inclusion in the sequence of procedures used to identify carcinogens among chemicals of public relevance.

**Key words:** carcinogens; environment; detection; tests; chemical compounds; cancer; rats

## Referências bibliográficas

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Câncer no Brasil. Dados dos Registros de Base Populacional. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer (INCA), Coordenação de Programas de Controle do Câncer (Pro-Onco), 1991; 36.
- MENDONÇA GAS. Câncer no Brasil: um risco crescente. Rev Bras Cancerol 1992; 38: 167-176.
- HIGGINSON J. Environmental carcinogenesis. Cancer 1993; 72: 971-7.
- HENDERSON BE, ROSS RK, PIKE MC. Toward the primary prevention of cancer. Science 1991; 254: 1131-1138.
- VAINIO H, HEMMINKI K. Use of exposure information and animal cancer data in the prevention of environmental and occupational cancer. Cancer Detect Prev 1991; 15: 7-16.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Supplement 7, 1987: 440.
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. Sixth Annual Report on Carcinogens, Summary. U.S. Department of Health and Human Services, National Institute of Environmental Health Sciences, 1991: 460.
- HUFF J, HASEMAN J, HALL D. Scientific concepts, value, and significance of chemical carcinogenesis studies. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1991; 31: 621-652.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Statistical Methods in Cancer Research. Volume III. Gart JJ, Krewski D, Lee PN, Wahrendorf J. The design and analysis of long-term animal experiments. IARC Scientific Publication n° 79, IARC, Lyon 1986: 219.
- ZEIGER E. Carcinogenicity of mutagens: predictive capability of the *Salmonella mutagenesis* assay for rodent carcinogenicity. Cancer Res 1987; 47: 1287-1296.
- ISHIDATE M Jr., HARNOIS MC, SOFUNI T. A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures. Mutat Res 1988; 195: 151-213.
- ASHBY J, TENNANT RW. Definitive relationship among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the US NTP. Mutat Res 1991; 257: 229-306.
- RABELLO-GAY MN. Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese - Métodos e Critérios de Avaliação. RABELLO-GAY MN, RODRIGUES MALAR, MONTELEONE-NETO R eds. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética, 1991: 246.
- SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE (SEMA). Secretaria de Tecnologia e Controle Ambiental (STC). Coordenadoria de Toxicologia Ambiental. Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília, DF, 1988: 351.
- COHEN SM, ELLWEIN LB. Cell proliferation and carcinogenesis. Science 1990; 249: 1007-1011.
- PITOT HC. The molecular biology of carcinogenesis. Cancer 1993; 72: 962-970.
- PITOT HC, DRAGAN Y. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. FASEB J 1991; 5: 2280-2286.
- FEARON ER, JONES PA. Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. FASEB J 1992; 6: 2783-2790.
- PINKERTON PH, DUBÉ ID. Chronic myeloid leukaemia as a paradigm for oncogenesis. Diagn Oncol 1991; 1: 288-297.
- SUGIMURA T. Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective. Science 1992; 258: 603-607.
- ITO N, SHIRAI T, HASEGAWA R. Medium-term bioassays for carcinogens. In: VAINIO H, MAGEE PN, MCGREGOR DB, MICHAEL AJ eds. Mechanisms of carcinogenesis in risk identification. Lyon: International Agency for Research on Cancer, IARC Scientific Publication n° 116, 1992: 353-388.
- DE CAMARGO JL V et al. Modifying effects of chemicals on the development of liver preneoplastic placental glutathione S-transferase positive foci in Analbuminemic and Sprague-Dawley rats. Toxicol Pathol, in press.
- PEREIRA MA. Rat liver foci bioassay. Am Coll Toxicol 1982; 1: 100-117.
- ITON, TSUDA H, TATEMATSU M et al. Enhancing effect of various hepatocarcinogens on induction of preneoplastic glutathione S-transferase placental form positive foci in rats an approach for a new medium-term bioassay system. Carcinogenesis 1988; 9: 387-394.
- DRAGAN YP, RIZVI T, XU Y-H et al. An initiation-promotion assay in rat liver as a potential complement to the 2-year carcinogenesis assay. Fund Appl Toxicol 1991; 16: 525-547.
- HASEGAWA R, ITO N. Liver medium-term bioassay in rats for screening of carcinogens and modifying factors in hepatocarcinogenesis. Food Chem Toxic 1992; 30: 979-992.
- OGISO T, TATEMATSU M, TAMANO S, HASEGAWA R, ITO N. Correlation between medium-term liver bioassay system data and results of long-term testing in rats. Carcinogenesis 1990; 11: 561-566.
- ITO N, SHIRAI T, FUKUSHIMA S. Medium-term bioassays for carcinogens using multi-organ models. In: ITO N and SUGANO H (Eds.). Modification of Tumor Development in Rodents. Basel, Karger, 1991: 41-57.
- FUKUSHIMA S, HAGIWARA A, HIROSE M, YAMAGUCHI S, TIWAWECH D, ITO N. Modifying effects of various chemicals on preneoplastic and neoplastic lesion development in a wide-spectrum organ carcinogenesis using F344 rats. Jpn J Cancer Res 1991; 82: 642-649.
- HAGIWARA A, TANAKA H, IMAIDA K, TAMANO S, FUKUSHIMA S, ITO N. Correlation between medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay data and long-term observation results in rats. Jpn J Cancer Res 1993; 84: 237-245.
- HIROSE M, OZAKI K, TKABA K, FUKUSHIMA S, SHIRAI T, ITO N. Modifying effects of the naturally occurring antioxidants -oryzanol, phytic acid, tannic acid and n-tritriacontane-16-18-dione in a rat wide-spectrum organ carcinogenesis model. Carcinogenesis 1991; 12: 1917-1921.
- HIROSE M, HOSHIYA T, AKAGI K, TAKAHASHI S, HARA Y, ITO N. Effects of green tea catechins in a rat multi-organ carcinogenesis model. Carcinogenesis 1993; 14: 1549-1553.
- ITON, HASEGAWA R, CABRAL JRP. Medium-term *in vivo* bioassay for carcinogenicity of pesticides. Rev Pestic Toxicol 1993; 2: 115-132.
- FUKUSHIMA S, SHIBATA M-A, HIROSE M, KATO T, TATEMATSU M, ITO N. Organ-specific modification of tumor development by low-dose combinations of agents in a rat wide-spectrum carcinogenesis model. Jpn J Cancer Res 1991; 82: 784-792.