

Dialquilnitrosaminas e câncer

ROMILDA E. KUHN¹, M. ANGÉLICA GUZMÁN-SILVA², JORGE S.P. GUIMARÃES³

Trabalho realizado no Hospital Universitário Antônio Pedro - Niterói - RJ.

Unitermos: nitrosaminas e câncer

Introdução

Desde a observação pioneira de Pott, em 1775, relacionando um agente ambiental, a fuligem, com a ocorrência de câncer de escroto em limpadores de chaminé, seguida da observação de Rehn, no século XIX, sobre o câncer de bexiga em operários de fábricas de corantes, não há mais dúvida quanto ao fato de que diversos elementos do meio ambiente, substâncias químicas, radiações e provavelmente vírus são responsáveis por alguns tipos de câncer no homem.

Hoje em dia, a maior parte dos cânceres humanos pode ser associada ao estilo de vida [1], principalmente tabagismo e dieta [2]. Fatores relacionados à nutrição participaram no desenvolvimento neoplásico, seja através de aditivos ou contaminantes alimentares que podem agir como carcinógenos, cocarcinógenos ou ambos, ou pela liberação de produtos metabólicos com essa capacidade, a partir de determinados componentes da dieta [1]. Do total de neoplasias, 5% são atribuídas a fatores específicos da dieta, entre eles nitratos e nitritos, afetando principalmente o fígado [2].

A seguir apresentaremos informações referentes a compostos N-nitroso, particularmente dialquilnitrosaminas, e sua participação na indução de neoplasias experimentais, bem como no homem.

Dialquilnitrosaminas

As N-nitrosaminas, entre elas as dialquilnitrosaminas, como dimetil-, dietil- e dibutilamina, são um grupo de compostos N-nitroso que exercem efeitos tóxicos e carcinogênicos sobre vários tecidos e órgãos, em diversas espécies animais e provavelmente no homem [3-10].

A dietilnitrosamina (DENA) é um líquido volátil, amarelo, solúvel em água, lipídios e solventes orgâ-

nicos. Quando em solução aquosa alcalina ou neutra, mantida no escuro, é estável à temperatura ambiente por um período superior a 14 dias, porém é sensível à luz, principalmente à luz ultravioleta [5].

As dialquilnitrosaminas têm sido detectadas em diversos elementos do meio ambiente, tais como ar poluído, fumo, certas bebidas alcoólicas, determinados alimentos naturais e outros submetidos a processos físico-químicos de conservação [5, 11]. Em análise de fumo concentrado de diversos cigarros comerciais, o teor de DENA atingiu até 28 ng/cigarro, e o de dimetilnitrosamina (DMNA), até 160 ng/cigarro [12]. Quanto aos alimentos, a DENA tem sido registrada em queijos, até 30 mg/kg, em óleo de soja, 4 mg/kg, e em peixes e carnes, níveis diversos, dependendo do procedimento de conservação, 147 mg/kg em arenque assado e até 21 mg/kg em peixe seco salgado, 91 mg/kg em carne defumada e 40 mg/kg em carnes em conserva [5].

A síntese desta substância ocorre através da reação da dietilamina como ácido nitroso [5], e estudos experimentais têm demonstrado a indução de neoplasias pela ingestão simultânea de nitrito e aminas secundárias [4, 7], devida provavelmente à formação *in vivo* de nitrosaminas.

As nitrosaminas, de um modo geral, podem ser produzidas bioquimicamente nas condições naturalmente ácidas do estômago, pela ingestão e nitrosação subsequente de aminas secundárias. O agente nitrosante - ácido nitroso - seria formado pela reação do suco gástrico com nitritos presentes nos alimentos, uma vez que são amplamente utilizados como preservadores alimentares. Por outro lado, sabe-se que certos alimentos vegetais - beterraba, espinafre, berinjela - contêm teores elevados de nitratos que podem ser reduzidos a nitritos em meio ácido, pela ação de bactérias que produzem a enzima nitroso-reductase [4, 13, 14]. Esses microorganismos estão

¹Professor Titular, AFE; ²Professor Assistente, UFF. ³Professor Titular, UFF. Endereço do autor para correspondência: Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFF, Rua Marquês de Paraná, 303, Niterói - RJ - CEP 24030.

naturalmente presentes em alimentos, conteúdo gastrointestinal e saliva [4].

Experimentalmente, em ratos, a ingestão de doses elevadas de nitrito de sódio aumentou a incidência de tumores renais, hepáticos, da glândula mamária, do trato gastrointestinal e do sistema linfo-hematopoiético, devido provavelmente a nitrosação *in vivo* de aminas e amidas [15]. No homem, após a ingestão de determinados alimentos, tem sido registrado aumento dos níveis sanguíneos de nitrosaminas. Assim, uma refeição contendo espinafre, 310 g, e toucinho, 170 g, duplicou o teor sanguíneo de DMNA, de 354 mg/l a 771 mg/l, e quintuplicou o de DENA, de 90 mg/l a 460 mg/l. Isto demonstra que as nitrosaminas podem ser sintetizadas no homem, *in vivo*, após ingestão de alimentos ricos em nitratos ou nitritos [16]. Mais ainda, existe uma quantidade considerável de compostos nitrogenados potencialmente reativos no suprimento alimentar. Certos vegetais e produtos de origem animal - bacalhau, presunto - são particularmente ricos em aminas secundárias e terciárias, as quais podem reagir com o ácido nitroso, resultando na síntese de compostos N-nitrosos, entre os quais as dialquilnitrosaminas [4, 17].

As nitrosaminas, de um modo geral, quando injetadas no organismo, persistem por período longo, sendo carregadas pela circulação, e produzem severa toxicidade nos órgãos alvo, principalmente o fígado, com praticamente nenhuma patologia no local da inculação [13].

As dialquilnitrosaminas requerem ativação metabólica para poder exercer seus efeitos tóxicos e carcinogênicos [13, 14, 18, 19]. A metabolização se dá pelas oxidases microssomais dos hepatócitos, com a participação de oxigênio e nucleotídeos de piridina reduzidos como co-fatores. A reação oxidativa inicial forma um composto intermediário hidroxilado instável, que se decompõe espontaneamente gerando carbônio reativo, o qual pode rapidamente alquilar macromoléculas-alvo da célula [6, 13, 14, 19].

Pesquisas realizadas em camundongos C57Bl, com o uso de técnicas histoautorradiográficas, demonstraram que não só o fígado, mas também outros tecidos - mucosas nasal, traqueal, brônquica, esofágica e lingual, glândulas salivares e lacrimais - têm competência metabólica para decompor a DENA [19], provavelmente pelo sistema enzimático de oxidases microssomais de função mista, dependente de citocromo P-450 [6, 14].

A carcinogenicidade organo-específica exibida por essa substância é, em parte, dependente do seu metabolismo nos tecidos susceptíveis [6]. Admite-se a existência de algumas propriedades, em determinados tecidos, que os tornam refratários à carcinogenicidade das nitrosaminas. Por exemplo, a intensidade e o local de reação do metabólito reativo com o ADN

e a capacidade de reparo dessas moléculas de ADN danificadas têm sido relacionados com a susceptibilidade dos órgãos ao carcinógeno. Por outro lado, postula-se que os tecidos refratários teriam capacidade de detoxicação das dialquilnitrosaminas por uma via metabólica que não leva à formação de metabólitos reativos [19].

O efeito organotrópico dos compostos N-nitroso depende, parcialmente, da via ou local de administração [7]. Contudo, parece haver uma estreita relação entre a metabolização nos diversos órgãos-alvo, gerando radicais alquilantes - íon carbônio - e o efeito quer seja tóxico ou carcinogênico das nitrosaminas [6, 10, 13, 14, 20-23].

A molécula alquilante ativa - íon carbônio - reage com vários sítios nucleofílicos das macromoléculas celulares. Assim, a lesão hepatotóxica aguda tem sido atribuída à alquilação de proteínas e ácidos nucleicos [20-22], e o efeito genotóxico têm sido relacionado à carcinogenicidade [6, 24-26]. Diversos locais específicos de alquilação dos ácidos nucleicos tem sido identificados [6, 13, 14, 26], ocorrendo principalmente a formação de N-7-alquilguanina [23]. Todavia, é bem provável que a estabilidade da ligação íon carbônio-base nitrogenada ou a incapacidade de reparo do ADN alterado sejam os eventos críticos do efeito carcinogênico das dialquilnitrosaminas [14, 24, 25]. A formação de O⁶-alquilguanina parece correlacionar-se melhor ao efeito carcinogênico, por ter maior estabilidade [6, 14] e capacidade mutagênica [6, 24, 26, 27].

Já foi comprovado que, em diversas linhagens celulares derivadas de neoplasias malignas humanas, bem como em tumores induzidos em roedores mediante carcinógenos químicos, acontece ativação de genes da família ras, por mutação pontual, e recentemente foi detectada ativação do oncogene N-ras em alguns carcinomas hepatocelulares induzidos com dibutilnitrosamina (DBNA) em ratos [28].

Muitos hepatocarcinógenos, entre eles as dialquilnitrosaminas, através do carcinógeno ativo - íon carbônio - interagem com as organelas celulares, alterando suas funções [29]. Estudos da carcinogênese hepática, com nitrosaminas em roedores, têm demonstrado a ocorrência de subpopulações hepatocelulares, que apresentam em estágios precoces alterações enzimáticas características [24-26, 29-31], além de hiperbasofilia citoplasmática [25, 26, 29, 32, 33]. Nos focos de hepatócitos alterados, tem sido detectada deficiência de adenosina-trifosfatase (ATP-ase) e glicose-6-fosfatase [25, 26, 30, 31, 34], bem como presença de gama-glutamil-transferase (γ -GT) [25, 26, 31, 34], acúmulo persistente de glicogênio [24, 29], acúmulo de ARN [33] e resistência ao acúmulo de ferro [25, 26, 34]. Os hepatócitos desses focos hiperbasofílicos são mais resistentes à citotoxicidade do microambiente tissular [24-26, 29, 32] e

exibem maior potencial de crescimento [30, 32], evidenciado por uma maior taxa de síntese de ADN [25, 26, 31] e um índice mitótico elevado [25, 26]. Essas populações focais com expressão fenotípica aberrante teriam caráter pré-neoplásico [24-26, 29-33].

O efeito carcinógeno das nitrosaminas, em diversas espécies animais, resulta na indução de tumores benignos e malignos, quando administradas por diversas vias, tais como transplacentária, tópica, oral, parenteral e inalação [3, 5, 7, 8]. Os principais órgãos-alvo integram trato gastrointestinal alto, trato respiratório e trato urinário [5, 8, 10]. Contudo, diversos fatores interferem tanto no organotropismo quanto no tipo de tumor induzido, entre eles citamos idade, sexo, linhagem/espécie animal e dose administrada [7, 10, 35-49]. Como já foi comentado, em última instância esses fatores estariam relacionados com a capacidade de metabolização das dialquilnitrosaminas, gerando radicais eletrofílicos, os quais, ao alquilar bases nitrogenadas (O^6 -alquilguanina), teriam efeito mutagênico, inclusive ativando determinados oncogenes e desencadeando assim o desenvolvimento neoplásico.

Inicialmente, o efeito carcinógeno das dialquilnitrosaminas foi demonstrado em ratos, por Magee e Barnes (1956), que utilizaram DMNA [6], e por Schmähl, e sua equipe (1960), que trabalharam com DENA [5]. Posteriormente, numerosas pesquisas confirmaram e ampliaram esse achado utilizando vários modelos experimentais, em diversas espécies/linhagens animais. Na maioria dos casos foram observados tumores hepatocelulares, freqüentemente com metástase pulmonar [5].

Modelos experimentais

A DENA administrada diariamente, por via oral, a ratos BD com quatro meses de idade, em pequenas doses (0,3-4,8 mg/kg p.c.), determinou carcinomas hepatocelulares após longo período de latência, doses mais elevadas (9,6-14 mg/kg p.c.) induziram cirrose e câncer, e acima de 14,2 mg/kg p.c. a DENA teve efeito letal [50].

Experiência realizada em ratos Buffalo, ambos os sexos e diversas idades, administrando-se DENA 0,0114% na ração, durante 26 semanas, demonstrou maior sensibilidade à droga, quanto ao sexo, nas fêmeas jovens, e, quanto à idade, nos animais com quatro semanas de idade vs. 12, 24 e 52 semanas. O padrão histológico das neoplasias hepáticas induzidas, em ordem de freqüência, foi carcinoma hepatocelular pouco diferenciado, carcinoma hepatocelular bem diferenciado, carcinoma indiferenciado, heman-gioendoteliossarcoma e colangiocarcinoma [40].

Já um outro estudo, utilizando ratos Wistar, ambos os sexos, com 4 e 20 semanas de idade, que beberam

constantemente dialquilnitrosamina em diversas concentrações, mostrou que a dose mínima carcinogênica, tanto de DENA como de DMNA, era de 132 ppm para os machos e 246 ppm para as fêmeas [46].

Ratos F-344 machos, pesando em média 170 g, após ingerir DENA, 0,55 mg/dia, durante 12 ou 23 semanas, desenvolveram carcinomas hepatocelulares pouco diferenciados, respectivamente, a partir da 16ª e da 20ª semanas, em 67% e 56% dos animais. Com DMNA, 0,4 mg/dia durante 24 semanas, foi induzido o mesmo tipo de tumor em 29% dos animais, a partir da 28ª semana [51].

A administração de DENA durante 10 semanas, 40 ppm na água de beber, a ratos F-344 machos com quatro semanas de idade, determinou carcinoma hepatocelular em 100% dos animais que sobreviveram por mais 10 semanas, e 40% destes apresentavam metástase pulmonar. Com a redução do tratamento para quatro semanas, seguida de 16 semanas de latência, só 13% dos animais apresentaram neoplasia hepática [52].

O mesmo protocolo experimental aplicado durante cinco semanas a ratos Fisher machos, pesando 100 a 130 g, determinou múltiplas neoplasias hepáticas em 55% dos animais, após 25 semanas de latência, e com a redução para três semanas de tratamento não houve desenvolvimento de neoplasias, mesmo prolongando o período de observação até 47 semanas [53].

Já 2 mg de DENA injetadas i.p., em ratos Donryu com 21 dias de idade, só determinaram carcinoma hepatocelular bem diferenciado em 40% dos animais após 48 semanas de latência vs. 0 após 36 semanas; quando administrada na água de beber na concentração de 0,01% durante uma semana, 100% dos animais desenvolveram múltiplas neoplasias hepáticas após 36 semanas [54].

Em ratos Wistar machos, com 28 dias de idade, a ingestão de DENA, 50 ppm na água de beber, durante duas semanas, não teve efeito hepatocarcinogênico no período de um ano [55]. Ratos F-344 machos, com seis semanas de idade, que receberam DENA, 25 ppm por via oral, durante 24 semanas, também não desenvolveram neoplasias hepáticas, porém apresentaram focos de hepatócitos fenotipicamente alterados [56]. Da mesma forma, uma dose única de DMNA 15 mg/kg p.c. por via intraperitoneal, injetada em ratos Wistar machos, pesando entre 120 e 140 g, não induziu neoplasias hepáticas num período de 16 meses [57].

A ingestão de DBNA 0,05% na água de beber, associada a antioxidantes na ração, BHT 0,7% ou BHA 2%, durante 16 semanas, determinou carcinomas hepatocelulares em ratos F-344 machos, com seis semanas de idade ao início do experimento [28].

Várias dialquilnitrosaminas administradas a ratos, por via oral, durante 30 semanas, mostraram um or-

ganotropismo diverso. Assim, a DMNA, 1,3 mmol, determinou tumores hepáticos, incluindo carcinomas hepatocelulares, hemangiossarcomas e colangiocarcinomas; já DENA, 0,5 mmol, induziu neoplasias do trato gastrointestinal alto, além das neoplasias hepáticas, e a DBNA, 2,0 mmol, desenvolveu tumores vesicais e pulmonares. Os períodos de latência, bem como a potência relativa, diferiam em cada caso, sendo respectivamente $DMNA < DENA < DBNA$ e $DENA > DMNA > DBNA$ [10].

Em outra experiência, a DBNA, 0,25%, 0,125% e 0,063%, administrada durante duas semanas, na água de beber, a ratos F-344 machos com seis semanas de idade, só não determinou hepatocarcinomas na menor dosagem. Lesões vesicais pré-neoplásicas - hiperplasia nodular/papilar - e neoplasias benignas - papilomas - foram mais frequentes com as doses mais elevadas. Já hiperplasia e papilomas induzidos no esôfago e estômago anterior não mostraram dose-dependência [49].

Em camundongos DBA, ambos os sexos, com 3 a 4 meses de idade, foi descrita a indução de hemangioendoteliossarcoma hepático, com metástase pulmonar, após 180 dias de administração oral diária de DENA, 13 mg/kg p.c. [37, 58].

Já em camundongos NMRI, com quatro semanas de idade, a ingestão de DENA, 0,007% (240 mg/kg), induziu, após 20 semanas, hemangioendoteliossarcomas hepáticos com metástase pulmonar, carcinomas hepatocelulares e carcinomas papilíferos primitivos de estômago anterior, pulmões e glândulas salivares [59].

Em camundongos machos de diversas linhagens, com oito semanas de idade, foi estudada a indução tumoral mediante dialquilnitrosaminas em diversas doses. A DMNA, 50, 100 e 200 ppm, foi administrada na dieta durante 5 ou 10 meses; a linhagem C3H mostrou-se mais sensível, desenvolvendo um maior número de neoplasias, em ordem de frequência: adenomas pulmonares, adenomas hepáticos, carcinomas hepatocelulares e cistoadenoma papilífero renal; a maior incidência foi de adenomas pulmonares em todas as linhagens, seguida de carcinomas pulmonares e hemangioendoteliossarcomas hepáticos nas linhagens ddN e ICR. Em dose elevada, a linhagem ddN desenvolveu também leucemias, seminomas e carcinoma renal, exibindo maior diversidade organotrópica, porém nesta experiência não foi referida a incidência natural de neoplasias nas linhagens ICR e ddN. Com DENA, 0,042 mg/ml, na água de beber, durante 5 ou 6,6 meses, as linhagens C3H e ICR desenvolveram adenomas hepáticos e papilomas no estômago anterior; novamente a linhagem C3H mostrou-se mais sensível à droga, porém a linhagem ICR teve maior diversidade organotrópica ao exibir

também adenomas pulmonares e hemangioendoteliossarcoma hepático [38].

Outras linhagens de camundongos, machos com dois meses de idade, que receberam dose única intragástrica de dialquilnitrosaminas, 60 mg/kg p.c., mostraram susceptibilidade e organotropismo diversos, num período de 10 meses de observação. A linhagem BTO desenvolveu lesões no estômago anterior, papilomas e carcinomas, em 8% dos animais tratados com DBNA e em 4% dos que receberam DENA; adenocarcinomas de cólon ou duodeno ocorreram em 18% dos camundongos C57Bl/60 tratados com DBNA; houve alta incidência de hepatomas na linhagem BTO, 18% com DBNA e 29% com DENA, mas só 9% com DBNA na linhagem C57Bl/60; camundongos BTO também desenvolveram adenomas pulmonares quando tratados com DENA, em 29% dos casos [42].

Mais três linhagens de camundongos, ambos os sexos com oito semanas de idade, tratados com DENA, 90 mg/kg p.c. por via intraperitoneal, desenvolveram tumores pulmonares e hepáticos, além de leucemia, após 24 semanas de latência. A linhagem AKR/J teve uma alta incidência de adenomas pulmonares, 24% vs. 0 no controle, já a linhagem C57Bl/60 desenvolveu maior número de hepatomas, 33% vs. 0 no controle; a linhagem SWR/J também desenvolveu neoplasias pulmonares hepáticas, e leucemia, porém não houve diferença significativa em relação ao controle [44].

Organotropismos pulmonar e hepático da DENA também foram registrados em camundongos ICR suíços, neonatos, que receberam uma única dose de DENA, 50 mg/kg p.c. por via subcutânea. Num período de até seis meses de observação, a maioria dos camundongos desenvolveu hepatomas, e a incidência de adenomas pulmonares aumentou para 80% vs. 4% no controle [60].

O efeito modificador de idade, sexo e linhagem na carcinogênese por DENA também foi demonstrado em camundongos híbridos de C57Bl/65xC3HeB/FeJ₁ (B6C3F₁) e C3HeB/FeJxA/JF₁ (C3AF₁). Cada animal recebeu quatro injeções i.p. de DENA, 1,5 ou 3,0 mg/kg p.c.; a primeira dose foi administrada nos animais com 1, 15 ou 42 dias de vida, e as doses subseqüentes com intervalos de 3, 6 e 9 dias. Os camundongos foram observados a vida toda, registrando-se, em ordem de frequência, tumores hepáticos, pulmonares e gástricos; predominavam no fígado os carcinomas hepatocelulares. Animais neonatos e jovens desenvolveram maior número de tumores hepáticos, v.s. animais adultos; as fêmeas v.s. os machos apresentaram tumores hepáticos mais tarde (B6C3₁) e com menor incidência (C3AF₁). Os híbridos B6C3F₁ vs. C3AF₁ desenvolveram maior número de carcinomas hepatocelulares, com taxa mais alta de

metástases pulmonares, porém os camundongos C3AF₁ tiveram maior incidência de neoplasias pulmonares, predominando os adenomas, bem como, do estômago anterior, papilomas e carcinomas; neste último órgão a incidência de neoplasias aumentou significativamente em função da dose de DENA [47]. Resumindo, camundongos machos, neonatos e jovens da linhagem B6C3F₁ apresentam condições mais favoráveis ao desenvolvimento de neoplasias hepáticas pela DENA, ao passo que a linhagem C3AF₁ é mais favorável ao desenvolvimento de neoplasias pulmonares e gástricas [47].

O efeito dose-dependente das dialquilnitrosaminas também foi estudado em camundongos RF machos, que foram observados a vida toda após uma única injeção i.p. de DMNA, 5, 10 e 15 mg/kg, e de DENA, 150 e 175 mg/kg. A DMNA, nas dosagens mais altas, aumentou a incidência de neoplasias pulmonares - adenomas e carcinomas papilíferos - mas não induziu neoplasias hepáticas. Já a DENA, em ambas as dosagens, determinou hepatomas, aumentou a incidência de neoplasias pulmonares - adenomas - e muito mais a de neoplasias gástricas - papilomas e carcinomas de células escamosas - e na dosagem mais alta foi registrada uma incidência de 55% de tumor de células de Leydig vs. 2% no controle [41].

A DMNA, 30 mg, administrada por via intraperitoneal a camundongos DDD, ambos os sexos, com 21 dias de idade, determinou adenomas pulmonares - 66,5% - e adenomas hepáticos - 33,5% - em 16 semanas de observação, sem registrar-se diferenças na incidência por sexo [45].

A diversa susceptibilidade ao efeito hepatocarcinogênico da DENA, dependente da linhagem, também foi demonstrada entre camundongos machos C57Bl/6Ncr (C57), C3H/HeNcr^{MTV} (C3H) e DBA/2Ncr (DBA), que com cinco semanas de idade foram injetados i.p. com DENA, 90 mg/kg p.c. A linhagem C3H desenvolveu adenomas hepáticos em menor período de latência, 24 semanas; às 36 semanas, período de latência das outras duas linhagens, a C3H apresentava maior percentual de incidência de adenomas, 50% vs. 10%; até às 52 semanas a multiplicidade de adenomas era também mais elevada na linhagem C3H, e esta foi a única a desenvolver carcinomas hepatocelulares [48].

Uma única injeção i.p. de DENA, 25 mg/kg p.c., em camundongos machos, BALB/c e B6C3F₁, com 15 dias de idade, demonstrou maior susceptibilidade por parte da linhagem B6C3F₁, que, em 28 semanas, desenvolveu múltiplos adenomas hepáticos em 100% dos animais vs. 66% nos BALB/c, e carcinomas hepatocelulares em 30% vs. 0 nos BALB/c [61].

A hepatocarcinogenicidade de diversas doses de DENA, 0,625, 1,25, 2,5 e 5 mg/kg p.c., administradas

uma única vez por via intraperitoneal a camundongos híbridos C57Bl/6JxC3HeFeJF₁ machos, com 15 dias de idade, foi determinada em função do período de sobrevivência determinado, 40 a 90 semanas. Independente da dose, todos os animais desenvolveram carcinomas hepatocelulares; contudo, o período de latência foi inversamente proporcional à dose, sendo em média 66 semanas com a dose mais baixa e 44 com a mais alta. A multiplicidade dos nódulos - carcinomas hepatocelulares - às 50 semanas foi dose-dependente [62]. O mesmo protocolo experimental, injeção i.p. de DENA, 5 mg/kg p.c., no mesmo modelo animal, determinou carcinomas hepatocelulares trabeculares após 44 semanas de latência [33].

Já a injeção i.p. de DENA, 80 mg/kg p.c., na mesma linhagem e sexo referidos acima, porém administrada aos camundongos com quatro semanas de idade, não induziu tumores hepatocelulares até os seis meses de observação, mas foi registrada uma baixa incidência de focos de hepatócitos fenotipicamente alterados [63].

A ingestão de DENA, 15 ou 45 ppm na água de beber, durante quatro semanas, em camundongos B6C3F₁ machos, com seis semanas de idade, determinou, após 44 semanas, múltiplos adenomas hepáticos e carcinomas hepatocelulares. Os percentuais de incidência foram dose-dependentes, respectivamente para cada tipo de tumor, 65% e 30% com a maior dosagem e 25% e 13% com a menor [61].

O fígado também tem sido referido como o principal órgão-alvo dos compostos N-nitrosos em cobaias. Dependendo do composto utilizado, foram descritos carcinomas hepatocelulares, hemangiossarcomas ou colangiocarcinomas [10]. Da mesma forma, foi registrada em cobaias a indução de carcinomas hepatocelulares, com metástases ganglionar e esplênica, após ingestão diária de DENA, 3 mg/kg p.c., totalizando 1.200 mg/kg p.c. [37].

Em cobaias machos, pesando 240 a 290 g, que receberam DENA por via oral, 1,1 a 4,2 mg/dia, durante um período de até 40 semanas, ocorreram carcinomas hepatocelulares a partir da 16ª semana; predominava nestes o padrão trabecular e houve metástase para omento, linfonodos, pulmões, rins e adrenais. Papilomas brônquicos e adenomas bronquiolares surgiram a partir da 44ª semana. Um adenocarcinoma vesical também foi referido, porém nesta experiência não foi determinada a incidência natural de neoplasia na espécie [35].

Já a administração intragástrica de DENA, 0,4 ml de solução 1:250, bi-semanal, durante 7 meses, em hamster sírio, ambos os sexos, com dois a três meses e meio de idade, determinou papilomas traqueais, em todos os animais, e uma alta incidência de carcinomas hepatocelulares, padrão trabecular, com múltiplas metástases, seguida de carcinomas indiferen-

ciados de cavidade nasal, lesões proliferativas renais e papilomas brônquicos. Ao mudar a via de inoculação para instilação intra-traqueal, 0,05 ml de solução de DENA 1:14, uma vez por semana, durante seis meses, todos os animais desenvolveram papilomas traqueais e foi alta também a incidência de papilomas brônquicos, seguida de neoplasias de cavidade nasal, porém não houve neoplasias hepáticas nem lesões renais [36].

Por via transplacentária, em hamster sírio dourado, a DENA 2 mg/dia, num total de uma a sete doses a partir do nono dia de gestação, determinou, nas crias, papiloma traqueal a partir da 8ª semana de vida, e na 25ª semana essas neoplasias eram múltiplas em 42% das crias; as mães também desenvolveram múltiplos papilomas traqueais em 73% dos casos, no mesmo período de observação [39].

A DENA administrada por via parenteral também mostrou organotropismo pelo trato respiratório em hamsters sírio e europeu, mas não no hamster chinês, onde a DENA por via subcutânea só afetou o trato gastrointestinal alto [5].

Em hamster sírio, tanto a DMNA, 0,2 mmol durante 20 semanas, como a DENA 0,5 mmol por 25 semanas, administradas por via oral na ração, induziram neoplasias hepáticas, sendo que a DENA mostrou maior potência tumorigênica, porém período de latência mais longo. Já a DBNA, 2,0 mmol durante 30 semanas, determinou neoplasias vesicais e pulmonares após longo período de latência [10].

Em gerbils de ambos os sexos, com 8 a 12 semanas de idade, injeções s.c. semanais de DENA, 6, 12 ou 24 mg/kg p.c., induziram uma alta incidência de carcinomas multifocais de cavidade nasal, 66% a 79%, dose-dependente. O padrão histológico predominante era carcinoma de grandes células, seguido do de pequenas células e do escamoso [64]. O mesmo protocolo induziu também carcinomas colangiocelulares e hepatocelulares, 22% a 85%, dose-dependentes, bem como papilomas do trato traqueobrônquico, adenomas e carcinomas pulmonares. De um modo geral, os machos foram mais susceptíveis à dialquilnitrosamina [43].

No mesmo modelo animal, porém só em machos, ao mudar-se o tratamento para injeção i.v. única de DENA, 50 ou 100 mg/kg p.c., a incidência de carcinomas multifocais de cavidade nasal aumentou para 89% e 100%, e a de carcinomas hepáticos diminuiu para 11% e 33% [43, 64].

Em outra experiência realizada em gerbils de ambos os sexos, administrando-se semanalmente DENA, 23 mg/kg p.c. por via subcutânea, houve maior organotropismo pelo trato respiratório nos machos; foram constatados adenocarcinomas de cavidade nasal, 95% vs. 63% nas fêmeas, e neoplasias pulmo-

nares, 20% vs. 5% nas fêmeas. Porém a alta incidência de colangiocarcinomas foi semelhante em ambos os sexos, 85% nos machos e 84% nas fêmeas [65].

A experimentação animal tem permitido estabelecer a carcinogenicidade de diversos agentes químicos, entre eles as dialquilnitrosaminas. A avaliação de carcinogenicidade envolve uma série de testes em diversas espécies animais, geralmente camundongo, rato e hamster. Os protocolos experimentais consistem em administração crônica do agente químico a animais jovens, por diversas vias, em diversas doses, a vida toda ou durante 18 a 24 meses, dependendo da espécie animal. Em geral, os sistemas animais predizem o que aconteceria no homem, exposto de uma determinada forma, na qual a dose e o tempo de exposição ao cancerígeno são elementos críticos. Portanto, o mecanismo envolvido na produção experimental de tumores deve sempre ser considerado, cuidadosamente, na interpretação do potencial cancerígeno de uma determinada substância química para o homem.

Contudo, além das numerosas evidências experimentais da carcinogenicidade das dialquilnitrosaminas aqui apresentadas, existem também dados epidemiológicos que permitem levantar hipóteses quanto à etiologia de determinadas neoplasias humanas. Assim, a alta incidência de câncer gástrico em determinadas populações (o Japão, por exemplo), e a queda dessa incidência nos japoneses e seus descendentes, após a migração para áreas com baixa frequência dessa neoplasia, como os EUA, têm sugerido a interferência de hábitos alimentares no desenvolvimento de câncer gástrico. Trata-se, provavelmente, da ingestão de nitratos/nitritos presentes na dieta, com geração subsequente de nitrosaminas *in vivo*. As nitrosaminas também parecem responsáveis pela alta incidência de câncer de esôfago, registrada na África, entre os indivíduos do povo banto, que costumam ingerir vegetais e bebidas ricas nestes compostos N-nitroso.

Key words: nitrosamine and cancer

Referências bibliográficas

1. REDDY BS, COHEN LA, McCOY GD, HILL P, WEISBURGER JH, WYNDER EL. Nutrition and its relationship to cancer. *Adv Cancer Res* 1980; 32: 237-345.
2. WEISBURGER JH, WILLIAMS GM. Etiology of cancer. *Chemical carcinogenesis*. In: HOLLAND JF, FREI III E. *Cancer Medicine*. Philadelphia: Lea & Febiger 1982: 42-95.
3. SCHMÄHL D, OSSWALD H. Carcinogenesis in different animals species by diethylnitrosamine. *Experientia* 1967; 23: 497-498.
4. WOGAN G. The induction of liver cell cancer by chemicals. In: CAMERON HM, LINSELL DA, WARWICK GP eds. *Liver Cell Can-*

- cer. Amsterdam: Elsevier 1976: 121-152.
5. IARC-WHO. N-nitrosodiethylamine. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans 1978; (17): 83-124.
 6. MARGISON GP, O'CONNOR PJ. Nucleic acid modification by N-nitroso compounds. In: GROVER PL, ed. Chemical Carcinogens and DNA. Vol I, 2nd ed., Boca Raton, Florida: CRC Press 1980: 111-159.
 7. UDASHIMA S. Overview: N-nitroso compounds as carcinogens for experimental animals and man. *Oncology* 1980; 37: 282-286.
 8. PURCHASE I FH. Inter-species comparisons of carcinogenicity. *Br J Cancer* 1980; 41: 454-A68.
 9. DE PAOLA D. Câncer e Meio Ambiente. Rio de Janeiro: Medsi 1985: 54.
 10. LIJINSKY W. Species differences in nitrosamine carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1984; 108: 46-55.
 11. CULVENOR CCJ, JAGO MV. Carcinogenic plant products and DNA. In: GROVER PL ed. Chemical Carcinogens and DNA. Vol I, 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press 1980: 161-186.
 12. Mc CORMICK A, NICHOLSON MJ, BAYLIS MA, UNDERWOOD JG. Nitrosamine in cigarette smoke condensate. *Nature* 1973; 244: 237-38.
 13. SELKIRK JK. Chemical carcinogenesis: a brief overview of the mechanism of action of polycyclic hydrocarbons, aromatic amines, nitrosamines, and aflatoxins. In: SLAGA TJ ed. Modifiers of Chemical Carcinogenesis. New York: Raven Press 1980: 1-31.
 14. WEISBURGER EK. Metabolism and activation of chemical carcinogens. *Molec Cell Biochem* 1980; 32: 95-104.
 15. MIRVISH SS, BULAYO O, RUNGE R, PATIL K. Study of the carcinogenicity of large doses of dimethylnitramine, N-nitroso-L-proline, and sodium nitrite administered in drinking water to rats. *JNCI* 1980; 64: 1435-1442.
 16. FINE DH, ROSS R, ROUNBEHLER DP, SILVERGLEID A, SONG L. Formation *in vivo* of volatile N-nitrosamines in man after ingestion of cooked bacon and spinach. *Nature* 1977; 265:753-75.
 17. ZEISEL SH, DA COSTA K. Increase in human exposure to methylamine precursors of N-nitrosamines after eating fish. *Cancer Res* 1986; 46: 6136-138.
 18. HEATH DF. The decomposition and toxicity of dialkyl nitrosamines in rats. *Biochem J* 1962; 85: 72-91.
 19. BRITTEBBO EB, LÖFBERG B, TJÄLVE H. Sites of metabolism of N-nitrosodiethylamine in mice. *Chem-Biol Interact* 1981; 34: 209-221.
 20. MAGEE PN, FARBER E. Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat-liver nucleic acids by dimethylnitrosamine *in vivo*. *Biochem J* 1962; 83: 114-124.
 21. MAGEE PN, HULTIN T. Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of proteins of rat-liver slices by dimethylnitrosamine *in vitro*. *Biochem J* 1962; 83: 106-114.
 22. MAGEE PN, LEE KY. Cellular injury and carcinogenesis. Alkylation of ribonucleic acid of rat liver by diethylnitrosamine and n-butylmethyl nitrosamine *in vivo*. *Biochem J* 1964; 91: 35-42.
 23. SWANN PF, MAGEE PN. Nitrosamine-induced carcinogenesis. The alkylation of N-7 of guanine of nucleic acids of the rat by diethylnitrosamine, N-ethyl-N-nitrosourea and ethyl-methanesulphonate. *Biochem J* 1971; 125: 841-847.
 24. CRADDOCK VM. Cell proliferation and experimental liver cancer. In: CAMERON HM, LINSELL DA, WARWICK GP, eds. Liver Cell Cancer. Amsterdam: Elsevier 1976: 153-201.
 25. WILLIAMS GM. The pathogenesis of rat liver cancer caused by chemical carcinogens. *Biochem Biophys Acta* 1980; 605: 167-189.
 26. RABES HM. Development and growth of early preneoplastic lesions induced in the liver by chemical carcinogens. *J Cancer Res Clin Oncol* 1983; 106: 85-92.
 27. PARTHASARATHY R, FRIDEY SM. Conformation of O⁶-alkylguanines: molecular mechanism of mutagenesis. *Carcinogenesis* 1986; 7: 221-227.
 28. FUNATO T, YOKOTA J, SAKAMOTO H et al. Activation of N-ras gene in a rat hepatocellular carcinoma induced by dibutyl nitrosamine and butylated hydroxytoluene. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 1987; 78: 689-94.
 29. FARBER E. The pathology of experimental liver cell cancer. In: CAMERON HM, LINSELL DA, WARWICK GP eds. Liver Cell Cancer. Amsterdam: Elsevier 1976: 243-277.
 30. RABES H, HARTENSTEIN R, SCHOLZE P. Specific stages of cellular response to homeostatic control during diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis. *Experientia* 1970; 26: 1356-1359.
 31. PITOT HC. The natural history of neoplasia. Newer insights into an old problem. *Am J Pathol* 1977; 89: 402-411.
 32. SOLT D, FARBER E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 1976; 263: 701-703.
 33. KOEN H, PUGH TD, GOLDFARB S. Hepatocarcinogenesis in the mouse. Combined morphologic-stereologic studies. *Am J Pathol* 1983; 112: 89-100.
 34. PERAINO C, CARNES BA, STEVENS FJ. Evidence for growth heterogeneity among foci with different phenotypes in the population of altered hepatocyte foci induced by a single neonatal treatment with carcinogen. *Carcinogenesis* 1986; 7: 191-192.
 35. ARGUS MF, HOCH-LIGETI C. Induction of malignant tumors in the guinea pig by oral administration of diethylnitrosamine. *JNCI* 1963; 30: 533-551.
 36. HERROLD KM, DUNHAM LJ. Induction of tumors in the syrian hamster with diethylnitrosamine (N-nitrosodiethylamine). *Cancer Res* 1963; 23: 773-777.
 37. THOMAS C, SCHMÄHL D. The morphology of diethylnitrosamine induced hepatic tumors in the mouse guinea pig. *Z Krebsforsch* 1963; 65: 531-536.
 38. TAKAYAMA S, OOTA K. Induction of malignant tumors in various strains of mice by oral administration of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine. *GANN* 1965; 56: 189-199.
 39. MOHR U, ALTHOFF J, AUTHALER A. Diaplacental effect of the carcinogen diethylnitrosamine in the golden hamster. *Cancer Res* 1966; 26: 2349-2352.
 40. REUBER MD, LEE CW. Effect of age and sex on hepatic lesions in Buffalo strain rats ingesting diethylnitrosamine. *JNCI* 1968; 41: 1133-1140.
 41. CLAPP NK. Carcinogenicity of nitrosamines and methane-sulphonate esters given intraperitoneally, in RF mice. *Int J Cancer* 1973; 12: 728-733.
 42. AKAMATSU Y. Carcinogenicity of N-nitrosodiethylamine (DEN), N-nitrosodi-N-butylamine (DBN), and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNG) in strains of mice: single intragastric treatment of 10 times maximum tolerated dose (MTD). *Proc Amer Ass Cancer Res* 1975; 16: 162.

43. HAAS H, KMOCH N, MOHR U. Susceptibility of gerbils (*Meriones unguiculatus*) to weekly subcutaneous and single intravenous injections of N-diethylnitrosamine. *Z Krebsforsch* 1975; 83: 233-238.
44. DIWAN BA, MEIER H. Carcinogenic effects of a single dose of diethylnitrosamine in three unrelated strains of mice: genetic dependence of the induced tumor types and incidence. *Cancer Lett* 1976; 1: 249-253.
45. UCHIDA E, HIRONO I. Effect of phenobarbital on induction of liver and lung tumors by dimethylnitrosamine in newborn mice. *GANN* 1979; 70: 639-644.
46. CRAMPTON RF. Carcinogenic dose-related response to nitrosamines. *Oncology* 1980; 37: 251-254.
47. VESSELINOVITCH SD, KOKA M, MIHAILOVICH N, RAO KVN. Carcinogenicity of diethylnitrosamine in newborn, infant, and adult mice. *J Cancer Res Clin Oncol* 1984; 108: 60-65.
48. DIWAN BA, RICE JM, OHSHIMA M, WARD JM. Interstrain differences in susceptibility to liver carcinogenesis initiated by N-nitrosodiethylamine and its promotion by phenobarbital in C57Bl/6Ncr, C3H/HeNcr^{MTV} and DBA/2Ncr. *Carcinogenesis* 1986; 7: 215-220.
49. TSUDA H, MERA Y, SEKI K, AOKI T, FUKUSHIMAS, ITO N. Induction of tumors in the liver, urinary bladder, esophagus and forestomach by short-term treatment with different doses of N,N'dibutylnitrosamine in rats. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 1987; 78: 227-234.
50. THOMAS C. Zur morphologie der durch Diäthylnitrosamin erzeugten Leberveränderungen und Tumoren bei der Ratte. *Z Krebsforsch* 1961; 64: 224-233.
51. SVOBODA D, HIGGINSON J. A comparison of ultrastructural changes in rat liver due to chemical carcinogens. *Cancer Res* 1968; 28: 1703-1733.
52. WEISBURGER JH, MADISON RM, WARD JM, VIGUERA C, WEISBURGER EK. Modification of diethylnitrosamine liver carcinogenesis with phenobarbital but not with immunosuppression. *JNCI* 1975; 54: 1185-1188.
53. MOCHIZUKI Y, FURUKAWA K, SAWADA N, GOTOH M. Dose-dependent enhancing effect of phenobarbital on hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine in the rat. *GANN* 1981; 72: 170-173.
54. KITAGAWA T, SUGANO H. Enhancing effect of phenobarbital on the development of enzyme-altered islands and hepatocellular carcinomas initiated by 3'-methyl-4-(dimethylamino)azobenzene or diethylnitrosamine. *GANN* 1978; 69: 679-687.
55. NISHIZUMI M. Effect of phenobarbital, dichlorodiphenyltrichloroethane, and polychlorinated biphenyls on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis. *GANN* 1979; 70: 835-837.
56. WILLIAMS GM, FURUYA K. Distinction between liver neoplasm promoting and syncarcinogenic effects demonstrated by exposure to phenobarbital or diethylnitrosamine either before or after N-2-fluorenylacetamide. *Carcinogenesis* 1984; 5: 171-174.
57. Mc LEAN AEM, SMITH M, DRIVER HE. Liver tumours after single dose dimethylnitrosamine, low and high protein diet, and phenobarbitone. *Carcinogenesis* 1982; 3: 701-709.
58. SCHMÄHL D, THOMAS C, KÖNIG K. Versuche zur Krebszeugung mit Diäthylnitrosamin by Mäusen. *Naturwissenschaften* 1963; 50: 407.
59. KUNZ W, SCHAUDE G, THOMAS C. The effect of phenobarbital and halogenated hydrocarbons on nitrosamine carcinogenesis. *Z Krebsforsch* 1969; 72: 291-304.
60. GARGUS JL, PAYNTER OE, REESE Jr WH. Utilization of newborn mice in the bioassay of chemical carcinogens. *Toxicol Appl Pharmacol* 1969; 15: 552-559.
61. PEREIRA MA, KLAUNIG JE, HERREN-FREUND SL, RUCH RJ. Effect of phenobarbital on the development of liver tumors in juvenile and adult mice. *JNCI* 1986; 77: 449-452.
62. VESSELINOVITCH SD. Infant mouse as a sensitive bioassay system for carcinogenicity of N-nitroso compounds. *IARC Sci Publ* 1980; (31): 645-655.
63. WARD JM, RICE JM, CREASIA D, LYNCH P, RIGGS C. Dissimilar patterns of promotion by di(2-ethylhexyl)phtalate and phenobarbital of hepatocellular neoplasia initiated by diethylnitrosamine in B6C3F₁ mice. *Carcinogenesis* 1983; 4: 1021-1029.
64. CARDESA A, POUR P, HAAS H, ALTHOFF J, MOHR U. Histogenesis of tumors from the nasal cavities induced by diethylnitrosamine. *Cancer* 1976; 37: 346-355.
65. GREEN U, KETKAR M. The influence of diazepam and thiouracil upon the carcinogenic effect of diethylnitrosamine in gerbils. *Z Krebsforsch* 1978; 92: 55-62.