

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CÂMPUS DE BOTUCATU

LESÕES HISTOLÓGICAS EM RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS
AO PROTOCOLO MODIFICADO DO BIOENSAIO DMBDD

MARIZE DE LOURDES MARZO SOLANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Botucatu - SP

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**LESÕES HISTOLÓGICAS EM RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS
AO PROTOCOLO MODIFICADO DO BIOENSAIO DMBDD**

Mestranda: MARIZE DE LOURDES MARZO SOLANO

Orientador: Dr. JOÃO LAURO VIANA DE CAMARGO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Botucatu - SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Solano, Marize de Lourdes Marzo.

Lesões histológicas em ratos Wistar submetidos ao protocolo
modificado do bioensaio DMBDD / Marize de Lourdes Marzo Solano.
– Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista, 2010.

Orientador: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo

Assunto CAPES: 40100006

1. Patologia. 2. Carcinogênese. 3. Rato.

Palavras chave: Bioensaio alternativo; Carcinogênese química;
Experiência brasileira; Iniciação-promoção; Ratos Wistar.

À Deus por ser infinitamente generoso e fiel, ser meu sustento, amparo e refúgio, além de mostrar que a força da fé consegue superar qualquer dificuldade.

Aos meus pais, José Carlos e Inez, por todo apoio e carinho imensuráveis durante todos esses anos.

Agradeço-te pai por acreditar em mim e trabalhar tanto para me ajudar a realizar meus sonhos.

Agradeço-te mãe pelo amor incondicional e pelo exemplo de dedicação e dignidade.

*Sei que merecem muito mais do que um dia poderei oferecer
e que minha dívida nunca hei de resolver,
mas por onde eu caminhar,
um pouquinho dos Marzo e Solano vou deixar
e assim seus nomes eternizar.*

Também aos meus irmãos Joseane e José Augusto, minha sobrinha Thiamat e meus cunhados Milena e Fábio, pelo amor e carinho sempre a mim dedicados.

Ao amor da minha vida, Fernando, por seu apoio, carinho, força e perseverança perante os obstáculos.

A todos por sempre estarem ao meu lado.

O meu muito obrigado!

Agradeço ao Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo pela motivação, dedicação, orientação e confiança depositadas em mim para a execução desse trabalho e por todas as oportunidades profissionais oferecidas.

Aos participantes do TOXICAN: Noeme Souza Rocha, Luis Fernando Barbisan, Carla Adriene da Silva Franchi, Ana Lúcia Fozzi Spinardi-Barbisan, Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira, Daisy Maria Fávero Salvadori e Lúcia Regina Ribeiro, que planejaram e executaram os cinco ensaios “in vivo” revisados na presente dissertação.

Aos técnicos de laboratório Paulo Roberto Cardoso e Maria Luísa Ardanz (Mara), Paulo César (PC) e secretário Marco Aurélio pelo processamento e confecção de todo o material utilizado nesses estudos revisados.

E aos estagiários e pós-graduandos daquele período, que nos ajudaram na execução dos estudos

Aos parceiros do Anexo João Luizutto, Tony, Merielen, Meire, Gisele, Renata, Suzane, Tânia e Vânia pela amizade, compreensão e principalmente pela colaboração, apoio nas horas difíceis e, sobretudo, pelos momentos de descontração.

À Dr^a. Carla Adriene da Silva Franchi, pela atenção, boa vontade, apoio, colaboração e sugestões durante o desenvolvimento de todo o trabalho.

Aos queridos amigos membros ou participantes da família FOXCAM: Cris, Shadia, Mitscheli, Bianca, Bruno, Alexandre, Gabrielli, Ana Paula e Viviane por todo carinho, amizade e convívio.

Ao professor Luis Fernando, ao amigo Marcus e a todos os colaboradores do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociência, pelos ensinamentos e amizade.

À professora Maria Aparecida Domingues e amigo o Marcos Roberto Franchi, pela imensurável ajuda e ensinamentos na área de imunohistoquímica, além de todos aos outros professores e funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, um muito obrigado à disponibilidade e apoio oferecidos.

Ao Grupo de Apoio à Pesquisa (GAPe) na pessoa de Liciane Vaz de Arruda Silveira pela ajuda na realização dos testes estatísticos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão de minha bolsa de mestrado (Processo nº 08/01684-2).

O meu muito obrigada a todos que de alguma maneira contribuíram para a minha formação!

Liberdade

*Essa palavra que o sonho humano
alimenta, que não há ninguém que
explique, mas ninguém que não
entenda.*

Clarice Lispector

Capítulo I

Revisão de literatura -----	01
Ensaio para detecção do potencial cancerígeno de substâncias químicas-----	01
a) Ensaio de longa duração-----	01
b) Linhagens de roedores utilizados em ensaios de carcinogenicidade-----	03
c) Ensaio de média duração em múltiplos órgãos-----	04
d) Ensaio DMBDD adotado no Brasil-----	06
Objetivo -----	10
Referências -----	11

Capítulo II

Manuscrito -----	18
Abstract -----	19
Resumo -----	20
1. Introdução -----	21
2. Materiais e métodos	
2.1 Animais e ambiente de experimentação -----	25
2.2 Agentes químicos-----	25
2.3 Delineamento experimental-----	26
2.4 Processamento e análise histológica-----	27
2.5 Processamento e análise imunohistoquímica-----	29
2.6 Análise estatística-----	31
3. Resultados	
3.1 Avaliação clínica-----	32
3.2 Peso corpóreo inicial, final e ganho de peso-----	32
3.3 Consumo de água e ração-----	33
3.4 Peso relativo de órgãos-----	34
3.5 Fígado- Lesões preneoplásicas e neoplásicas-----	34
3.6 Fígado- Lesões não neoplásicas-----	36
3.7 Fígado- Focos de hepatócitos alterados GST-P ⁺ -----	39
3.8 Fígado- Expressão imunohistoquímica de CYPs 2B1/2B2 e 1A2-----	40
3.9 Rins- Lesões preneoplásicas e neoplásicas-----	41
3.10 Rins- Lesões não neoplásicas-----	42
3.11 Intestinos-----	43
3.12 Incidência e frequência de preneoplasias e neoplasias-----	44
4. Discussão	
4.1 Aspectos gerais-----	46
4.2 Efeitos da iniciação nos órgãos estudados-----	47
4.3 Efeitos da promoção com FB-----	55
4.4 Efeitos da promoção com 2'-AAF-----	59
5. Considerações finais e conclusões -----	61
6. Referências -----	64
Tabelas -----	70
Figuras -----	88
Anexos -----	91

Tabela 1.	Peso corpóreo médio inicial e final e ganho de peso dos animais dos diferentes grupos ao final dos experimentos.-----	71
Tabela 2.	Consumo médio de água (ml/dia/animal) de ratos <i>Wistar</i> machos e fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD ^b .-----	72
Tabela 3.	Consumo médio de ração (g/dia/animal) de ratos <i>Wistar</i> machos e fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD ^b .-----	73
Tabela 4.	Peso médio relativo ² de órgãos de ratos <i>Wistar</i> machos e fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD ^b .-----	74
Tabela 5.	Incidência (%) de lesões hepáticas preneoplásicas e neoplásicas em ratos <i>Wistar</i> machos submetidos ao protocolo DMBDD ^b .-----	75
Tabela 6.	Incidência (%) de lesões hepáticas preneoplásicas e neoplásicas em ratos <i>Wistar</i> fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD ^b .-----	76
Tabela 7.	Incidência (%) de lesões hepáticas não neoplásicas em ratos <i>Wistar</i> machos submetidos ao protocolo DMBDD ^b .-----	77
Tabela 8.	Incidência (%) de lesões hepáticas não neoplásicas em ratos <i>Wistar</i> fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD ^b .-----	78
Tabela 9.	Número de focos ¹ GST-P ⁺ (por cm ²) e área agregada de focos (mm ² /cm ²) em fígado de ratos <i>Wistar</i> machos e fêmeas iniciados para carcinogênese pelo protocolo DMBDD ^b .-----	79
Tabela 10.	Imunohistoquímica hepática para CYP 2B1/2B2 em ratos <i>Wistar</i> submetidos ao protocolo DMBDD ^b .-----	80
Tabela 11.	Imunohistoquímica hepática para CYP 1A2 em ratos <i>Wistar</i> submetidos ao protocolo DMBDD ^b .-----	81
Tabela 12.	Incidência (%) de lesões renais preneoplásicas e neoplásicas em ratos <i>Wistar</i> machos submetidos ao protocolo DMBDD ^b .----	82
Tabela 13.	Incidência (%) de lesões renais preneoplásicas e neoplásicas em ratos <i>Wistar</i> fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD ^b .----	82
Tabela 14.	Incidência (%) de lesões renais não neoplásicas em ratos <i>Wistar</i> machos submetidos ao protocolo DMBDD ^b .-----	83
Tabela 15.	Incidência (%) de lesões renais não neoplásicas em ratos <i>Wistar</i> fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD ^b .-----	83
Tabela 16.	Incidência (%) de lesões intestinais em ratos <i>Wistar</i> machos submetidos ao protocolo DMBDD ^b .-----	84
Tabela 17.	Incidência (%) de lesões intestinais em ratos <i>Wistar</i> fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD ^b .-----	85
Tabela 18.	Incidência ¹ (%) e frequência de neoplasias e preneoplasias em fígado, rins e intestinos de ratos <i>Wistar</i> machos submetidos ao protocolo DMBDD ^b .-----	86
Tabela 19.	Incidência ¹ (%) e frequência de neoplasias e preneoplasias em fígado, rins e intestinos de ratos <i>Wistar</i> fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD ^b .-----	87

Figura 1.	Delineamento experimental.-----	88
Figura 2.	Evolução do peso corpóreo médio de ratos <i>Wistar</i> machos e fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD ^b .-----	88
Figura 3.	Isoformas de CYP 2B1/2B2 e 1A2 (Imunohistoquímica, 200X)-	89
Figura 4.	Tumor mesenquimal renal, invadindo medula renal, com envolvimento e compressão tubular. 200X.-----	90

Anexo 1.	Número de focos GST-P ⁺ (por cm ²) em ratos <i>Wistar</i> machos submetidos ao protocolo DMBDD ^b -----	91
Anexo 2.	Número de focos GST-P ⁺ (por cm ²) em ratos <i>Wistar</i> fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD ^b -----	91
Anexo 3.	Área agregada de focos GST-P ⁺ (mm ² /cm ²) em ratos <i>Wistar</i> machos submetidos ao protocolo DMBDD ^b -----	92
Anexo 4.	Área agregada de focos GST-P ⁺ (mm ² /cm ²) em ratos <i>Wistar</i> fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD ^b -----	92

Ensaio para detecção do potencial cancerígeno de substâncias químicas

a) Ensaio de longa duração

Atualmente, as mais importantes fontes de evidência sobre o potencial cancerígeno de agentes químicos são os estudos epidemiológicos e os com animais de experimentação. Os primeiros estudos são complexos do ponto de vista operacional, e algo limitados em suas conclusões, devido a dificuldades de caracterização dos níveis reais de exposição, a complexidade das exposições humanas, que em geral ocorrem a partir de diferentes fontes, e a latência muito longa dos cânceres antes de se manifestarem clinicamente. Durante esse período de latência, os indivíduos expostos sofrem inúmeros processos (infecciosos, nutricionais, etc) que podem interferir na carcinogênese. Por este motivo, e devido ao maior controle sobre as variáveis em questão, os estudos com animais de experimentação permitem evidenciar melhor a possível relação causal entre determinada exposição e o desenvolvimento do câncer. Além disso, têm como vantagem sobre os estudos epidemiológicos o caráter prospectivo, ou seja, permitem definir o potencial cancerígeno de um agente antes que populações humanas sejam expostas a eles (1, 2).

O ensaio convencional adotado globalmente para identificar substâncias cancerígenas é o teste de longa-duração com roedores (TLD), proposto no início da década de 1960 pelo Instituto Nacional do Câncer norte-americano (3). Desde o seu delineamento até o relatório final, o teste tem duração de cerca de cinco anos, envolve no mínimo 600 animais, que representam os dois gêneros de duas espécies de roedores expostos à três doses da substância-teste, além dos respectivos grupos controle (4-6). Substâncias que induzem

incidência maior de câncer nos animais tratados, quando comparados aos respectivos controles, são consideradas cancerígenas quando exercem este efeito em uma ou mais espécies ou em dois ou mais estudos independentes com uma mesma espécie, desenvolvidos em momentos diferentes ou em diferentes laboratórios, ou com diferentes protocolos. Dentro dos limites de possível extrapolação entre as espécies, considera-se que essas substâncias apresentam risco cancerígeno para o homem (7).

Apesar de universalmente adotado, o TLD apresenta várias desvantagens, pois demanda longo período de execução, além de processos operacionais complexos e do alto custo. No momento, nenhum país da América Latina tem condições adequadas para executar o TLD em rotina, devido à inexistência de infra-estrutura de biotérios e de profissionais qualificados (1). Além disso, a concepção deste ensaio tem limitações conceituais que impõem limites à interpretação de seus resultados. Por exemplo, não considera as múltiplas etapas da carcinogênese química (iniciação, promoção e progressão) e não permite prévio conhecimento dos órgãos-alvo que eventualmente desenvolverão neoplasias. Também, existem controvérsias quanto ao uso da Dose Máxima Tolerada (DMT) como o maior nível de dose a ser testada, pois várias substâncias identificadas como cancerígenas pelo TLD poderiam não ser assim classificadas se doses menores fossem adotadas (2, 8, 9).

b) Linhagens de roedores utilizados em ensaios de carcinogenicidade

Características genéticas de roedores definem as linhagens como de maior ou menor sensibilidade para o desenvolvimento de neoplasias espontâneas ou induzidas. Nos estudos de carcinogênese química, as linhagens mais utilizadas de *Ratus norvegicus* são a *Fischer 344*, a *Sprague-Dawley* e a *Wistar*. Essas linhagens são classificadas de acordo com suas características genéticas em isogênicas (geneticamente idênticos), como o *Fischer 344*, e não-isogênicas (características uniformes, mas geneticamente heterogêneas) como *Sprague-Dawley* e *Wistar* (10). Ratos de linhagem isogênica constituem um grupo homogêneo de animais, útil para comparar grupos experimentais submetidos a diferentes agentes exógenos, já que apresentam baixa variabilidade de resposta entre si (11). No entanto, muitos toxicologistas preferem linhagens não-isogênicas por melhor representarem a variabilidade humana (10, 12). Assim, dependendo do objetivo do estudo, tem sido adotado um ou outro tipo de linhagem.

Atualmente, a preocupação internacional com o melhor modelo animal para estudos de carcinogenicidade têm sido alvo de intenso debate. Num workshop do Programa Nacional de Toxicologia (NTP – USA), discussões de membros da academia, indústria, governo e setor privado sugeriram que o NTP explore melhor o uso de múltiplas linhagens, apesar das várias questões sobre interpretação de dados e praticidade. E ainda, dar ênfase ao uso de linhagens de rato de “alta preditividade” ao invés de “alta sensibilidade” (13).

c) Ensaio de média duração em múltiplos órgãos

Procurando superar as limitações do TLD, e aproveitando o crescimento progressivo do conhecimento dos fenômenos celulares e moleculares envolvidos na carcinogênese, vários ensaios alternativos/complementares *in vivo*, ou bioensaios, foram propostos durante as décadas de 1980 e 1990 para a detecção do potencial cancerígeno de agentes químicos (14-16). Em geral, esses bioensaios caracterizam-se por serem mais rápidos, econômicos, e mais informativos que o TLD. Dentre eles destacam-se os ensaios de média-duração, desenvolvidos inicialmente para identificar cancerígenos em períodos relativamente curtos. Esses modelos de média-duração são representados principalmente pelos “protocolos de iniciação-promoção”, “protocolos com animais recém-nascidos” e “protocolos com animais geneticamente modificados”, que estão adequadamente apresentados na literatura (3, 14, 17, 18).

Baseado no paradigma da iniciação-promoção da carcinogênese, o ensaio multi-órgãos de média duração desenvolvido por pesquisadores japoneses foi inicialmente estabelecido com ratos machos da linhagem isogênica *Fischer 344* (19-23). A iniciação é a etapa inicial da carcinogênese química, provocada pela exposição a um agente genotóxico, e caracterizada por alterações estruturais do genoma, que são “fixadas” de modo irreversível no DNA das células alvo após pelo menos um ciclo de proliferação celular. A etapa da promoção, por sua vez, envolve a seleção e proliferação clonal das células iniciadas e sua evolução para neoplasia; é um processo reversível que depende da ação prévia do agente iniciador assim como da dose e do intervalo entre as exposições à substância promotora (16, 24-26). Assim, o bioensaio

multi-órgãos de média duração consiste dessas duas etapas sucessivas: a iniciação é feita pelo tratamento com cinco agentes genotóxicos, que estabelecem a iniciação da carcinogênese em vários órgãos, e a promoção, na pela exposição à substância-teste a fim de avaliar seu potencial promotor (14, 20, 22, 23, 27).

Os agentes iniciadores usados neste bioensaio são a dietilnitrosamina (DEN), a N-metil-N-nitrosurea (MNU), a butil-N(4-hidroxiutil)nitrosamina (BBN), a dihidroxi-di-N-propilnitrosamina (DHPN), e a dimetilhidrazina (DMH), o que o levou a ser também denominado DMBDD, devido as iniciais destas substâncias. Outro sinônimo para o ensaio é “teste de carcinogênese em múltiplos órgãos”, pois vários são os órgãos-alvo iniciados por esse protocolo: fígado e rins (ação da DEN); estômago, glândula mamária, bexiga urinária e tireóide (MNU); trato intestinal (DMH); pulmão, tireóide e rins (DHPN) e bexiga urinária (BBN) (9). Devido à variedade de órgãos iniciados, há vários parâmetros qualitativos e quantitativos para avaliação da positividade da substância-teste, incluindo lesões com caráter preneoplásico, como as hiperplasias e displasias. O uso de lesões preneoplásicas como parâmetro permite que a duração do ensaio seja de 25 semanas, bem menor que a do estudo convencional de longa duração, que é de dois anos. Assim, o ensaio DMBDD apresenta as vantagens de menor duração, o uso de um só gênero de uma única espécie de roedor (rato *Fischer* 344 macho), resultados mais rápidos a um custo menor, e a possibilidade de estudos sobre o modo de ação/mecanismo de carcinogênese da substância testada (1, 2, 9, 14). Este

ensaio (DMBDD) também pode ser útil em estudos dose-resposta, com alta sensibilidade à baixas doses (9).

Além do custo-benefício favorável, os resultados do ensaio DMBDD têm mostrado boa correlação com o teste de longa duração (23, 27, 28), apresentando resultados relevantes e que validam o seu uso. Em 1997, a International Conference on the Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Humans Use, ou International Conference on Harmonization (IHC), recomendou esse ensaio a fim de compor o dossiê para licenciamento de medicamentos (29). Na mesma linha, em 1999, a Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC) também reconheceu que os testes alternativos, como o DMBDD, eram apropriados para identificar cancerígenos químicos em roedores (14).

d) Ensaio DMBDD adotado no Brasil

Desde 1996, uma modificação protocolar do bioensaio DMBDD foi proposta pelo Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena (TOXICAN) e adotada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (30) como método válido para evidenciar a carcinogenicidade de praguicidas agrícolas (30). As modificações propostas pelo protocolo DMBDD brasileiro (DMBDD^b) são o uso de ambos os gêneros da linhagem de ratos *Wistar* como sistema experimental, a duração de 30 semanas e dois grupos controle positivo, um tratado com fenobarbital (FB, cancerígeno não-genotóxico, que tem particularmente o fígado como órgão alvo) e outro com o 2'-acetoaminofluoreno (2'-AAF, cancerígeno genotóxico com vários órgãos-alvo). A linhagem de ratos *Wistar* foi escolhida devido à

facilidade de aquisição desses animais no país e também pela resistência relativa que eles apresentam ao desenvolvimento de neoplasias espontâneas (1, 2).

O TOXICAN, na Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista (UNESP), foi pioneiro no país em executar o ensaio DMBDD^b. Durante o período de 1996-2001, este laboratório desenvolveu estudos para padronização desse ensaio em ratos *Wistar* e, desse modo, procurou obter o maior número de informações possíveis sobre ele, a fim de torná-lo cada vez mais confiável (2, 31-34).

Além disso, naquele período foram desenvolvidos cinco desses bioensaios, sob contrato com empresas do setor agroquímico do Brasil, para testar o potencial cancerígeno promotor de praguicidas (35). Esses estudos foram desenvolvidos em regime de Boas Práticas de Laboratório (BPL) e têm todos seus dados brutos, blocos de parafina, lâminas histológicas e relatórios originais adequadamente arquivados. Este material constitui uma fonte muito rica de informações sobre as alterações provocadas pelo protocolo DMBDD em ratos da linhagem *Wistar*. Naturalmente, as informações sobre os efeitos dos produtos testados não podem ser divulgadas por estarem restritas por contrato, mas a análise dos efeitos das substâncias controle positivo da iniciação (FB e 2'-AAF) pode contribuir de modo relevante para maior conhecimento do protocolo DMBDD^b e, eventualmente, para sua validação. Portanto, uma eventual análise deste material impedirá que se desperdice o grande investimento material e humano realizado nesses estudos.

Sob esta perspectiva, duas iniciativas anteriores procuraram consolidar as informações contidas nos relatórios originais dos ensaios realizados pelo TOXICAN. Rocha (1998) reuniu as informações sobre todos os órgãos obtidos por necrópsia completa dos dois primeiros ensaios (36). de Camargo et al. (1999) procuraram consolidar as informações morfológicas mais relevantes de quatro daqueles ensaios (37). O presente trabalho caracteriza-se pela revisão histológica de três órgãos – o fígado, rins e intestinos – dos animais dos cinco estudos realizados até 2001. Esses órgãos foram escolhidos porque apresentaram maior incidência de lesões naqueles ensaios. Deve ser destacado que os dois primeiros são os sítios mais freqüentemente comprometidos por nos ensaios de longa-duração realizados pelo NTP norte-americano (5).

A capacidade indutora enzimática dos agentes químicos utilizados no protocolo DMBDD^b foi avaliada pela expressão hepática das isoformas 2B1/2B2 e 1A2 do citocromo P450 no presente estudo. Caracteristicamente, o sistema P450 pode ser induzido por milhares de estruturas químicas diferentes, tornando-o adaptado ao ambiente. Alterações nessas enzimas são importantes na promoção de tumores por substâncias cito e genotóxicas (38). Assim, as isoformas CYP 1A2 e 2B1/2B2 foram escolhidas porque apresentaram, em outros trabalhos, aumento da expressão e atividade enzimática após administração de 2'-AAF ou FB a ratos, respectivamente (9, 39-44). A indução dessas proteínas por xenobióticos não ocorre em todo o ácino hepático, mas geralmente é restrita a algumas porções do fígado. O conhecimento dos mecanismos envolvidos pode ser importante, já que muitas dessas substâncias geram intermediários potencialmente tóxicos que caracteristicamente causam

danos hepáticos em regiões específicas através da ativação de diferentes isoenzimas P450 (45). Por esses motivos, a análise da intensidade dessas enzimas foi realizada pela identificação imunohistoquímica da área hepática acometida.

Para complementar e enriquecer esse estudo, foi analisado o desenvolvimento de focos de hepatócitos que expressam a enzima glutathione S-transferase, forma placentária (GST-P). A marcação GST-P é utilizada como importante parâmetro para análise dos processos de carcinogênese química no fígado de roedores (9, 46, 47).

Eventualmente, o padrão de expressão destas enzimas induzidas em hepatócitos no ensaio DMBDD^b também pode constituir um painel contra o qual serão confrontadas substâncias que vierem a ser testadas em ensaios futuros, contribuindo de modo decisivo para a caracterização e validação do bioensaio DMBDD^b. No conjunto, além da evidente contribuição fornecida para o conhecimento das respostas da linhagem *Wistar* aos tratamentos do protocolo DMBDD^b, esta revisão tem a vantagem de evitar a realização de novos estudos exploratórios do modelo, o que levaria ao sacrifício de centenas de animais de experimentação.

O objetivo do presente estudo foi utilizar a experiência de cinco anos (1996-2001) com o protocolo DMBDD^b no TOXICAN, revisando as lesões histológicas induzidas no *fígado, rins e intestinos* em ambos os gêneros de ratos *Wistar* pelo processo de iniciação DMBDD e promoção com fenobarbital ou 2'-acetoaminofluoreno e, desse modo, gerar visão crítica e de conjunto do ensaio DMBDD^b em ratos *Wistar*.

Essa é uma contribuição para o estabelecimento e validação do bioensaio DMBDD em uma linhagem de roedor diferente daquela em que o bioensaio foi estabelecido originalmente.

1. Salvadori DM, Rocha NS, Ribeiro LR, de Camargo JL. A detecção de substâncias cancerígenas em bioensaios alternativos de média-duração. *Acta Toxicologica Argentina*. 1997;5(2):75-6.
2. de Camargo JL, Salvadori DM, Rocha NS, Barbisan LF, Ribeiro LR. The detection of chemical carcinogens in an alternative medium-term bioassay. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*. 1999;51(1):22-6.
3. Slamenová D. Contemporary trends in in vivo and in vitro testing of chemical carcinogens. *Neoplasma*. 2001;48(6):425-34.
4. Gart JJ, Krewski D, Lee PN, Tarone RE, Wahrendorf J. Statistical methods in cancer research. Volume III--The design and analysis of long-term animal experiments. *IARC Sci Publ*. 1986(79):1-219.
5. Huff J, Cirvello J, Haseman J, Bucher J. Chemicals associated with site-specific neoplasia in 1394 long-term carcinogenesis experiments in laboratory rodents. *Environ Health Perspect*. 1991 Jun;93:247-70.
6. Huff J, Haseman J, Rall D. Scientific concepts, value, and significance of chemical carcinogenesis studies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1991;31:621-52.
7. IARC International Agency for Research on Cancer -. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. *IARC Sci Publ*. 2006;Preambles.
8. de Camargo JL. Medium-term protocols for in vivo evaluation of chemical modifiers of carcinogenesis. *Mem Instituto Oswaldo Cruz*. 1991;86(II):47-50.
9. Fukushima S, Morimura K, Wanibuchi H, Kinoshita A, Salim EI. Current and emerging challenges in toxicopathology: carcinogenic threshold of phenobarbital and proof of arsenic carcinogenicity using rat medium-term

bioassays for carcinogens. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 Sep 1;207(2 Suppl):225-9.

10. Festing MF. Use of a multistrain assay could improve the NTP carcinogenesis bioassay. *Environ Health Perspect.* 1995 Jan;103(1):44-52.

11. Festing MF. Fat rats and carcinogenesis screening. *Nature.* 1997 Jul 24;388(6640):321-2.

12. Abramovici A, Wolman M. Inbred strains of laboratory animals: superior to outbred mice? *J Natl Cancer Inst.* 1995 Jun 21;87(12):933.

13. King-Herbert A, Thayer K. NTP workshop: animal models for the NTP rodent cancer bioassay: stocks and strains--should we switch? *Toxicol Pathol.* 2006;34(6):802-5.

14. IARC International Agency for Research on Cancer -. The use of short- and medium-term tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation. *IARC Sci Publ.* 1999;83.

15. Swanson GM. Cancer prevention in the workplace and natural environment. A review of etiology, research design, and methods of risk reduction. *Cancer.* 1988 Oct 15;62(8 Suppl):1725-46.

16. Westein IB. The origins of human cancer: molecular mechanism of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. *Cancer Res.* [Twenty seventh G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture.]. 1988;48:4135-43.

17. Cohen SM. Alternative models for carcinogenicity testing: weight of evidence evaluations across models. *Toxicol Pathol.* 2001;29 Suppl:183-90.

18. Robinson DE, McDonald JS. Background and framework for ILSI's collaborative evaluation program on alternative models for carcinogenicity assessment. *Toxicologic Pathology*. 2001;29:13-9.
19. Hagiwara A, Tiwawech D, Imaida K, Tamano S, Shibata MA, Fukushima S, et al. Modifying influence of prior treatment with toxic agents on induction of preneoplastic and neoplastic lesions in a medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay. *Teratog Carcinog Mutagen*. 1993;13(6):277-87.
20. Hasegawa R, Tanaka H, Tamano S, Shirai T, Nagao M, Sugimura T, et al. Synergistic enhancement of small and large intestinal carcinogenesis by combined treatment of rats with five heterocyclic amines in a medium-term multi-organ bioassay. *Carcinogenesis*. 1994 Nov;15(11):2567-73.
21. IARC International Agency for Research on Cancer -. Long-term and short-term assays for carcinogens: a critical appraisal. *IARC Sci Publ*. 1986;146.
22. Ito N, Hasegawa R, Imaida K, Hirose M, Shirai T. Medium-term liver and multi-organ carcinogenesis bioassays for carcinogens and chemopreventive agents. *Exp Toxicol Pathol*. 1996 Feb;48(2-3):113-9.
23. Ito N, Imaida K. Strategy of research for cancer--chemoprevention. *Teratog Carcinog Mutagen*. 1992;12(2):79-95.
24. Farber E. Cancer development and its natural history. A cancer prevention perspective. *Cancer*. 1988 Oct 15;62(8 Suppl):1676-9.
25. Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*. 1993 Aug 1;72(3 Suppl):962-70.
26. Pitot HC. Progression: the terminal stage in carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res*. 1989 Jul;80(7):599-607.

27. 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 Mar;84(3):237-45.
28. Shirai T, Hirose M, Ito N. Medium-term bioassays in rats for rapid detection of the carcinogenic potential of chemicals. *IARC Sci Publ.* 1999(146):251-72.
29. ICH International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use -. Harmonized guideline. Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals: CPMP/ICH; 1997. p. 95.
30. IBAMA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis -. Portaria Normativa N 84 de 25 de outubro de 1996. *Diário Oficial da União*; 1996. p. 21358-66.
31. da Silva Franchi CA. Thymic lymphomas in Wistar rats exposed to N-methyl-N-nitrosourea (MNU). *Cancer Science.* 2003;94(3):240-3.
32. Moreira EL, de Camargo JL, Rodrigues MA, Barbisan LF, Salvadori DM. Dose- and sex-related carcinogenesis by N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine in Wistar rats. *Jpn J Cancer Res.* 2000 Apr;91(4):368-74.
33. Rodrigues MA, Silva LAG, Salvadori DM, de Camargo JL, Montenegro MR. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2002;35:351-5.

34. Spinardi AL, Kaneno R, Rodrigues MA, Salvadori DM, Rocha NS, Barbisan LF, et al. Natural killer activity in a medium-term multi-organ bioassay for carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res.* 1999 Jan;90(1):101-7.
35. de Camargo JL. The Brazilian experience with the medium-term multi-organ bioassay: scientific and regulatory developments. Simpósio: "Aim for establishing risk assessment of carcinogenesis - application of medium-term carcinogenesis bioassay system"; Nagoya, Japan: Anais: DIMS Institute of Medical Science Inc.; 2007. p. 119p.
36. Rocha NS. Padronização morfológica de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas em *Rattus norvegicus* (Wistar) submetidos ao protocolo de carcinogênese de média duração em múltiplos órgãos. Botucatu: Faculdade de Medicina, UNESP; 1998.
37. de Camargo JL, Salvadori DM, Rocha NS, Barbisan LF, Ribeiro LR. The Brazilian experience with the alternative initiated rat bioassay for carcinogenesis using a local Wistar rat strain. 4Th Congress of Toxicology in Developing Countries pp 258; Antalya1999.
38. Chen ZY, Eaton DL. Differential regulation of cytochrome(s) P450 2B1/2 by phenobarbital in hepatic hyperplastic nodules induced by aflatoxin B1 or diethylnitrosamine plus 2-acetylaminofluorene in male F344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991 Oct;111(1):132-44.
39. Burt RK, Thorgeirsson SS. Coinduction of MDR-1 multidrug-resistance and cytochrome P-450 genes in rat liver by xenobiotics. *J Natl Cancer Inst.* 1988 Nov 2;80(17):1383-6.
40. Hagiwara A, Matsuda T, Tamano S, Kitano M, Imaoka S, Funae Y, et al. Dose-related increases in quantitative values for altered hepatocytic foci and

cytochrome P-450 levels in the livers of rats exposed to phenobarbital in a medium-term bioassay. *Cancer Lett.* 1996 Dec 20;110(1-2):155-62.

41. Martignoni M, de Kanter R, Grossi P, Mahnke A, Saturno G, Monshouwer M. An in vivo and in vitro comparison of CYP induction in rat liver and intestine using slices and quantitative RT-PCR. *Chem Biol Interact.* 2004 Dec 30;151(1):1-11.

42. Nims RW, Devor DE, Henneman JR, Lubet RA. Induction of alkoxyresorufin O-dealkylases, epoxide hydrolase, and liver weight gain: correlation with liver tumor-promoting potential in a series of barbiturates. *Carcinogenesis.* 1987 Jan;8(1):67-71.

43. Parkinson A. Biotransformation of xenobiotics. In: Klassen CD, editor. *Cassarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons.* McGraw-Hill: Medical Publishing Division; 2001. p. 133-224.

44. Tateishi T, Nakura H, Asoh M, Watanabe M, Tanaka M, Kumai T, et al. Multiple cytochrome P-450 subfamilies are co-induced with P-glycoprotein by both phenothiazine and 2-acetylaminofluorene in rats. *Cancer Lett.* 1999 Apr 26;138(1-2):73-9.

45. Buhler R, Lindros KO, Nordling A, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Zonation of cytochrome P450 isozyme expression and induction in rat liver. *Eur J Biochem.* 1992 Feb 15;204(1):407-12.

46. Moore MA, Tsuda H, Tamano S, Hagiwara A, Imaida K, Shirai T, et al. Marriage of a medium-term liver model to surrogate markers-a practical approach for risk and benefit assessment. *Toxicol Pathol.* 1999 Mar-Apr;27(2):237-42.

47. Satoh K, Kitahara A, Soma Y, Inaba Y, Hatayama I, Sato K. Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase: a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Jun;82(12):3964-8.

**LESÕES HISTOLÓGICAS EM RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS AO
PROTOCOLO MODIFICADO DO BIOENSAIO DMBDD**

**HISTOLOGICAL LESIONS IN WISTAR RATS SUBMITTED TO THE
MODIFIED DMBDD BIOASSAY**

Brazilian DMBDD assay with *Wistar* rats

Solano, Marize de Lourdes Marzo^a; Rocha, Noeme Souza^b; Barbisan, Luis
Fernando^c; Franchi, Carla Adriene da Silva^a; Spinardi-Barbisan, Ana Lúcia
Tozzi^a; de Oliveira, Maria Luiza Cotrim Sartor^a; Salvadori, Daisy Maria Fávero^a;
Ribeiro, Lúcia Regina^a; de Camargo, João Lauro Viana^a.

^aDepartamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu/SP,
Brasil.

^bDepartamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia, UNESP, Botucatu/SP, Brasil.

^cDepartamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu/SP,
Brasil.

Correspondence: João Lauro Viana de Camargo

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Botucatu, 18618-000, SP, Brasil.

Telefone: 55-14-38828255 - Fax: 55-14- 3815-2348

E-mail: decam@fmb.unesp.br

*De acordo com as normas da revista International Journal of Experimental Pathology.

Abstract

A medium-term multi-organ rat bioassay based on the initiation-promotion carcinogenesis paradigm has been proposed by Japanese researchers as an alternative to the conventional long-term assay for chemical carcinogenesis detection. This alternative bioassay, designated DMBDD (after the five carcinogenic initiators of this protocol), was originally standardized with the male *Fischer* 344 strain of rats. In 1996, the Brazilian Agency for the Environment (IBAMA) officially recognized a variation (DMBDD^b), proposed by our laboratory, as a valid source of evidence of the carcinogenic potential of agrochemicals. The protocol adopted by IBAMA has some modifications, such as the use of both sexes of the *Wistar* strain of rats and two positive controls (Phenobarbital – PB, 2'-acetoaminofluorene - 2'-AAF). During six years, five different bioassays managed under contract with agrochemical companies were developed by our laboratory (TOXICAN). This study presents the revised results obtained from three organs of this protocol – liver, kidney and intestines –, chosen because they most frequently presented lesions through those assays analyses. Besides, the induction of the CYP 2B1/2B2, 1A2 isoforms was also immunohistochemically evaluated in the liver. Our results document the promoting activity of PB, otherwise less evident than 2'-AAF, especially in male rats. Although a high variability of the *Wistar* rat strain tested was evident, this study allowed building up a data bank of characteristic lesions in those selected organs of *Wistar* rats under the DMBDD^b protocol treatment.

Key-words: chemical carcinogenesis, initiation-promotion, DMBDD alternative bioassay, *Wistar* rats, Brazilian experience.

Resumo

Um ensaio de média-duração em múltiplos órgãos de roedores, baseado no paradigma iniciação-promoção da carcinogênese, foi proposto por pesquisadores japoneses como alternativa ao ensaio convencional de longa-duração para detecção de cancerígenos químicos. Esse ensaio alternativo, denominado DMBDD (acrônimo para os 5 agentes iniciadores da carcinogênese neste protocolo), foi originalmente padronizado com a linhagem de ratos *Fischer* 344. Em 1996, o IBAMA adotou oficialmente uma variação (DMBDD^b), proposta por nosso laboratório, como fonte de evidência do potencial cancerígeno de praguicidas agrícolas. O protocolo adotado pelo IBAMA tem algumas particularidades, como o uso de ambos os gêneros de ratos da linhagem *Wistar* e dois grupos controle positivo (tratados com fenobarbital - FB ou com 2'-acetoaminofluoreno -2'-AAF). Este protocolo foi utilizado ao longo de seis anos em nosso laboratório (TOXICAN) para a realização de cinco bioensaios sob contratos com empresas do setor agroquímico. O presente estudo consiste da revisão dos diagnósticos de três órgãos desses ensaios - o fígado, rins e intestinos - escolhidos porque foram os que apresentaram mais lesões na análise de cada um daqueles ensaios. A capacidade indutora enzimática dos agentes do protocolo foi avaliada pela expressão imunohistoquímica das enzimas hepáticas CYP 2B1/2B2 e 1A2. Os resultados indicam atividade promotora do FB, embora menos evidente que a do 2'-AAF, particularmente nos ratos machos. Apesar da alta variabilidade da linhagem de rato *Wistar*, este estudo permitiu estabelecer um banco de informações sobre as lesões que caracteristicamente são encontradas naqueles órgãos dos animais *Wistar* submetidos ao protocolo DMBDD^b

INTRODUÇÃO

O ensaio convencional adotado globalmente para identificar substâncias cancerígenas é o teste de longa-duração com roedores (TLD). Esse teste tem duração de cerca de cinco anos, envolvendo um grande número de animais de dois gêneros e de duas espécies de roedores expostos a no mínimo três doses da substância-teste, e os respectivos grupos controle (FDA, 1993, Gart, *et al.*, 1986, Huff, *et al.*, 1991).

Apesar de universalmente adotado, o TLD apresenta várias desvantagens, como complexidade operacional, longo período de execução e alto custo, o que o torna inviável em alguns países. Além disso, tem limitações de interpretação e não considera as múltiplas etapas naturais da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) (de Camargo, *et al.*, 1999, Fukushima, *et al.*, 2005, Salvadori, *et al.*, 1997). Portanto, vários protocolos alternativos/complementares de ensaios *in vivo*, ou bioensaios, foram desenvolvidos durante as décadas de 1980 e 1990, ou seja, ensaios mais rápidos, econômicos, e informativos que o TLD. (Swanson, 1988, Westein, 1988). Desenvolvido por pesquisadores japoneses, o “bioensaio do rato iniciado” foi inicialmente estabelecido com ratos machos isogênicos da linhagem *Fischer* 344 (Hagiwara, *et al.*, 1993, Hasegawa, *et al.*, 1994, IARC, 1986, Ito, *et al.*, 1996, Ito and Imaida, 1992).

O protocolo do “ensaio do rato iniciado” baseia-se no paradigma de carcinogênese de duas etapas, a da iniciação e a da promoção. A iniciação é o fenômeno inicial da carcinogênese química, dependente de alterações estruturais do genoma das células alvo, após exposição a um agente genotóxico. A etapa da promoção envolve a seleção e proliferação clonal das

células iniciadas e sua evolução para neoplasia; é um processo reversível que depende da dose e do intervalo entre as exposições à substância promotora, assim como da ação prévia do agente iniciador (Farber, 1987, Farber, 1988, Pitot, 1989, Pitot, 1993, Westein, 1988). Assim, o protocolo do “ensaio do rato iniciado” consiste de duas etapas sucessivas: a da iniciação, feita pelo tratamento com cinco agentes genotóxicos que estabelecem a iniciação da carcinogênese em vários órgãos, e a da promoção, na qual é feita exposição à substância-teste a fim de avaliar seu possível potencial promotor (Hagiwara, Tanaka, Imaida, Tamano, Fukushima and Ito, 1993, Hasegawa, Tanaka, Tamano, Shirai, Nagao, Sugimura and Ito, 1994, IARC, 1999, Ito, Hasegawa, Imaida, Hirose and Shirai, 1996, Ito and Imaida, 1992).

Os agentes iniciadores usados levaram o ensaio a ser também denominado DMBDD, devido as iniciais destas substâncias (dietilnitrosamina (DEN), N-metil-N-nitrosurea (MNU), butil-N(4-hidroxibutil)nitrosamina (BBN), dihidroxi-di-N-propilnitrosamina (DHPN), e dimetilhidrazina (DMH). Devido à variedade de órgãos iniciados, há vários parâmetros qualitativos e quantitativos para avaliação da positividade da substância-teste, incluindo lesões com caráter preneoplásico, como as hiperplasias e displasias. O ensaio DMBDD apresenta vantagens sobre o TLD como menor duração (28-36 semanas), o uso de menor número de animais (uma única espécie e gênero de roedor), resultados mais rápidos a menor custo, e a possibilidade de estudos sobre o modo de ação/mecanismo de carcinogênese da substância testada (de Camargo, Salvadori, Rocha, Barbisan and Ribeiro, 1999, Fukushima, Morimura, Wanibuchi, Kinoshita and Salim, 2005, IARC, 1999, Salvadori, Rocha, Ribeiro and de Camargo, 1997).

Uma modificação protocolar do bioensaio DMBDD foi adotada pelo IBAMA (Portaria Normativa N° 84) como método válido para evidenciar a carcinogenicidade de praguicidas agrícolas – (IBAMA, 1996). As modificações propostas pelo protocolo DMBDD brasileiro (DMBDD^b) são o uso de ambos os gêneros da linhagem de ratos *Wistar* como sistema experimental, o período experimental de 30 semanas e dois grupos controle positivo, um tratado com fenobarbital (FB, cancerígeno não-genotóxico, que tem particularmente o fígado como órgão alvo) e outro com o 2'-acetoaminofluoreno (2'-AAF, cancerígeno genotóxico com vários órgãos alvo).

Além de seus efeitos cancerígenos, o 2'-AAF e o FB têm a capacidade de induzir a expressão de várias enzimas detoxificantes do fígado, o que pode ser um fator importante na determinação da resistência ou susceptibilidade a xenobióticos nos primeiros estágios da hepatocarcinogênese (Sparfel, *et al.*, 2003). As enzimas metabolizadoras de drogas como as CYPs (citocromos P450) constituem um dos alvos dessas substâncias. Assim, a administração de 2'-AAF ou FB a ratos induz a expressão e atividade de algumas isoformas de CYPs, como CYP1A2 e CYP2B1/2B2, respectivamente (Burt and Thorgeirsson, 1988, Fukushima, Morimura, Wanibuchi, Kinoshita and Salim, 2005, Hagiwara, *et al.*, 1996, Martignoni, *et al.*, 2004, Nims, *et al.*, 1987, Parkinson, 2001, Tateishi, *et al.*, 1999).

O Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena (TOXICAN), na Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista (UNESP), foi o proponente e o pioneiro no país em executar o protocolo DMBDD^b. No período 1996-2001, foram desenvolvidos cinco desses bioensaios para testar o potencial cancerígeno de praguicidas agrícolas, sob contrato com empresas do

setor agroquímico do Brasil (de Camargo, *et al.*, 1999). Assim, o objetivo do presente estudo foi reavaliar a experiência de cinco anos (1996-2001) com o protocolo DMBDD^b no TOXICAN, revisando as lesões histológicas induzidas no *fígado, rins e intestinos* em ambos os gêneros de ratos *Wistar* pelo processo de iniciação do DMBDD e promoção com fenobarbital ou 2'-acetoaminofluoreno e, desse modo, gerar visão crítica e de conjunto do ensaio DMBDD^b em ratos *Wistar*. Os órgãos re-diagnosticados foram os que apresentaram maior incidência de lesões nos cinco estudos realizados no laboratório até 2001

Essa é uma contribuição para o estabelecimento e validação do bioensaio DMBDD em uma linhagem de roedor diferente daquela em que o bioensaio foi estabelecido originalmente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e ambiente de experimentação

Ratos *Wistar* (225 machos e 225 fêmeas) com cerca de 4 semanas de idade, foram submetidos ao protocolo DMBDD^b em 5 diferentes estudos desenvolvidos de acordo com Boas Práticas de Laboratório ao longo de 6 anos (1996-2001). Os animais foram fornecidos pela Biotecnologia Planalto (Bioplan, Brasília-DF) ou pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (Curitiba, TECPAR) e, sem receber qualquer tratamento, foram submetidos a período de aclimação de 3 semanas. Randomizados e distribuídos em caixas de polipropileno forradas com maravalha de pinho autoclavada e tampadas com grades de arame cromados, os animais receberam água filtrada e ração basal NUVILAB-CR1 (NUVITAL, Curitiba-PR) *ad libitum*. As condições do biotério foram sempre mantidas a temperatura ambiente de $24^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C, umidade relativa do ar a $55 \pm 10\%$, período de luz de 12 horas claro/12 horas escuro e a exaustão contínua do ar.

Estes animais foram pesados duas vezes por semana e o consumo estimado de água e ração e avaliações clínicas foram registrados semanalmente durante todos os períodos experimentais.

2.2 Agentes químicos

N-dietilnitrosamina (DEN), N-metil-N-nitrosurea (MNU), N,N'-dimetilhidrazina (DMH) e 2'-acetoaminofluoreno (2'-AAF) foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO); N-butil-N-(4-hidroxibutil)nitrosamina (BBN) e fenobarbital sódico (FB) comprados de Tokyo Kasei Kogyo Co.

(Tokyo) e dihidroxi-di-N-propilnitrosamina (DHPN) da Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto).

2.3 Delineamento experimental

Para a presente revisão foram considerados, de cada um dos cinco estudos desenvolvidos entre 1996-2001, os animais dos seguintes grupos experimentais: 1) o grupo controle negativo, não exposto a qualquer substância; 2) o somente iniciado, exposto a DEN, MNU, BBN, DMH e DHPN; e 3) o grupo também exposto ao FB ou ao 2'-AAF (grupos iniciados e promovidos). Não foram considerados aqueles grupos expostos às substâncias testadas, as quais eram de interesse das empresas patrocinadoras dos estudos e estavam restritos por termo contratual de sigilo. Os grupos similares de cada um dos estudos foram consolidados de modo a constituírem três novos e maiores grupos experimentais de cada gênero, que receberam os seguintes tratamentos (Figura 1).

O grupo controle negativo, com 50 animais machos e 50 fêmeas, recebeu somente ração basal peletizada durante todo o ensaio. Os dois outros grupos (iniciados ou iniciados e promovidos) foram tratados seqüencialmente com os cinco agentes iniciadores (tratamento DMBDD) durante a primeira e segunda semanas: uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de DEN 100mg/kg de peso corpóreo no início do experimento; quatro injeções i.p. de 20 mg/kg de peso corpóreo de MNU duas vezes por semana e BBN a 0,05% na água de beber durante duas semanas. Durante a 3^a e a 4^a semanas esses grupos foram tratados com DMH (40mg/kg de peso corpóreo, subcutânea (s.c.), 4 vezes, duas doses na semana) e DHPN (0,1% na água de beber durante duas

semanas). O grupo somente iniciado, com 80 machos e 80 fêmeas, foi mantido sem qualquer outro tratamento até a 30ª semana. Os grupos iniciados e promovidos foram também expostos a 2'-AAF 0,01% (30 animais) ou a FB 0,05%, 0,075% ou 0,10% (160 animais) misturados à ração desde a 6ª até a 30ª semana. O tratamento de diferentes grupos de ratos com três concentrações alternativas de FB foi devido à resposta variável e fraca – do ponto de vista de desenvolvimento de hipertrofia centrolobular e de focos de hepatócitos alterados no fígado - dos animais expostos primeiramente à 0,05% e depois à 0,075% de FB. Assim, nos três primeiros ensaios 90 animais de ambos os sexos foram tratados com 0,05%, no último, 40 com 0,075% e, no penúltimo, 30 animais com FB 0,10%, totalizando 160 animais.

Dos cinco estudos revisados, somente o primeiro deles utilizou o 2'-AAF 0,01% como controle positivo; os estudos seguintes utilizaram apenas o FB como controle positivo. Assim, na presente reavaliação há uma diferença entre a quantidade final de animais tratados com 2'-AAF (30 animais) ou com FB (160 animais).

2.4 Processamento e análise histológica

No final do tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia por exsangüinação após anestesia geral induzida por pentobarbital sódico 4% (45 mg/kg i.p.). Todos tiveram coletados órgãos alvo dos agentes iniciadores como fígado, pulmões, esôfago, estômago, intestinos delgado e grosso, rins, bexiga urinária, linfonodos, timo, tireóide, cavidade nasal, e língua. Estes órgãos foram fixados em formalina 10% e processados e corados com hematoxilina e eosina

(HE) para análise histológica. Após emissão dos respectivos relatórios, os blocos de parafina e as lâminas histológicas de cada estudo foram guardadas em sala de arquivos.

Para a presente reavaliação, cortes histológicos corados por HE do fígado, intestinos grosso e delgado, e rins direito e esquerdo, foram re-analisadas e classificadas de acordo com os critérios do Standardized System of Nomenclature and Diagnostic Criteria (SSNDC), disponíveis na *internet* (<http://www.toxpath.org/ssndc.asp>). Estes órgãos foram escolhidos porque foram os que apresentaram maior incidência de lesões nos cinco estudos realizados no laboratório até 2001. As lesões preneoplásicas nestes três órgãos são respectivamente, os focos de hepatócitos alterados, a hiperplasia tubular renal atípica e os focos de criptas aberrantes. Os focos de hepatócitos alterados incluem focos de células claras, basofílicas, eosinofílicas e anfofílicas (Bannasch and Zerban, 1990). No rim, a hiperplasia tubular engloba as hiperplasias tubulares simples e as atípicas, mas apenas essas últimas são consideradas preneoplasias (Hard, *et al.*, 1995, Hard, *et al.*, 2007, Mohr, 1992). Já os focos de criptas aberrantes são marcadores preneoplásicos encontrados no intestino grosso (Bird, 1995, Takayama, *et al.*, 1998).

As lesões preneoplásicas (focos alterados e hiperplasias) não foram quantificadas em cada animal, i.e., as tabelas indicam somente a incidência dessas alterações, independente de sua quantidade em determinado órgão. Ao contrário, as neoplasias são apresentadas individualmente, i.e., cada uma delas está quantificada no órgão primário respectivo. Deste modo, é possível indicar o número de neoplasias que cada animal desenvolveu, o que permite

definir o número total de tumores por grupo e a quantidade discriminada de neoplasias benignas e malignas, como aparece em Resultados.

2.5 Processamento e análise imunohistoquímica

Amostras do lobo direito, esquerdo e anterior do fígado também foram preparadas para análise quantitativa dos focos que expressam sob imunohistoquímica a forma placentária da glutathione S-transferase (GST-P⁺). Em resumo, o procedimento imunohistoquímico baseou-se no método avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories Inc., Dinamarca) (Hsu, *et al.*, 1981), no qual o anticorpo primário policlonal anti-GST-P (Medical & Biological Laboratories Co., Tóquio, Japão), foi utilizado na diluição 1:1000 por doze horas a 4°C. A contracoloração dos cortes foi realizada com hematoxilina de Harris por cerca de 1 a 2 minutos.

Os focos expressando a GST-P⁺ foram quantificados pelo Dr. Luis Fernando Barbisan por meio do programa KS-300 (Kontron Elektronik, Alemanha), utilizando-se um fotomicroscópio Nikon (Microphot-FXA) acoplado a microcomputador. Foram medidas a área de cada corte histológico de fígado (cm²) e a área de cada foco GST-P⁺ com diâmetro maior ou igual a 0,1- 0,15 mm² (Barbisan, *et al.*, 2003). Os parâmetros registrados foram o número de focos GST-P⁺ (focos/cm²) e área agregada de focos GST-P⁺ para cada animal (mm²/cm²).

Amostras dos três lobos do fígado foram ainda preparadas para análise da expressão de enzimas citocromo P450 isoformas 2B1/2B2 e 1A2 utilizando a técnica de *tissue microarray* (TMA) (Avninder, *et al.*, 2008). Nesse estudo, seis discos de 2 cm de diâmetro de cada animal foram reemblocados em

plataformas de 30 discos de TMA e processados imunohistoquimicamente para as isoformas de CYP estudadas. A análise, realizada em microscópio óptico com objetiva de 100X, consistiu da identificação da área hepática marcada pela proteína e sua intensidade. Ou seja, as intensidades de marcação leve, moderada ou alta foram discriminadas nas porções periportal, médiozonal ou centrolobular do fígado e contabilizadas como difusa quando as células coradas foram visualizadas esparsamente por todo o disco de tecido. Dentre os grupos que receberam FB, foi analisado somente o que recebeu a concentração de 0,075%.

O processo imunohistoquímico para marcação da CYP 2B1/2B2 utilizou o método de amplificação estreptoavidina-biotina com visualização através do kit EnVision⁺ (Dako, Califórnia). Os *cores* de tecido foram desparafinizados, rehidratados em álcool graduado e lavadas com PBS. A recuperação antigênica ocorreu em autoclave a 120 °C por 3 minutos em tampão de ácido cítrico, seguida de bloqueio da peroxidase endógena (H₂O₂ a 3%, Merck, Alemanha). O anticorpo primário policlonal conjugado CYP 2B1/2B2 (Fitzgerald, Acton, Massachusetts) diluição 1:2000, foi incubado *overnight* a 4°C. As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com EnVision⁺ por 1 hora à temperatura ambiente. O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado com solução de 3,3'-diaminobenzidina e contracorado com hematoxilina de Harris.

Os mesmos procedimentos descritos acima foram seguidos para a CYP 1A2 (Abcam Inc., Cambridge, US), exceto pela diluição (1:1000) e visualização com kit LSAB (Dako, Califórnia).

2.6 Análise estatística

Os dados de peso corpóreo, peso relativo de órgãos, consumo de água e ração, e número e área de focos GST-P⁺ foram avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) para amostras independentes. Nas amostras que não tiveram homogeneidade de variância e/ou não passaram pelo teste de normalidade, as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's para amostras independentes.

Para análise das lesões hepáticas, renais e intestinais, assim como as freqüências de neoplasias, o controle negativo foi adotado como controle do grupo apenas iniciado. Os grupos iniciados e tratados com FB ou com 2'-AAF foram contrastados somente com o grupo dos apenas iniciados. As diferenças entre incidência das lesões e os tratamentos, e intensidade de marcação imunohistoquímica das isoformas de CYP 2B1/2B2 e 1A2, foram avaliados pelos testes probabilísticos Qui-Quadrado ou Exato de Fischer (Hagiwara, *et al.*, 1993). A diferença estatística foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação clínica

Até a 30^a semana de experimento, a taxa média de mortalidade no conjunto dos cinco estudos foi de 9,1%, sendo 8,9% em machos e 9,3% em fêmeas (dados não mostrados). A maioria das mortes ocorreu de modo aleatório, independente do tratamento a que os animais estavam submetidos, e devido a infecções pulmonares. Os animais com pneumonia receberam Enrofloxacina (Baytril 5%), i.p., 5 mg/kg por 5 dias, juntamente com soro fisiológico via intraperitoneal. Após esse período, foi administrado, pela água de beber, complexo vitamínico Potenay B12 (25 ml/500 ml água) durante 10 dias. Como a antibióticoterapia utilizou quimioterápicos convencionais na prática veterinária, este procedimento foi assumido como não interferente no processo cancerígeno e, após reavaliação, os animais foram considerados dentro dos padrões de normalidade, ganhando peso até o final do experimento. No terço final do estudo, alguns animais iniciados vieram á óbito devido caquexia e desenvolvimento de neoplasias.

3.2 Peso corpóreo inicial, final e ganho de peso

Os animais dos grupos controle negativo, iniciados e promovidos com FB iniciaram os respectivos estudos com pesos que não diferiam entre si (Tabela 1). No entanto, os animais dos grupos iniciados e promovidos com 2'-AAF de ambos os gêneros foram fornecidos ao laboratório com pesos menores do que os dos outros grupos. Todos os grupos ganharam peso ao longo do experimento, sem que fossem detectadas diferenças significantes entre eles (Figura 2). Animais de ambos os sexos tratados com 2'-

AAF apresentaram evidente perda de peso na 21^a semana, provavelmente relacionada às infecções respiratórias, mas recuperaram-se após tratamento. No final do experimento, os grupos apenas iniciados de ambos os sexos apresentaram pesos corpóreos significantes menores que os de seus respectivos controles negativo. Os machos tratados com 2'-AAF também apresentaram peso médio final significativamente menor que seu controle iniciado. Embora as fêmeas do grupo iniciado e promovido com 2'-AAF tivessem começado o estudo com peso médio significativamente menor que os dos outros grupos, elas recuperaram essa diferença e terminaram o experimento com peso médio não diferente do controle.

3.3 Consumo de água e ração

As Tabelas 2 e 3 apresentam os valores médios de consumo de ração (g/rato/dia) e de água (ml/rato/dia). Durante as semanas 1 a 4, que corresponderam ao período de tratamento com os iniciadores, todos os grupos apresentaram redução da ingestão de água e de ração quando comparados com os respectivos controles negativo, que foi significativa para animais apenas iniciados de ambos os sexos durante as 3^a e 4^a semanas. O consumo de água da 6^a à 30^a semana pelos machos iniciados continuou significativamente menor que o respectivo controle negativo. Nesse período, os machos tratados com FB tiveram relativo aumento do consumo de água em relação ao grupo de iniciados. Já o consumo de ração pelos animais dos dois gêneros tratados com FB aumentou durante as semanas 6 à 30.

3.4 Peso relativo de órgãos

Os pesos relativos do fígado e rins são apresentados na Tabela 4. Houve aumento significativo dos pesos médios dos fígados de machos e fêmeas iniciados e tratados com FB ou 2'-AAF. Ambos os rins dos animais iniciados ou iniciados e promovidos com FB ou 2'-AAF apresentaram-se aumentados em ambos os sexos, embora nem sempre de modo significativo.

3.5 Fígado – Lesões preneoplásicas e neoplásicas

As Tabelas 5 e 6 mostram as incidências de lesões preneoplásicas e neoplásicas no fígado de ratos *Wistar* machos e fêmeas. Devido as diferentes definições usadas para focos de células mistas decidiu-se, assim como sugerido pelo comitê da SSNDC (Goodman, *et al.*, 1994), não incluir a categoria de focos de células mistas nas Tabelas 5 e 6, mas apenas classificá-los de acordo com o tipo celular predominante. O mesmo foi considerado para o foco tigróide, contabilizado como basofílico. No total, enquanto que os animais não tratados apresentaram incidência relativamente baixa de *focos de hepatócitos alterados* (machos, 18%; fêmeas, 6%), animais de ambos os sexos iniciados e ou tratados com os promotores apresentaram altas de incidências desses focos (machos 83-100%, fêmeas 75-100%). Os iniciados apresentaram aumento significativo da incidência de focos alterados em relação ao grupo controle negativo, mas não diferiram dos grupos promovidos com FB ou 2'-AAF, embora sua incidência fosse numericamente menor em ambos os sexos. Os focos alterados predominantes nos grupos tratados foram os de células claras e os eosinofílicos e, em menor incidência, os basofílicos e anfofílicos.

Assim, a indução química promovida pelo protocolo DMBDD^b levou a aumento de incidência e variedade dessa lesão preneoplásica hepática.

Adenomas ocorreram nos animais tratados de ambos os sexos; nos iniciados ocorreram em incidências significantes de 19% (machos) e 25% (fêmeas). O tratamento com os promotores FB 0,075 ou 0,10% ou 2'-AAF aumentou esses valores em ambos os sexos, que apresentaram incidências variando de 73% a 100% nos machos e de 60 a 100% nas fêmeas, significativamente maiores nessas duas maiores concentrações de FB e no grupo tratado com 2'-AAF. Igualmente, *colangiomas* apresentaram-se em incidências significativamente aumentadas em machos (83%) e fêmeas (71%) expostos ao 2'-AAF; nas diferentes concentrações de FB, houve aumento significativo das incidências desses tumores nos machos (27%) expostos à 0,10% FB e nas fêmeas (56%) expostas à FB 0,075%. No conjunto, os dados mostram que os agentes promotores induzem o aumento das incidências de adenomas e colangiomas no fígado, e que o FB é mais efetivo em concentrações iguais ou acima de 0,075%.

Em relação às neoplasias malignas, machos e fêmeas desenvolveram hepatocarcinomas e colangiocarcinomas. Foi registrados um hepatocolangiocarcinoma em um macho tratado com FB 0,075% e um angiosarcoma em outro, tratado com 2'-AAF, além de um caso de leucemia num animal tratado com a concentração intermediária de FB. Embora algumas diferenças com os respectivos controles iniciados fossem significantes, as

incidências nos grupos tratados com as três concentrações de FB ou com 2'-AAF não ultrapassaram 17% em ambos os sexos, isto é, as incidências de neoplasias malignas hepáticas foram relativamente baixas em relação às neoplasias benignas.

3.6 Fígado – Lesões não neoplásicas

As lesões não neoplásicas do fígado foram muito variadas (Tabelas 7 e 8) e, em ambos os sexos, consistiram de modo prevalente de hiperplasia de ductos biliares e de células ovais, cariomegalia, hipertrofia centrolobular e difusa, esteatose, cistos biliares únicos e múltiplos, degeneração cística, e outras lesões em incidências menores. Algumas dessas alterações também ocorreram nos animais controle negativo (não tratados), mas em incidências e intensidade relativamente menores. Nos grupos somente iniciados de ambos os sexos, a *hiperplasia de ductos biliares* e *hiperplasia de células ovais* destacaram-se por incidências acima de 50%. Nos grupos machos e fêmeas tratados com o FB ou 2'-AAF, a *hiperplasia de ductos* ocorreu na totalidade dos animais (100%), mas este aumento foi significativo apenas nos machos expostos ao FB 0,05% e 0,075%, provavelmente devido ao tamanho amostral e eficácia da iniciação, que induziu esta lesão em 74% dos machos e 94% das fêmeas. Quanto à *hiperplasia de células ovais*, os machos apresentaram aumento significativo das incidências quando expostos às duas maiores concentrações de FB. As fêmeas desse grupo tiveram aumento significativo apenas na maior concentração de FB. Ainda, ambos os sexos apresentaram incidências significantes (100%) dessa lesão quando expostos ao 2'-AAF.

Verificou-se também aumento significativo das incidências de *cariomegalia*, em todas as concentrações de FB e de 2'-AAF em ambos os sexos. Além disso, *hipertrofia centrolobular* de hepatócitos foi registrada nas duas maiores exposições ao FB em machos e em todas as concentrações nas fêmeas desses grupos, mas não nos grupos de ambos os sexos expostos ao 2'-AAF. *Hipertrofia hepatocelular difusa* foi observada em incidência significativamente aumentada em machos (83%) e fêmeas (79%) tratados com 2'-AAF, em relação ao grupo iniciado (6%).

Com relação aos *cistos biliares*, eles se apresentaram de forma única ou múltipla. Nos poucos casos observados nos controles negativo, apresentaram-se de forma de única ou com dois a três cistos pequenos e isolados, mas nos animais iniciados e ou tratados com os promotores eram múltiplos, com vários focos distribuídos por todo o fígado. Nos animais iniciados sua incidência significativa ocorreu acima de 85% em ambos os sexos, de modo que as incidências registradas nos animais tratados com FB ou 2'-AAF não diferiram de modo significativo deles. Assim, cistos biliares múltiplos parecem ser mais indicativos de tratamento com xenobióticos do que cistos únicos, mas suas incidências não permitiram discriminar entre os diferentes protocolos de exposição. A *necrose* ocorreu em poucos animais e foi significativa de modo *individual* (uma célula) nos grupos tratados com 0,075% FB de ambos os sexos e nas fêmeas expostas ao 2'-AAF. A incidência de *necrose focal* (grupos pequenos e escassos de células) foi significativa também nos grupos expostos ao 2'-AAF em ambos os sexos. No geral, as incidências variáveis de necrose parecem indicar uma resposta inespecífica à agressão pelo protocolo DMBDD^b. Com relação à *colangiofibrose*, machos e fêmeas apresentaram incidências

significantes maiores dessa lesão nos grupos tratados com 0,075% FB ou 2'-AAF. Ainda nas fêmeas, todas as concentrações de FB apresentaram aumento significativo da incidência desta lesão e no grupo exposto ao 2'-AAF. A alta incidência de colangiofibrose nos animais submetidos ao protocolo DMBDD^b, sugere que essa lesão, não muito usual, foi induzida pelos agentes promotores utilizados. Há sugestões de que esta lesão evolui para colangiocarcinomas (Maronpot, *et al.*, 1991), os quais também apareceram em nosso estudo.

Dentre as alterações não neoplásicas aparentemente degenerativas, em ambos os sexos predominaram a *esteatose focal* ou *difusa* e a *degeneração cística*. A *esteatose* ocorreu em incidência relevante (24% a 36%) nos animais controles negativo de ambos os sexos; o tratamento com os iniciadores e ou com FB ou 2'-AAF induziu aumento variável das incidências dessas alterações nos diferentes grupos, mas foi significativa apenas nos machos expostos a concentrações acima de 0,075% de FB. A *degeneração cística* não foi observada nos animais controle negativo em ambos os sexos; nos animais iniciados houve aumento significativo das incidências dessas lesões em ambos os sexos. O tratamento com o FB induziu aumento significativo das incidências dessa alteração nos machos e nas fêmeas tratados com FB 0,075%. Os animais promovidos com 2'-AAF não apresentaram degeneração cística ao final do experimento. A incidência de degeneração lipídica (*esteatose*) indica que o protocolo DMBDD^b promove severa injúria na maquinaria celular do hepatócito, principalmente devido a hepatotoxicidade das drogas utilizadas. O aparecimento de degeneração cística apenas nos animais tratados demonstra que o protocolo DMBDD^b promoveu lesão das células perisinusoidais, possivelmente associadas com o acúmulo excessivo de proteoglicanas e/ou

proteínas (Bannasch and Zerban, 1997), particularmente pelo FB, mas não pelo 2'-AAF.

O *processo inflamatório* foi caracterizado por infiltração de células mononucleares na região periportal; esta alteração ocorreu em incidências elevadas em todos os grupos, incluindo os controles negativo (machos, 40%; fêmeas, 38%); os tratamentos com iniciadores e ou promotores levou a aumento variável, mas não significativo, das incidências deste processo, com exceção nos machos iniciados. No geral, as incidências variáveis de infiltrado inflamatório parecem não ter relação com os tratamentos.

As outras lesões não neoplásicas ocorreram em incidências variadas e não expressivas.

3.7 Fígado - Focos de hepatócitos alterados GST-P⁺

Focos de hepatócitos alterados GST-P⁺, raros e pequenos, menores que 0,15 mm de diâmetro, foram observados nos grupos não iniciados (dados não mostrados), ao contrário dos iniciados, que apresentaram cerca de 5-6 focos/cm², que comprometeram ao redor de 0,3 mm²/cm² do fígado em ambos os sexos. Os tratamentos com os promotores FB ou 2'-AAF induziram aumentos significantes do número de focos GST-P⁺ em ambos os sexos, respectivamente, 8 e 11 focos/cm² em machos e 10 e 11 focos/cm² em fêmeas (Tabela 9). O FB provocou aumento da área agregada de focos em ambos os sexos, particularmente nas fêmeas e nas doses iguais e maiores que 0,075%. Nos grupos de ambos os sexos tratados com 2'-AAF este parâmetro não diferiu significativamente dos respectivos controles iniciados. As representações gráficas do número e área agregada de focos estão nos Anexos 1 a 4.

3.8 Fígado – Expressão imunohistoquímica de CYPs 2B1/2B2 e 1A2

A expressão basal de CYP 2B1/2B2 mostrou-se evidente nos animais não tratados, com marcação principalmente centrolobular leve a moderada nos dois sexos (Tabela 10, Figura 3 A-D). Nos animais iniciados, a expressão dessa enzima foi de intensidade leve, com extensão para as outras zonas hepáticas, ou seja, envolveu as regiões centrolobular, médiozonal e periportal, em ambos os sexos. O tratamento com FB induziu uma marcação nitidamente centrolobular, de alta intensidade e significativa em machos e fêmeas. Nesse grupo, além de centrolobular, a indução enzimática alcançou as outras zonas hepáticas, com intensidades moderadas a altas na região médiozonal em duas fêmeas e difusamente alta em outra fêmea e um macho. Os animais expostos ao 2'-AAF também apresentaram indução enzimática significativa nos dois sexos, com intensidades aumentadas da proteína marcada em todas as zonas hepáticas.

A imunoprecipitação da CYP 1A2 (Tabela 11, Figura 3 E-H) no grupo controle negativo ocorreu de maneira leve a moderada e também se restringiu à região centrolobular. Nos animais apenas iniciados a mesma região continuou levemente marcada, porém com mais animais com as outras zonas também coradas (30% machos e 40% fêmeas). Nos animais expostos ao FB, a marcação dessa isoforma de CYP não diferiu significativamente do respectivo grupo de iniciados, apresentando basicamente a mesma intensidade em iguais regiões induzidas nos dois sexos pela iniciação do protocolo DMBDD^b. No tratamento com 2'-AAF, machos e fêmeas mostraram aumento significativo da intensidade de marcação e extensão difusa da expressão da proteína.

3.9 Rins - Lesões preneoplásicas e neoplásicas

As lesões histológicas preneoplásicas e neoplásicas nos rins de machos e fêmeas estão apresentadas nas Tabelas 12 e 13, respectivamente. Um foco de *hiperplasia tubular atípica* foi encontrado em um dos machos do grupo controle negativo (2%). As fêmeas desse mesmo grupo não apresentaram quaisquer lesões preneoplásicas ou neoplásicas.

A *hiperplasia tubular atípica* ocorreu nos grupos macho e fêmea iniciados, embora em incidência significativa apenas nas fêmeas. Nos grupos tratados com FB, houve aumento na incidência de hiperplasia tubular atípica nos dois sexos, em especial nos machos, que a apresentaram em incidência significativamente aumentada. Os animais tratados com 2'-AAF dos dois sexos apresentaram apenas uma ocorrência de hiperplasia tubular atípica em um dos rins (machos 8%; fêmeas 7%). Estas observações indicam que o protocolo DMBDD^b é eficaz em induzir preneoplasias renais, principalmente nos grupos tratados com FB.

Em sua maioria, os *adenomas* ocorreram em machos e fêmeas iniciados, em incidências significantes de 14% e 16%, respectivamente. Nos animais tratados com FB as incidências de adenomas não diferiram de modo significativo dos animais iniciados, em ambos os sexos. No entanto, não houve ocorrência dessa lesão nos grupos expostos ao 2'-AAF. Os *carcinomas tubulares* ocorreram em baixas incidências nos grupos de iniciados macho e fêmea que não diferiram do controle. Nos animais tratados com FB as incidências de carcinomas também foram baixas e não diferiram de modo significativo dos animais iniciados, em ambos os sexos. Nos animais de ambos os sexos expostos ao 2'-AAF não ocorreram os carcinomas tubulares.

Aparentemente, neoplasias renais tubulares benignas e malignas são induzidas pela iniciação sem que o FB e o 2'-AAF exerçam efeitos sobre suas incidências.

O *tumor mesenquimal renal* (TMR) (Figura 4) ocorreu em incidências significativamente aumentadas tanto nos machos (20%) como nas fêmeas iniciadas (65%). Nos animais promovidos com FB e 2'-AAF as incidências não diferiram (machos, 21% e 17%, respectivamente) ou foram significativamente menores que nos iniciados (fêmeas 45 e 29%, respectivamente) Apenas as fêmeas expostas ao FB apresentaram diferença significativa de incidências em relação aos iniciados. A observação de tumores renais de origens histológicas distintas, provavelmente reflete a ação das substâncias utilizadas na fase de iniciação do protocolo DMBDD^b (Hard, Alden, Stula and Trump, 1995).

3.10 Rins - Lesões não neoplásicas

As lesões não neoplásicas mais relevantes do ponto de vista de incidência observadas neste estudo foram hiperplasia simples, cilindros hialinos, túbulos císticos, pigmentação de células tubulares e infiltrado inflamatório (Tabelas 14 e 15). O grupo controle negativo apresentou *hiperplasia tubular simples* nos machos (24%) e fêmeas (8%). As incidências dessas lesões aumentaram significativamente nas fêmeas (37%) e nos machos (46%) iniciados. As incidências nos animais expostos ao FB ou 2'-AAF não diferiram dos respectivos controles iniciados.

Cilindros hialinos ocorreram nos grupos machos (18%) e fêmeas (24%) não tratados. Nos animais tratados, apenas os machos iniciados e os tratados com 2'-AAF apresentaram aumento significativo nas incidências dessa lesão.

Túbulos císticos ocorreram em apenas duas fêmeas (4%) do grupo controle negativo. Nos animais tratados com iniciadores e ou promotores, as incidências ocorreram de modo variável e não significativa.

O *infiltrado inflamatório* apresentou-se como uma alteração moderada e focal de células mononucleares, ocorrendo em machos e fêmeas não tratados, em incidências de 8-11%. Nos animais iniciados e tratados com promotores de ambos os sexos as incidências não diferiram significativamente dos controles negativos.

Nos grupos controle não tratados, a *pigmentação de células tubulares* ocorreu principalmente nas fêmeas (20%). Em relação a esse grupo, as incidências nos grupos iniciados estiveram numericamente aumentadas, mas não significantes. Nos grupos tratados com FB ocorreu aumento significativo de pigmentação tubular nas fêmeas, mas não nos machos. Nos grupos expostos ao 2'-AAF praticamente não ocorreu pigmentação de células tubulares.

Assim, o protocolo DMBDD^b mostrou-se citotóxico também para as células tubulares renais, levando ao aparecimento de múltiplas lesões no mesmo animal (dados não mostrados). A indução química pode ainda ter exacerbado o quadro de nefropatia crônica progressiva, uma condição na qual todas essas lesões não neoplásicas aparecem em conjunto e em proporções variáveis.

3.11 Intestinos

As Tabelas 16 e 17 mostram a incidência de lesões preneoplásicas e neoplásicas nos intestinos de ratos *Wistar* machos e fêmeas. Preneoplasias (*focos de criptas aberrantes*) ou neoplasias benignas (*adenomas*) não

ocorreram nos grupos não tratados, mas foram registrados em incidências relativamente baixas, variáveis no intestino grosso e delgado de machos e fêmeas iniciados e ou tratados com FB ou 2'-AAF. No intestino delgado de machos e fêmeas tratados, *adenocarcinomas* ocorreram em incidências baixas e não significantes. As únicas lesões claramente associadas aos tratamentos foram os *adenocarcinomas* no cólon distal de machos iniciados e os iniciados e tratados com 2'-AAF. O FB não exerceu efeito sobre as incidências desses tumores malignos em ambos os sexos.

3.12 Incidência e freqüência de preneoplasias e neoplasias

A incidência e freqüência de neoplasias nos três órgãos reavaliados estão resumidas nas Tabelas 18 e 19. Os animais não-iniciados machos e fêmeas apresentaram incidências baixas de preneoplasias (até 25% nos machos) e não desenvolveram neoplasias neste estudo.

A *iniciação* provocou incidências significativamente aumentadas de preneoplasias (83% nos machos e 85% nas fêmeas) e de animais com neoplasias benignas e malignas (25% em ambos os sexos). Nesses grupos, em ambos os sexos predominaram os animais com neoplasias malignas. O tratamento com os promotores FB ou 2'-AAF aumentou de modo expressivo as incidências de preneoplasias em ambos os sexos, mas elas não diferiram significativamente dos respectivos grupos iniciados. Nos machos, o tratamento com FB aumentou significativamente a incidência de animais com neoplasias e o número total de neoplasias, particularmente as malignas. Nas fêmeas, o tratamento com FB exerceu influência similar, mas predominaram neoplasias benignas. O tratamento com 2'-AAF provocou aumento significativo da

incidência de neoplasias nos machos, de modo que todos os animais as desenvolveram, particularmente benignas. Embora a quantidade total de neoplasias neste grupo fosse menor que nos iniciados, a carga tumoral (nº de tumores/animal com tumor) foi significativamente maior que nos iniciados ou nos também promovidos com FB. Fenômeno semelhante foi observado nas fêmeas tratadas com 2'-AAF.

4. DISCUSSÃO

4.1 Aspectos gerais

O tratamento de ratos *Wistar* de ambos os sexos com o protocolo DMBDD^b para *iniciação* em múltiplos órgãos levou ao desenvolvimento significativo de neoplasias benignas e malignas de fígado, rins e intestinos em machos e fêmeas, as quais não foram observadas nos animais não iniciados. A segunda fase do ensaio DMBDD^b consistiu da *iniciação* + *promoção* da carcinogênese pelo FB ou 2'-AAF. O FB é um barbitúrico não-genotóxico, indutor enzimático, que quando fornecido em doses relativamente elevadas e ou durante período prolongado, leva à proliferação hepatocelular e ao desenvolvimento de neoplasias no fígado de roedores (Grasso, *et al.*, 1991, Parkinson, 2001). Já o 2'-AAF é uma arilamida genotóxica e cancerígena completa, com amplo espectro de órgãos-alvo (Pitot and Dragan, 2001). No presente estudo, as diferenças entre esses agentes promotores foram mais quantitativas que qualitativas e ocorreram de modo variável entre os sexos. Nos grupos expostos ao 2'-AAF, esse agente induziu neoplasias em todos os animais e aumento significativo no número de animais com neoplasias benignas nos dois sexos. No quadro geral, o FB também induziu aumento significativo de preneoplasias e o número total de machos com neoplasia, além de aumentarem o total de lesões neoplásicas em ambos os sexos. No conjunto, os resultados indicam a atividade promotora de neoplasias do FB, embora de modo menos evidente que a do 2'-AAF, que induziu carga tumoral significativa em machos. Assim, tanto a *iniciação* como a *promoção* da carcinogênese foi claramente estabelecida com o protocolo DMBDD^b nos três

órgãos estudados e ficou mais bem caracterizado sob o aspecto de desenvolvimento de tumores que de preneoplasias.

Embora os animais machos e fêmeas do grupo tratado com 2'-AAF tenham iniciado o estudo com *peso corpóreo* médio inferior aos respectivos grupos controle positivo de iniciação, eles não mais diferiram do peso daqueles grupos quando atingiram as 3ª e 4ª semanas do experimento. No entanto, quando foi iniciada a exposição ao 2'-AAF a partir da 5ª semana, houve redução na curva de ganho de peso em ambos os sexos, provavelmente associada à toxicidade deste agente (Williams, *et al.*, 2004). Embora as fêmeas tenham recuperado seu crescimento, os machos apresentaram nova perda até a 30ª semana, de modo que no final do experimento essas variações do peso foram traduzidas por pesos médios significativamente menores nos machos. Isto possivelmente devido à caquexia instalada pelas neoplasias decorrentes do tratamento com 2'-AAF. Esses animais foram os que apresentaram a maior carga tumoral neste estudo, principalmente decorrente de neoplasias malignas. A caquexia neoplásica é um processo que ocorre antes que a neoplasia se manifeste clinicamente e seus mecanismos são pouco conhecidos. As perdas de peso seguidas de anorexia e comprometimento físico ocorrem em detrimento de menor ingestão de alimento acompanhada de taxa metabólica elevada, levando ao consumo orgânico. Evidências recentes indicam que a caquexia resulta da ação de fatores solúveis, como as citocinas (TNF- α , IL-1 e INF- γ), produzidas pelo tumor ou hospedeiro, agindo como mediadoras da síndrome de consunção que acompanha o câncer (Stricker and Kumar, 2008).

Dependendo das substâncias a que os animais estiveram expostos durante a primeira (iniciação) e segunda (promoção) fases do estudo,

ocorreram também variações no *consumo médio de água e de ração*. A partir da administração de DHPN e DMH na 3^a e 4^a semanas, houve diminuição significativa do consumo de água e de ração pelos machos e fêmeas. Isto já fora observado em estudos prévios de nosso grupo com ratos *Wistar* submetidos ao protocolo DMBDD^b ou tratados por 4 semanas somente com 0,2% DHPN; o consumo de água em ambos os sexos desses grupos foi menor significativamente que o controle negativo (MOREIRA *et al.*, 2000). Assim, até a 4^a semana, há a possibilidade de que a diminuição de ingestão de água e de ração tenha sido decorrente do impacto sistêmico causado pelo tratamento com o DHPN na água de beber. O tratamento com FB da 6^a à 30^a semana também provocou o aumento significativo do consumo de água pelos machos e de ração por machos e fêmeas, em relação aos animais iniciados. Esse fenômeno já foi verificado por nosso grupo em outros estudos e ocorre provavelmente devido à ação do FB sobre os centros de apetite hipotalâmicos (Booth, 1992).

Peso corpóreo, peso relativo de órgão e incidência de tumores são variáveis importantes para análise dos dados e interpretação dos resultados em ensaios de toxicidade com duração prolongada. No caso do fígado, por exemplo, o aumento homogêneo do tamanho e do peso relativo desse órgão resulta inicialmente de hipertrofia e hiperplasia de hepatócitos provocadas pela exposição a xenobióticos indutores enzimáticos ou indutores da proliferação de peroxissomos (Amacher, *et al.*, 1998, Williams and Iatropoulos, 2002). Com o prolongar do estudo podem associar-se outras lesões e eventualmente tumores, com crescimento heterogêneo do órgão e aumento de seu peso absoluto. Nossos resultados demonstraram tal associação no fígado, órgão

com grande número de lesões e aumento do peso relativo nos grupos tratados com FB ou 2'-AAF em ambos os sexos.

Dentre as várias *lesões hepáticas* não neoplásicas observadas nos animais *controle negativo* de ambos os sexos os focos de hepatócitos alterados mais encontrados foram os eosinofílicos, os quais, juntamente com focos tigróides basofílicos e de células claras, são as lesões espontâneas ou induzidas mais freqüentes em TLD, respectivamente (Goodman, Maronpot, Newberne, Popp and Squire, 1994). A ocorrência de focos de hepatócitos alterados “espontâneos” em roedores não tratados pode estar associada ao envelhecimento dos ratos e ou à predisposição genética a esse potencial estágio inicial visível da carcinogênese (Bannasch and Zerban, 1990, Bannasch, *et al.*, 1997, Goodman, Maronpot, Newberne, Popp and Squire, 1994).

4.2 Efeitos da iniciação nos órgãos estudados

O aumento quantitativo de focos de hepatócitos alterados nos grupos *iniciados* macho e fêmea mostra que o protocolo DMBDD^b foi capaz de induzir de modo significativo essas lesões preneoplásicas, as quais tornam o fígado suscetível à ação de agentes promotores na segunda fase do ensaio.

Dentre os agentes iniciadores utilizados no protocolo DMBDD, a DEN e a DMH são metabolizadas no fígado, produzindo compostos intermediários hepatotóxicos; as nitrosaminas BBN e DHPN podem se associar a essas substâncias e agravar a agressão química ao sistema enzimático detoxificador de xenobióticos (complexo do citocromo P450) (Parkinson, 2001). Assim, no grupo de animais apenas *iniciados* machos e fêmeas, documentamos agressão

aos hepatócitos pelo aparecimento de necrose, hipertrofia centrolobular e difusa, cariomegalia, esteatose e degeneração cística, com incidências aumentadas, mas nem sempre de modo significativo em relação ao respectivo controle. Os agentes iniciadores também foram tóxicos para as células dos ductos biliares, o que foi caracterizado pela hiperplasia de ductos biliares e de células ovais, cistos biliares e colestase biliar. Ocorreram altas incidências de focos preneoplásicos em machos e fêmeas, principalmente de focos eosinofílicos. Esses focos expressam a forma placentária (P) da enzima GST, uma excelente marcadora de lesões hepatocíticas preneoplásicas (Bannasch, 1986, Satoh, *et al.*, 1985). A análise quantitativa de focos que expressam a GST-P (demonstrada imunohistoquimicamente), indica aumento significativo da incidência, frequência e tamanho desses focos, o que pode explicar o aumento das incidências significantes de adenomas hepáticos em machos e fêmeas desse grupo. Além disso, ocorreram colangiomas nos dois sexos, e desenvolvimento de um colangiocarcinoma em machos, provavelmente associado à proliferação de ductos biliares (Bannasch and Zerban, 1997, Goodman, Maronpot, Newberne, Popp and Squire, 1994).

Com relação aos *rins*, o aumento do peso destes órgãos em todos os grupos iniciados e ou promovidos, machos e fêmeas, embora nem sempre significativo, pode ser decorrente de aumento da proliferação celular e de lesões induzidas nesse órgão. Outros estudos de nosso laboratório mostraram que o protocolo DMBDD^b de fato induz o desenvolvimento de adenomas no rim e de tumores mesenquimais renais (Moreira, *et al.*, 2000). Na presente reavaliação, dentre os animais *não tratados* machos e fêmeas, somente um deles desenvolveu hiperplasia tubular atípica, uma lesão considerada

preneoplásica (Hard, Alden, Stula and Trump, 1995, Hard, Seely, Betz and Hayashi, 2007, Mohr, 1992). Nesses animais controle foram também encontradas hiperplasias tubulares simples, cilindros hialinos, túbulos císticos, dilatação tubular, hemossiderose, pigmentação de células tubulares e infiltrado inflamatório. Esses achados não devem ser interpretados como lesões isoladas, mas como parte do quadro de *nefropatia crônica progressiva* (NCP), uma condição característica do processo de envelhecimento de ratos que se inicia no estado juvenil e pode levar à morte de ratos velhos (Anver and Cohen, 1979). Nessa doença, as primeiras mudanças histológicas são o aparecimento de pequenos e raros focos de túbulos basofílicos no córtex, além de cilindros hialinos eosinofílicos no segmento medular do mesmo túbulo (Hard, *et al.*, 1999). Com o avançar da doença, mais túbulos são afetados e exibem mudanças degenerativas e regenerativas, incluindo a hiperplasia simples; ao mesmo tempo, aparecem túbulos dilatados e císticos. Alterações intersticiais incluem acúmulo moderado e focal de células inflamatórias mononucleares e fibrose em grau variável. As lesões tubulares e intersticiais em ratos *Wistar* parecem ser secundárias, causadas pelo excesso de proteína extravasada do glomérulo acometido (Hirokawa, 1975). Em estágios mais avançados, o córtex apresenta-se atrófico, com túbulos císticos proeminentes, podendo haver mineralização da membrana basal tubular. Devido a este quadro, a NCP também tem sido descrita como uma doença atrófica com hipertrofia e hiperplasia compensatórias.

Ratos com 2-3 meses de idade podem apresentar as lesões da NCP, as quais progridem continuamente (Seely and Hard, 2008). O encontro de lesões renais não neoplásicas como hiperplasia tubular simples, cilindros hialinos,

túbulos císticos, dilatação tubular e infiltrado inflamatório, sugerem que os animais *não tratados* do nosso estudo sofreram de NCP, desenvolvida em sua fase juvenil (até cerca de 37 semanas). No entanto, esses animais não desenvolveram quaisquer neoplasias no intervalo de tempo estudado e apenas um deles apresentou hiperplasia tubular atípica, indicando que podem ser utilizados como controles da iniciação dos grupos tratados com os agentes iniciadores. As lesões renais encontradas nos animais desse grupo podem ser correlatas aos achados de neoplasias espontâneas em ratos *Wistar* controle em estudos de longa duração, nos quais vários tipos de tumores ocorrem em incidências de 2 a 6,9% em ambos os sexos dessa linhagem, e em vários órgãos (Giknis and Clifford, 2003, Poteracki and Walsh, 1998).

As lesões renais não neoplásicas observadas nos animais *iniciados* indicam que a gravidade da nefropatia crônica progressiva (NCP) foi exacerbada pela exposição química, principalmente indicada pelo aumento da incidência de hiperplasia tubular simples em machos e em fêmeas. De fato, progressão da NCP induzida quimicamente já foi relatada em outros estudos (Hard, 2002, Hard, Seely, Betz and Hayashi, 2007, Hard, *et al.*, 1997).

As lesões renais preneoplásicas e neoplásicas foram representadas neste estudo pela hiperplasia atípica, adenomas e carcinomas. Esses achados são condizentes com a associação que alguns pesquisadores observaram entre NCP, hiperplasia atípica e tumores tubulares renais em ensaios longos de carcinogênese (Hard, 2002, Hard, Seely, Betz and Hayashi, 2007, Hard, Whysner, English, Zang and Williams, 1997).

Os fatores que determinam essa associação ainda são desconhecidos, mas parecem ser multifatoriais e complexos (Seely and Hard, 2008). Para

explicar a associação NCP-carcinogênese renal foram propostos mecanismos indiretos que facilitam a expansão clonal de células iniciadas, o que aumenta a taxa de erros espontâneos da replicação do DNA e ou diminui o tempo de fixação dos eventos mutagênicos (Hard, Whysner, English, Zang and Williams, 1997). Algumas substâncias não-genotóxicas, como o FB no presente estudo, podem exacerbar a NCP e resultar em tumores. No entanto, varias dessas substâncias não-genotóxicas também demonstram nefrotoxicidade e, portanto, podem influenciar a tumorigênese por outros mecanismos (Khan and Alden, 2002, Seely and Hard, 2008). Assim, um ensaio com ocratoxina A (um cancerígeno renal não-genotóxico), revelou que lesões preneoplásicas caracteristicamente observadas em bioensaios que usam cancerígenos genotóxicos também estavam presentes nos animais tratados com o cancerígeno não-genotóxico, e que quanto maior o tamanho e o avanço do estágio da lesão preneoplásica, maior a probabilidade de formação de tumor (Dietrich and Swenberg, 1991).

Outro tipo de tumor renal encontrado nos animais da presente reavaliação foi o tumor mesenquimal renal (TMR). Esta neoplasia pode ser espontânea (infreqüente) ou induzida quimicamente, em particular por nitrocompostos (Hard, 1990). Origina-se do estroma renal, aparentemente não relacionada à NCP e é constituída por células fusiformes, com núcleos alongados e volumosos, mas pode apresentar uma composição heterogênea de células estreladas, fibras musculares lisas, vasos, cartilagem e osteóide. Esta neoplasia tem caráter infiltrativo, envolvendo e atrofiando as estruturas epiteliais pré-existentes (Hard, Alden, Stula and Trump, 1995). Geralmente ocorre em ratos jovens de ambos os sexos, tem crescimento rápido e

provavelmente se origina de células mesenquimais multipotentes do interstício cortical (Mohr, 1992). As observações disponíveis sugerem que o FB e o 2'-AAF não foram decisivos para o aparecimento do TMR, que deve ser atribuído apenas aos agentes iniciadores.

No rato, o processo de carcinogênese no cólon envolve uma série de alterações que vão desde lesões discretas na mucosa, como os focos de criptas aberrantes (FCA), até tumores malignos completamente instalados (Bird, 1995, Takayama, Katsuki, Takahashi, Ohi, Nojiri, Sakamaki, Kato, Kogawa, Miyake and Niitsu, 1998). FCA são lesões focais compostas por uma ou várias criptas aumentadas e aumento da densidade celular, o que leva a espessamento da mucosa. Essas lesões são consideradas precursoras de neoplasia no cólon do rato e indicadoras do potencial cancerígeno de agentes químicos (Bird, 1995, Fenoglio-Preiser and Noffsinger, 1999). Lesões semelhantes associadas ao câncer de cólon no homem são raras, e não se conhece o papel das FCA na histogênese da neoplasia em nossa espécie (Dolara, *et al.*, 1997). FCA foram encontrados de modo não significativo nos grupos *iniciados* de ambos os sexos, particularmente nas porções média e distal do cólon, onde ocorreram em maiores incidências. Estas lesões podem estar associadas ao aparecimento dos carcinomas completamente instalados nos mesmos animais, principalmente no cólon médio e distal, áreas igualmente mais afetadas em outro estudo com ratos *Wistar* realizado em nosso laboratório (Rodrigues, *et al.*, 2002). Adenocarcinomas no intestino delgado e grosso também são induzidos pelo protocolo DMBDD em ratos *Fischer* 344 (Hasegawa, Tanaka, Tamano, Shirai, Nagao, Sugimura and Ito, 1994).

As incidências aumentadas de tumores *intestinais* nos animais *iniciados* pelo protocolo DMBDD^b também provavelmente resultaram da exposição química. De fato, neoplasias intestinais benignas ou malignas não ocorreram nos animais não tratados, os quais na literatura apresentam baixas taxas de neoplasias intestinais espontâneas (<0,5%) (McMartin, *et al.*, 1992, Zwicker, *et al.*, 1992). Assim, evidenciando a indução química, apenas os machos iniciados apresentaram incidência significativa de adenocarcinoma no cólon distal.

No conjunto, as lesões observadas no fígado, rins e intestinos dos animais submetidos ao protocolo DMBDD^b, sugerem que as lesões provocadas pela *iniciação* da carcinogênese no grupo apenas de iniciados progrediram para neoplasias completas, com alta incidência de neoplasias benignas e malignas em ambos os sexos. Isso indica que o processo de iniciação foi tão efetivo nas primeiras 4 semanas que, apesar das 26 semanas seguintes de possível recuperação e regeneração dos tecidos, os animais apresentaram várias lesões resultantes do acúmulo de erros genéticos promovidos pelos agentes iniciadores. Ou seja, a citotoxicidade e genotoxicidade levaram à proliferação compensatória, mutações e redução do reparo como, por exemplo, ocorre em células hepáticas em cultura (Williams, Iatropoulos and Jeffrey, 2004).

4.3 Efeitos da promoção com FB

Com relação aos animais expostos ao *FB*, as duas maiores concentrações promoveram aumentos significantes da incidência de hipertrofia

centrolubular e hiperplasia de células ovais no fígado de animais machos e fêmeas. Esse aumento foi dose-dependente nos machos e variável nas fêmeas, enquanto as outras lesões apresentaram incidências variáveis entre os grupos expostos ao FB. A hipertrofia celular é uma resposta adaptativa bem conhecida da exposição ao FB e dependente do estímulo da atividade enzimática microssomal (Booth, 1992, Conney, *et al.*, 1960, Fukushima, Morimura, Wanibuchi, Kinoshita and Salim, 2005). Os animais desse grupo apresentaram ainda alta incidência de lesões preneoplásicas nos dois sexos, mas não significantes quando no total de animais com algum tipo de foco de hepatócito alterado. No entanto, as lesões preneoplásicas nesse grupo evoluíram para adenomas e carcinoma hepatocelular, além da presença de colangiomas e colangiocarcinomas, principalmente a partir de 0,075% de FB. O aumento de incidências de lesões hepáticas, por exemplo, nos grupos tratados com *FB* 0,075% e não nas outras concentrações demonstram uma resposta não-linear a esse tratamento.

Desde que muitas substâncias químicas requerem ativação metabólica para serem convertidas em seus metabólitos intermediários, aspectos metabólicos e toxicocinéticos são importantes no estabelecimento da relação dose-resposta. Assim, a saturação dos processos de absorção, ativação, inativação, eliminação e até reparo de DNA, podem produzir efeito não-linear numa relação dose-resposta (Hoel, *et al.*, 1983). Muitos promotores de carcinogênese hepática atuam pelo aumento da proliferação de hepatócitos após longo tempo de exposição. Aparentemente, uma das alterações que ocorrem na promoção pelo FB se dá pela inibição das junções intercelulares (*gap junctions*). A inibição dessas estruturas permite que células

preneoplásicas escapem à citoinibição e respondam à ação promotora e tumorigênciã do FB (Andersen, *et al.*, 2002, Williams and Iatropoulos, 2002). O FB e vários outros promotores também têm modo de ação mediado por receptores, servindo como modulador transcricional na alteração da expressão de genes hepáticos (Andersen, Yang, French, Chubb and Dennison, 2002). Na presente revisão, o comportamento não-linear da promoção de tumores pelo FB pode estar relacionado à cinética desse agente e ser resultado de saturação por detoxificação ou mecanismos de reparo de DNA. No conjunto, as lesões no fígado demonstram que o FB teve efeito hepatopromotor nos machos e fêmeas, particularmente nas duas maiores concentrações desse agente químico, apesar de relativa resistência da linhagem utilizada. Essas observações indicam que o fornecimento de FB pela ração no protocolo DMBDD^b deve ser de no mínimo 0,075%.

Diferenças na expressão dos receptores modulados pelo FB podem explicar as variações na resposta enzimática de hepatócitos médiozonais e periportais ao estímulo por FB entre ratos injetados com dose única e doses repetidas do barbitúrico (Watanabe *et al.*, 2000). No fígado de ratos normais, hepatócitos centrolobulares podem já expressar grandes quantidades desses receptores, mas poucos ou nenhum receptor na região médiozonal ou periportal (Buhler, *et al.*, 1992). Nossos resultados também mostram regionalização da expressão das isoformas CYP estudadas; nossos animais controle negativo analisados para a expressão de *CYP 2B1/2B2* e *1A2*, apresentaram marcação centrolobular. Quando ratos recebem injeções repetidas de FB, seus receptores podem se tornar expressos também nos hepatócitos médiozonais e periportais e isso pode resultar em indução de

isoformas de CYP em hepatócitos de todas as três zonas após repetidas doses de FB (Watanabe, *et al.*, 2000). Isso também ocorreu com nosso grupo iniciado e tratado com FB dos dois sexos. Outro estudo indica que uma isoenzima P450 em particular é geralmente induzida na mesma célula onde está constitutivamente expressa, e que esta seletividade regional independe do tipo de indutor (Buhler, Lindros, Nordling, Johansson and Ingelman-Sundberg, 1992). Assim, apesar do processo de iniciação dos animais submetido ao DMBDD^b já ter levado à expressão levemente aumentada das isoformas de CYP em hepatócitos midzonais ou de todo o ácino em geral, o tratamento com FB levou a aumento significativo no número de animais marcados para a mesma região, mas agora de modo mais intenso e particularmente para a CYP 2B1/2B2. O mesmo não ocorreu para a CYP 1A2, que apresentou apenas alterações quantitativas nas regiões já induzidas pela iniciação. Esse fenômeno de indução hepática regionalizada provavelmente pôde ser melhor demonstrado pela CYP 2B1/2B2 devido a esta ser uma enzima de distribuição conhecida e predominantemente centrolobular (Watanabe, Mondo, Takamori, Takeda and Kanamura, 2000), mas não pela enzima 1A2 que nesse estudo não demonstrou uma distribuição característica, apresentando-se de forma heterogênea/difusa. Aparentemente, a CYP 1A2 apresenta outro tipo de controle de expressão região-específica, que pode ser resultado da distribuição de receptores *Ah* (arilhidrocarbono) no ácino hepático (Buhler, Lindros, Nordling, Johansson and Ingelman-Sundberg, 1992). Em conclusão, a indução enzimática pelo FB ocorreu apenas para a CYP 2B1/2B2 nos machos e fêmeas submetidos ao DMBDD^b.

Nos rins dos animais do grupo iniciados e promovidos com *FB*, a NCP parece ter acelerado a incidência de lesões, mas nem sempre de modo significativo, tanto as proliferativas quanto não proliferativas em ambos os sexos tratados com *FB*. Destaque deve ser dado ao aumento de incidência de hiperplasia atípica nos machos e pigmentação da célula tubular nas fêmeas. Os pigmentos normalmente encontrados em células tubulares renais de ratos velhos são hemossiderina, lipofuscina e bilirrubina, e seu aparecimento pode ser exacerbado por disfunção hepática, hemólise e doenças hematológicas. A identificação de cada tipo de pigmento é importante para interpretação patogênica de desequilíbrio homeostático sistêmico e ou renal e exige coloração especial (Hard, Alden, Bruner, Frith, Lewis, Owen, Krieg and Durchfeld-Meyer, 1999).

No intestino dos animais expostos ao *FB*, os machos e fêmeas desse grupo apresentaram lesões cujas incidências não diferiram estatisticamente dos respectivos controle, ou seja, apresentaram quase a mesma incidência das lesões encontradas nos animais apenas iniciados. Isso pode ser devido à fraca ação do *FB* sobre esse órgão. É provável que o mesmo tenha ocorrido nos animais tratados com 2'-AAF, principalmente nas fêmeas, que apresentaram poucas lesões proliferativas no intestino. No geral, o *FB* e o 2'-AAF não tiveram efeitos consistentes no intestino.

4.4 Efeitos da promoção com 2'-AAF

O agente genotóxico 2'-AAF é um potente hepatocarcinógeno; no ensaio DMBDD com ratos *Fischer* 344 este agente instala lesões proliferativas também na tireóide, estômago anterior e na bexiga urinária (Hagiwara, Tanaka,

Imaida, Tamano, Fukushima and Ito, 1993), órgãos que não foram estudados nesta oportunidade. No presente estudo, verificamos lesões preneoplásicas e neoplásicas hepáticas em quase todos os animais iniciados e expostos ao 2'-AAF. Além disso, este agente aumentou o número de focos GST-P⁺ no fígado de machos e fêmeas, mas não o tamanho desses, especialmente nas fêmeas. A indução enzimática das CYP 2B1/2B2 e 1A2 também ocorreu nos machos e fêmeas desse grupo, evidenciada, principalmente, pela incidência significativa de marcação difusa moderada a alta. O 2'-AAF também se mostrou melhor indutor de CYP 1A2 que o FB em ambos os sexos, atividade já relatada anteriormente, pela ativação do receptor nuclear *Ah* (Burt and Thorgeirsson, 1988, Sparfel, Payen, Gilot, Sidaway, Morel, Guillouzo and Fardel, 2003, Tateishi, Nakura, Asoh, Watanabe, Tanaka, Kumai and Kobayashi, 1999). Também, foi evidente a alta incidência de lesões hepáticas não neoplásicas, com destaque para a hipertrofia hepatocítica difusa, não tão incidente nos outros grupos estudados. Portanto, no geral, o 2'-AAF administrado após iniciação provocou o desenvolvimento de toda a sequência da carcinogênese hepática, desde focos de hepatócitos alterados até o aparecimento de neoplasias benignas significantes nos dois sexos e malignas nos machos.

Nos rins dos animais tratados com 2'-AAF, as lesões não neoplásicas encontradas podem ainda pertencer ao espectro da NCP em ambos os sexos. Não observamos adenomas e carcinomas tubulares renais nesse grupo, mas somente TMR, atribuíveis ao esquema de iniciação pelo DMBDD.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Em estudos sobre susceptibilidade de diferentes linhagens de ratos ao 2'-AAF e ao FB na etapa da promoção da carcinogênese hepática, foi observado que a linhagem *Wistar* parece resistente à iniciação pelo 2'-AAF (quando não precedido por agente iniciador), mas responde fortemente à sua influência promotora (após iniciação com DEN). Em relação aos ratos *Fischer* 344, os ratos *Wistar* foram menos suscetíveis à promoção por FB ou 2'-AAF (Asamoto, *et al.*, 1989, Asamoto, *et al.*, 1989). Os diferentes potenciais de promoção do FB e do 2'-AAF na presente revisão estão de acordo com as observações em roedores sobre as diferenças entre cancerígenos não-genotóxicos, como o FB, que têm ação organo-específica e menor potência cancerígena, e agentes genotóxicos, como o 2'-AAF, cuja atividade promotora é mais forte e de maior espectro (Cohen and Ellwein, 1992, Ito, *et al.*, 1992). De fato, todos os animais de ambos os sexos expostos ao 2'-AAF desenvolveram preneoplasias e neoplasias, resultando em carga tumoral significativamente maior que nos outros grupos. No conjunto, os resultados demonstram que o 2'-AAF atuou como promotor mais potente da carcinogênese nos ratos *Wistar* machos e fêmeas e, desta maneira, é um agente que pode ser utilizado como controle positivo no ensaio DMBDD^b.

Nesse estudo, ratos *Wistar* submetidos ao protocolo DMBDD^b desenvolveram lesões preneoplásicas e neoplásicas no fígado, intestino e rins de maneira variável entre os sexos, mas particularmente nos machos expostos ao 2'-AAF. Contudo, no conjunto os resultados são inconsistentes e muito variáveis quanto ao comportamento do rato *Wistar* a uma substância teste sob

influência do protocolo DMBDD^b. Ou seja, como discutido por Rocha (1998), a variabilidade genética característica da linhagem *Wistar* parece ser fator limitante no desenvolvimento de lesões preneoplásicas e neoplásicas induzidas pelo protocolo DMBDD^b (Rocha, 1998), dificultando o estabelecimento de um padrão de incidências de lesões decorrentes apenas do protocolo estudado. Uma alternativa, também seguida pelo NTP frente ao debate sobre o melhor modelo, é continuar o uso de linhagens isogênicas de rato para maximizar a reprodutibilidade da resposta tumorigênica e facilitar o monitoramento genético e interpretação de subseqüentes mecanismos de estudo (King-Herbert and Thayer, 2006).

No Brasil, essa experiência com o protocolo DMBDD^b para detectar o potencial cancerígeno de pesticidas foi utilizada particularmente como ferramenta para qualificar recursos humanos e difundir conhecimento sobre a avaliação da carcinogenicidade química (de Camargo, 2007). Em resumo, esta revisão de lesões histológicas no fígado, rins e intestinos de ratos *Wistar* submetidos ao protocolo DMBDD^b permite as seguintes conclusões:

- A iniciação da carcinogênese em múltiplos órgãos foi estabelecida com o protocolo DMBDD^b.
- Fígado, intestino e rins de ratos *Wistar* submetidos ao protocolo DMBDD^b desenvolveram lesões preneoplásicas e neoplásicas.
- Os resultados indicam atividade promotora do FB, embora de modo menos evidente que a do 2¹-AAF, particularmente nos machos.
- Assim, o presente estudo permitiu a construção de um banco de informações das lesões que caracteristicamente são encontradas

nestes três órgãos dos animais *Wistar* submetidos ao protocolo DMBDD^b.

- A interpretação dos resultados de ensaios DMBDD^b com a linhagem de ratos *Wistar* deve ser realizada de maneira cautelosa, levando em consideração o fato dela ser não-isogênica e predisposta a grande variabilidade de respostas morfológicas à exposições químicas.

6. REFERÊNCIAS

Amacher D.E., Schomaker S.J. & Burkhardt J.E. (1998) The relationship among microsomal enzyme induction, liver weight and histological change in rat toxicology studies. *Food Chem Toxicol* 36, 831-839.

Andersen M.E., Yang R.S., French C.T., Chubb L.S. & Dennison J.E. (2002) Molecular circuits, biological switches, and nonlinear dose-response relationships. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 6, 971-978.

Anver M.R. & Cohen B.J. (1979) Lesions associated with aging. In *The laboratory rat: Biology and diseases*. Eds J. B. Baker, J. R. Lindsey & S. H. Weisbroth. Academic Press pp 377-381p.

Asamoto M., Tsuda H., Kagawa M., de Camargo J.L., Ito N. & Nagase S. (1989) Strain differences in susceptibility to 2-acetylaminofluorene and phenobarbital promotion of rat hepatocarcinogenesis in a medium-term assay system: quantitation of glutathione S-transferase P-positive foci development. *Jpn J Cancer Res* 80, 939-944.

Asamoto M., Tsuda H., Kato T., Ito N., Masuko T., Hashimoto Y. & Nagase S. (1989) Strain differences in susceptibility to 2-acetylaminofluorene and phenobarbital promotion of hepatocarcinogenesis: immunohistochemical analysis of cytochrome P-450 isozyme induction by 2-acetylaminofluorene and phenobarbital. *Jpn J Cancer Res* 80, 1041-1046.

Avninder S., Ylaya K. & Hewitt S.M. (2008) Tissue microarray: a simple technology that has revolutionized research in pathology. *J Postgrad Med* 54, 158-162.

Bannasch P. (1986) Preneoplastic endpoints in carcinogenicity testing. I. Hepatic preneoplasia. *Carcinogenesis* 7, 689-695.

Bannasch P. & Zerban H. (1990) Tumors of the liver. In *Pathology of tumors in laboratory animals. Tumors of the rat*. Ed I. A. f. R. o. C.-. IARC. IARC Sci Publ pp 199-240.

Bannasch P. & Zerban H. (1997) Cholangiofibroma and cholangiocarcinoma. In *Monographs on Pathology of Laboratory Animals: Digestive System. The liver*. Eds T. C. Jones, J. A. Popp & U. Mohr. ILSI pp 63-82.

Bannasch P. & Zerban H. (1997) Spongiosis hepatitis and spongiotic pericytoma. In *Monographs on Pathology of Laboratory Animals: Digestive System. The liver*. Eds T. C. Jones, J. A. Popp & U. Mohr. ILSI pp 104-113.

Bannasch P., Zerban H. & Hacker H.J. (1997) Foci of altered hepatocytes, rat. In *Monographs on Pathology of Laboratory Animals: Digestive System. The Liver*. Eds T. C. Jones, J. A. Popp & U. Mohr. ILSI pp 3-37.

- Barbisan L.F., Spinardi Barbisan A.L.T., Moreira E.L.T., Salvadori D.M.F., Ribeiro L.R., da Eira A.F. & de Camargo J.L.V. (2003) *Agaricus blazei* (himematsutake) does not alter the development of rat diethylnitrosamine-initiated hepatic preneoplastic foci. *Cancer Science* 94, 188-192.
- Bird R. (1995) Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Letters* 93, 55-71.
- Booth N.H. (1992) Hipnóticos, sedativos e anticonvulsivantes. In *Farmacologia e terapêutica em veterinária*. Eds N. H. Booth & L. E. McDonald. Guanabara Koogan pp 219-230.
- Buhler R., Lindros K.O., Nordling A., Johansson I. & Ingelman-Sundberg M. (1992) Zonation of cytochrome P450 isozyme expression and induction in rat liver. *Eur J Biochem* 204, 407-412.
- Burt R.K. & Thorgeirsson S.S. (1988) Coinduction of MDR-1 multidrug-resistance and cytochrome P-450 genes in rat liver by xenobiotics. *J Natl Cancer Inst* 80, 1383-1386.
- Cohen S. & Ellwein L.B. (1992) Cell proliferation in carcinogenesis. *Science* 249, 1007-1011.
- Conney A.H., Davison C., Gastel R. & Burns J.J. (1960) Adaptive increases in drug-metabolizing enzymes induced by phenobarbital and other drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 130, 1-8.
- de Camargo J.L. (2007) The Brazilian experience with the medium-term multi-organ bioassay: scientific and regulatory developments. In *Simpósio: "Aim for establishing risk assessment of carcinogenesis - application of medium-term carcinogenesis bioassay system"*. Anais: DIMS Institute of Medical Science Inc. pp 119p.
- de Camargo J.L., Salvadori D.M., Rocha N.S., Barbisan L.F. & Ribeiro L.R. (1999) The Brazilian experience with the alternative initiated rat bioassay for carcinogenesis using a local Wistar rat strain. In *4Th Congress of Toxicology in Developing Countries*. pp 258.
- de Camargo J.L., Salvadori D.M., Rocha N.S., Barbisan L.F. & Ribeiro L.R. (1999) The detection of chemical carcinogens in an alternative medium-term bioassay. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science* 51, 22-26.
- Dietrich D.R. & Swenberg J.A. (1991) Preneoplastic lesions in rodent kidney induced spontaneously or by non-genotoxic agents: predictive nature and comparison to lesions induced by genotoxic carcinogens. *Mutat Res* 248, 239-260.

Dolara P., Caderni G., Lancioni L., Giannini A., Anastasi A., Fazi M. & Castiglione G. (1997) Aberrant crypt foci in human colon carcinogenesis. *Cancer Detect Prev* 21, 135-140.

Farber E. (1987) Liver cell cancer: insights into the pathogenesis of hepatocellular carcinoma in humans from experimental hepatocarcinogenesis in the rat. *Monogr Pathol*, 199-222.

Farber E. (1988) Cancer development and its natural history. A cancer prevention perspective. *Cancer* 62, 1676-1679.

FDA US Food and Drug Administration -. (1993) Toxicological principles for the safety assessment of direct food additives and color additives used in food. Redbook II. Federal Registration pp 16536-16537.

Fenoglio-Preiser C.M. & Noffsinger A. (1999) Aberrant crypt foci: A review. *Toxicol Pathol* 27, 632-642.

Fukushima S., Morimura K., Wanibuchi H., Kinoshita A. & Salim E.I. (2005) Current and emerging challenges in toxicopathology: carcinogenic threshold of phenobarbital and proof of arsenic carcinogenicity using rat medium-term bioassays for carcinogens. *Toxicol Appl Pharmacol* 207, 225-229.

Gart J.J., Krewski D., Lee P.N., Tarone R.E. & Wahrendorf J. (1986) Statistical methods in cancer research. Volume III--The design and analysis of long-term animal experiments. *IARC Sci Publ*, 1-219.

Giknis M.L.A. & Clifford C.B. (2003) Spontaneous neoplasms and survival in Wistar rats: compilation of control group data. Charles River Laboratories.

Goodman D.G., Maronpot R.R., Newberne P.M., Popp J.A. & Squire R.A. (1994) Proliferative and selected other lesions in the liver of rats. In *Standardized System of Nomenclature and Diagnostic Criteria - Guides for Toxicologic Pathology*. Eds C. S. Street, J. D. Burek, J. F. Hardisty, F. M. Garner, J. R. Leininger, J. M. Pletscher & R. W. Moch. STP/ARF/AFIP pp 1-24.

Grasso P., Sharratt M. & Cohen A.J. (1991) Role of persistent, non-genotoxic tissue damage in rodent cancer and relevance to humans. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 31, 253-287.

Hagiwara A., Matsuda T., Tamano S., Kitano M., Imaoka S., Funae Y., Takesada Y., Shirai T. & Fukushima S. (1996) Dose-related increases in quantitative values for altered hepatocytic foci and cytochrome P-450 levels in the livers of rats exposed to phenobarbital in a medium-term bioassay. *Cancer Lett* 110, 155-162.

Hagiwara A., Tanaka H., Imaida K., Tamano S., Fukushima S. & Ito N. (1993) Correlation between medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay data and long-term observation results in rats. *Jpn J Cancer Res* 84, 237-245.

- Hagiwara A., Tiwawech D., Imaida K., Tamano S., Shibata M.A., Fukushima S. & Ito N. (1993) Modifying influence of prior treatment with toxic agents on induction of preneoplastic and neoplastic lesions in a medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay. *Teratog Carcinog Mutagen* 13, 277-287.
- Hard G.C. (1990) Tumours of the kidney, renal pelvis and ureter. In *Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the rat*. Ed I. A. f. R. o. C.-. IARC. IARC Sci Publ pp 301-344.
- Hard G.C. (2002) Significance of the renal effects of ethyl benzene in rodents for assessing human carcinogenic risk. *Toxicol Sci* 69, 30-41.
- Hard G.C., Alden C.L., Bruner R.H., Frith C.H., Lewis R.M., Owen R.A., Krieg K. & Durchfeld-Meyer B. (1999) Non-proliferative lesions of the kidney and lower urinary tract in rats. In *Standardized System of Nomenclature and Diagnostic Criteria - Guides for Toxicologic Pathology*. Eds C. S. Street, J. D. Burek, J. F. Hardisty, F. M. Garner, J. R. Leininger, J. M. Pletscher & R. W. Moch. STP/ARP/AFIP pp 1-32.
- Hard G.C., Alden C.L., Stula E.F. & Trump B.F. (1995) Proliferative lesions of the kidney in rats. In *Standardized System of Nomenclature and Diagnostic Criteria - Guides for Toxicologic Pathology*. Eds C. S. Street, J. D. Burek, J. F. Hardisty, F. M. Garner, J. R. Leininger, J. M. Pletscher & R. W. Moch. STP/ARP/AFIP pp 1-19.
- Hard G.C., Seely J.C., Betz L.J. & Hayashi S.M. (2007) Re-evaluation of the kidney tumors and renal histopathology occurring in a 2-year rat carcinogenicity bioassay of quercetin. *Food Chem Toxicol* 45, 600-608.
- Hard G.C., Whysner J., English J.C., Zang E. & Williams G.M. (1997) Relationship of hydroquinone-associated rat renal tumors with spontaneous chronic progressive nephropathy. *Toxicol Pathol* 25, 132-143.
- Hasegawa R., Tanaka H., Tamano S., Shirai T., Nagao M., Sugimura T. & Ito N. (1994) Synergistic enhancement of small and large intestinal carcinogenesis by combined treatment of rats with five heterocyclic amines in a medium-term multi-organ bioassay. *Carcinogenesis* 15, 2567-2573.
- Hirokawa K. (1975) Characterization of age-associated kidney disease in Wistar rats. *Mech Ageing Dev* 4, 301-316.
- Hoel D.G., Kaplan N.L. & Anderson M.W. (1983) Implication of nonlinear kinetics on risk estimation in carcinogenesis. *Science* 219, 1032-1037.
- Hsu S.M., Raine L. & Fanger H. (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29, 577-580.

Huff J., Haseman J. & Rall D. (1991) Scientific concepts, value, and significance of chemical carcinogenesis studies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 31, 621-652.

IARC International Agency for Research on Cancer.-. (1986) Long-term and short-term assays for carcinogens: a critical appraisal. *IARC Sci Publ* 146.

IARC International Agency for Research on Cancer.-. (1999) The use of short- and medium-term tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation. *IARC Sci Publ* 83.

IBAMA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.-. (1996) Portaria Normativa N 84 de 25 de outubro de 1996. *Diário Oficial da União* pp 21358-21366.

Ito N., Hasegawa R., Imaida K., Hirose M. & Shirai T. (1996) Medium-term liver and multi-organ carcinogenesis bioassays for carcinogens and chemopreventive agents. *Exp Toxicol Pathol* 48, 113-119.

Ito N. & Imaida K. (1992) Strategy of research for cancer--chemoprevention. *Teratog Carcinog Mutagen* 12, 79-95.

Ito N., Shirai T. & Hasegawa R. (1992) Medium-term bioassays for carcinogens. *IARC Sci Publ*, 353-388.

Khan K.N.M. & Alden C.L. (2002) *Kidney. In: Handbook of Toxicologic Pathology*. Academic Press.

King-Herbert A. & Thayer K. (2006) NTP workshop: animal models for the NTP rodent cancer bioassay: stocks and strains--should we switch? *Toxicol Pathol* 34, 802-805.

Maronpot R.R., Giles H.D., Dykes D.J. & Irwin R.D. (1991) Furan-induced hepatic cholangiocarcinomas in Fischer 344 rats. *Toxicol Pathol* 19, 561-570.

Martignoni M., de Kanter R., Grossi P., Mahnke A., Saturno G. & Monshouwer M. (2004) An in vivo and in vitro comparison of CYP induction in rat liver and intestine using slices and quantitative RT-PCR. *Chem Biol Interact* 151, 1-11.

McMartin D.N., Sahota P.S., Gunson D.E., Hsu H.H. & Spaet R.H. (1992) Neoplasms and related proliferative lesions in control Sprague-Dawley rats from carcinogenicity studies. Historical data and diagnostic considerations. *Toxicol Pathol* 20, 212-225.

Mohr U. (1992) International Classification of Rodent Tumors. Part I - The rat. *IARC Sci Publ* 122, 1-46.

Moreira E.L., de Camargo J.L., Rodrigues M.A., Barbisan L.F. & Salvadori D.M. (2000) Dose- and sex-related carcinogenesis by N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine in Wistar rats. *Jpn J Cancer Res* 91, 368-374.

- Nims R.W., Devor D.E., Henneman J.R. & Lubet R.A. (1987) Induction of alkoxyresorufin O-dealkylases, epoxide hydrolase, and liver weight gain: correlation with liver tumor-promoting potential in a series of barbiturates. *Carcinogenesis* 8, 67-71.
- Parkinson A. (2001) Biotransformation of xenobiotics. In *Cassarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. Ed C. D. Klassen. Medical Publishing Division pp 133-224.
- Pitot H.C. (1989) Progression: the terminal stage in carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 80, 599-607.
- Pitot H.C. (1993) The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer* 72, 962-970.
- Pitot H.C. & Dragan Y. (2001) Chemical carcinogenesis. In *Cassarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. Ed C. D. Klassen. Medical Publishing Division pp 241-319.
- Poteracki J. & Walsh K.M. (1998) Spontaneous neoplasms in control Wistar rats: a comparison of reviews. *Toxicol Sci* 45, 1-8.
- Rocha N.S. (1998) Padronização morfológica de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas em *Rattus norvegicus* (Wistar) submetidos ao protocolo de carcinogênese de média duração em múltiplos órgãos. In *Tese de doutoramento. Curso de Pós-Graduação em Patologia*. Faculdade de Medicina, UNESP pp 95.
- Rodrigues M.A., Silva L.A.G., Salvadori D.M., de Camargo J.L. & Montenegro M.R. (2002) Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35, 351-355.
- Salvadori D.M., Rocha N.S., Ribeiro L.R. & de Camargo J.L. (1997) A detecção de substâncias cancerígenas em bioensaios alternativos de média-duração. *Acta Toxicologica Argentina* 5, 75-76.
- Satoh K., Kitahara A., Soma Y., Inaba Y., Hatayama I. & Sato K. (1985) Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase: a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 3964-3968.
- Seely J.C. & Hard G.C. (2008) Chronic progressive nephropathy (CPN) in the rat: review of the pathology and relationship to renal tumorigenesis. *Journal of Toxicologic Pathology* 21, 199-205.
- Sparfel L., Payen L., Gilot D., Sidaway J., Morel F., Guillouzo A. & Fardel O. (2003) Pregnane X receptor-dependent and -independent effects of 2-acetylaminofluorene on cytochrome P450 3A23 expression and liver cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 278-284.

Stricker T.P. & Kumar V. (2008) Neoplasia. In *Robbins - Patologia Básica*. Eds V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto & R. N. Mitchell. Elsevier pp 237.

Swanson G.M. (1988) Cancer prevention in the workplace and natural environment. A review of etiology, research design, and methods of risk reduction. *Cancer* 62, 1725-1746

Takayama T., Katsuki S., Takahashi Y., Ohi M., Nojiri S., Sakamaki S., Kato J., Kogawa K., Miyake H. & Niitsu Y. (1998) Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *New England Journal of Medicine* 339, 1277-1284

Tateishi T., Nakura H., Asoh M., Watanabe M., Tanaka M., Kumai T. & Kobayashi S. (1999) Multiple cytochrome P-450 subfamilies are co-induced with P-glycoprotein by both phenothiazine and 2-acetylaminofluorene in rats. *Cancer Lett* 138, 73-79.

Watanabe J., Mondo H., Takamori Y., Takeda K. & Kanamura S. (2000) Effect of phenobarbital on intralobular expression of CYP2B1/2 in livers of rats: difference in the expression between single and repetitive administrations. *Biochem Pharmacol* 60, 285-291.

Westein I.B. (1988) The origins of human cancer: molecular mechanism of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. *Cancer Res* 48, 4135-4143.

Williams G.M. & Iatropoulos M.J. (2002) Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity. *Toxicol Pathol* 30, 41-53.

Williams G.M., Iatropoulos M.J. & Jeffrey A.M. (2004) Thresholds for the effects of 2-acetylaminofluorene in rat liver. *Toxicol Pathol* 32 Suppl 2, 85-91.

Zwicker G.M., Eyster R.C., Sells D.M. & Gass J.H. (1992) Naturally occurring intestinal epithelial neoplasms in aged Crl:CD BR rats. *Toxicol Pathol* 20, 253-259.

Tabela 1. Peso corpóreo médio inicial e final e ganho de peso dos animais dos diferentes grupos ao final dos experimentos.

Grupos	N° efetivo de animais	Peso corpóreo (g) ²		
		Inicial	Final	Ganho ⁴
Machos				
Controle negativo	48	187,40±36,43	421,77±44,46	234,37±39,62
Iniciados	72	181,08±37,74	394,37±50,92*	213,67±54,07
Iniciados + FB ³	72	183,18±38,72	405,03±47,28	222,71±50,73
Iniciados + 2'-AAF	12	140,75±11,99 ^{1*}	331,25±61,62*	190,50±63,36
Fêmeas				
Controle negativo	50	150,68±18,32	271,74±30,09	121,06±37,82
Iniciados	70	144,46±19,78	255,36±23,39*	110,33±32,76
Iniciados + FB ³	71	149,06±22,54	259,04±21,32	109,99±28,67 ¹
Iniciados + 2'-AAF	14	130,50±8,64 ^{1*}	255,36±22,92	124,86±21,05 ¹

¹ Análise estatística de dados não paramétricos; ² Valores apresentados na forma de média ± DP; Iniciados: Animais iniciados com protocolo DMBDD^b; Iniciados + FB: Animais iniciados e tratados com fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno; ³ Grupo composto por animais expostos às doses de 0,05, 0,075 e 0,10% de FB; ⁴ Análise estatística do ganho de peso obtido por: peso corpóreo final – peso corpóreo inicial; *Significativamente diferente do respectivo grupo controle quando p<0,05.

Tabela 2. Consumo médio de água (ml/dia/animal) de ratos *Wistar* machos e fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD^b.

Grupos	N° efetivo de animais	Semanas ²		
		1 e 2	3 e 4	6 a 30
Machos				
Controle negativo	48	36,51±5,65	38,43±8,37	41,28±6,33
Iniciados	72	33,35±4,98	29,06±5,96*	36,37±4,42 ^{1*}
Iniciados + FB ³	72	35,07±5,02	29,54±6,67	39,63±3,83*
Iniciados + 2'-AAF	12	36,85±3,18	32,8±1,84	33,93±5,05
Fêmeas				
Controle negativo	50	31,67±6,31	31,49±4,68	32,15±5,35
Iniciados	70	31,3±7,22	25,87±6,44*	29,54±4,35
Iniciados + FB ³	71	29,87±6,92	25,87±7,03	30,78±4,09
Iniciados + 2'-AAF	14	34,75±2,76	36,3±1,70	30,09±3,19

¹ Análise estatística de dados não paramétricos; ² Valores apresentados na forma de média ± DP; Iniciados: Animais iniciados com protocolo DMBDD^b; Iniciados + FB: Animais iniciados e tratados com fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno; ³ Grupo composto por animais expostos às doses de 0,05, 0,075 e 0,10% de FB; *Significativamente diferente do respectivo grupo controle quando p<0,05.

Tabela 3. Consumo médio de ração (g/dia/animal) de ratos *Wistar* machos e fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD^b.

Grupos	N° efetivo de animais	Semanas ²		
		1 e 2	3 e 4	6 a 30
Machos				
Controle negativo	48	22,13±3,00	24,33±3,72	23,96±4,85
Iniciados	72	19,37±2,55	15,96±2,67*	22,82±3,53
Iniciados + FB ³	72	20,65±3,44 ¹	16,00±2,42	26,99±4,77*
Iniciados + 2'-AAF	12	19,6±0,57 ¹	14,85±0,92	22,81±4,86
Fêmeas				
Controle negativo	50	19,19±3,40	19,07±1,35	18,94±3,56
Iniciados	70	15,37±3,27	11,67±3,20*	18,64±3,95
Iniciados + FB ³	71	15,9±3,64	12,27±2,77	20,85±4,77*
Iniciados + 2'-AAF	14	16,45±0,07	12,25±0,64	18,4±4,55

¹ Análise estatística baseada em dados não paramétricos; ² Valores apresentados na forma de média ± DP; Iniciados: Animais iniciados com protocolo DMBDD^b; Iniciados + FB: Animais iniciados e tratados com fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno; ³ Grupo composto por animais expostos às doses de 0,05, 0,075 e 0,10% de FB; *Significamente diferente do respectivo grupo controle quando p<0,05.

Tabela 4. Peso médio relativo² de órgãos de ratos *Wistar* machos e fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD^b.

Grupos	N° efetivo de animais	Peso corpóreo final	Fígado	Rim direito ¹	Rim esquerdo ¹
Machos					
Controle negativo	48	421,77±44,46	3,15±0,58	0,29±0,03	0,29±0,03
Iniciados	72	394,37±50,92*	3,05±0,47	0,30±0,03	0,35±0,34
Iniciados + FB³	71	405,03±47,28	3,58±0,50*	0,32±0,07*	0,31±0,03*
Iniciados + 2'-AAF	12	331,25±61,62*	4,60±0,69*	0,32±0,04*	0,31±0,04
Fêmeas					
Controle negativo	50	271,74±30,09	3,27±0,58	0,31±0,03	0,30±0,03
Iniciados	69	255,36±23,39*	3,47±0,41	0,41±0,45*	0,35±0,11*
Iniciados + FB³	71	259,04±21,32	3,84±0,74 ^{1*}	0,34±0,07	0,32±0,05
Iniciados + 2'-AAF	14	255,36±22,92	4,65±0,82 ^{1*}	0,35±0,07	0,36±0,13

¹ Análise estatística baseada em dados não paramétricos; ² Valores apresentados na forma de média ± DP; Iniciados: Animais iniciados com protocolo DMBDD^b; Iniciados + FB: Animais iniciados e tratados com fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno; ³ Grupo composto por animais expostos às doses de 0,05, 0,075 e 0,10% de FB; *Significativamente diferente do respectivo grupo controle quando p<0,05.

Tabela 5. Incidência (%) de lesões hepáticas preneoplásicas e neoplásicas em ratos *Wistar* machos submetidos ao protocolo DMBDD^b.

Grupos	Controle negativo (%)	Iniciados (%)	Iniciados + FB (%)			Iniciados + 2'-AAF
			0,05%	0,075%	0,10%	
Nº efetivo de animais	45	69	38	19	11	12
Lesões preneoplásicas						
Focos de células claras	0	28*(40)	13(34)	7(37)	7(64)	10*(83)
Focos eosinofílicos	4(9)	44*(64)	35*(92)	18*(95)	11*(100)	12*(100)
Focos basofílicos	3(7)	13(19)	7(18)	3(16)	6*(54)	6*(50)
Focos anofílicos	1(2)	9(13)	2(5)	0	0	7*(58)
Total de animais com focos de hepatócitos alterados	8(18)	57*(83)	36(95)	18(95)	11(100)	12(100)
Lesões neoplásicas						
Adenoma	0	13*(19)	3(8)	19*(100)	8*(73)	12*(100)
Colangioma	0	3(4)	1(3)	0	3*(27)	10*(83)
Hepatocarcinoma	0	0	0	0	1(9)	0
Colangiocarcinoma	0	1(1)	0	1(5)	1(9)	2(17)
Hepatocolangiocarcinoma	0	0	0	1(5)	0	0
Leucemia	0	0	0	1(5)	0	0
Angiosarcoma	0	0	0	0	0	1(8)

Iniciados: Animais iniciados com protocolo DMBDD^b; Iniciados + FB: Animais iniciados e tratados com fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno; *Significativamente diferente do respectivo grupo controle quando $p < 0,05$.

Tabela 6. Incidência (%) de lesões hepáticas preneoplásicas e neoplásicas em ratos *Wistar* fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD^b.

Grupos	Controle negativo (%)	Iniciados (%)	Iniciados + FB (%)			Iniciados + 2'-AAF (%)
			0,05%	0,075%	0,10%	
Nº efetivo de animais	50	68	38	18	15	14
Lesões preneoplásicas						
Focos de células claras	0	25*(37)	18(47)	2(11)	9(60)	14*(100)
Focos eosinofílicos	1(2)	41*(60)	31*(82)	18*(100)	15*(100)	14*(100)
Focos basofílicos	1(2)	14*(21)	1*(3)	9*(50)	9*(60)	1(7)
Focos anfofílicos	2(4)	3(4)	4(10)	0	4*(27)	3(21)
Total de animais com focos de hepatócitos alterados	3(6)	58*(85)	35(92)	18(100)	15(100)	14(100)
Lesões neoplásicas						
Adenoma	0	17*(25)	14(37)	18*(100)	9*(60)	11*(79)
Colangioma	0	6(9)	4(11)	10*(56)	2(13)	10*(71)
Hepatocarcinoma	0	0	2(5)	3*(17)	0	0
Colangiocarcinoma	0	0	0	1(6)	1(7)	0

Iniciados: Animais iniciados com protocolo DMBDD^b; Iniciados + FB: Animais iniciados e tratados com fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno; *Significativamente diferente do respectivo grupo controle quando $p < 0,05$.

Tabela 7. Incidência (%) de lesões hepáticas não neoplásicas em ratos *Wistar* machos submetidos ao protocolo DMBDD^b.

Grupos	Controle negativo (%)	Iniciados (%)	Iniciados + FB (%)			Iniciados + 2'-AAF (%)
			0,05%	0,075%	0,10%	
Nº efetivo de animais	45	69	38	19	11	12
Hiperplasia de ductos biliares	9(20)	51*(74)	38*(100)	19*(100)	11(100)	12(100)
Hiperplasia de células ovais	1(2)	36*(52)	23(61)	18*(95)	11*(100)	12*(100)
Cariomegalia	0	12*(17)	14*(37)	18*(95)	11*(100)	12*(100)
Hipertrofia centrolobular	14(31)	18(26)	16(42)	15*(79)	10*(91)	0
Hipertrofia difusa	1(2)	4(6)	3(8)	1(5)	1(9)	10*(83)
Esteatose focal	15(33)	25(36)	15(39)	15*(79)	5(45)	5(42)
Esteatose difusa	16(36)	39*(57)	17(45)	3*(16)	11*(100)	5(42)
Cisto biliar único	1(2)	5(7)	12*(32)	2(10)	0	0
Cistos biliares múltiplos	2(4)	51*(74)	19*(50)	17(89)	11(100)	12(100)
Necrose individual	0	1(1)	0	10*(53)	0	2(17)
Necrose focal	0	1(1)	0	0	1(9)	3*(25)
Colangiofibrose	0	3(4)	1(3)	11*(58)	2(18)	7*(58)
Degeneração cística	0	30*(43)	6*(16)	18*(95)	7(64)	0*
Infiltrado inflamatório	18(40)	54*(78)	25(66)	12(63)	6(55)	9(75)
Colangite	0	0	0	5*(26)	0	9*(75)
Angiectasia	0	0	0	2*(11)	0	0
Colestase biliar	1(2)	3(4)	0	1(5)	1(9)	0

Iniciados: Animais iniciados com protocolo DMBDD^b; Iniciados + FB: Animais iniciados e tratados com fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno; *Significativamente diferente do respectivo grupo controle quando $p < 0,05$.

Tabela 8. Incidência (%) de lesões hepáticas não neoplásicas em ratos *Wistar* fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD^b.

Grupos	Controle negativo (%)	Iniciados (%)	Iniciados + FB (%)			Iniciados + 2'-AAF (%)
			0,05%	0,075%	0,10%	
Nº efetivo de animais	50	68	38	18	15	14
Hiperplasia de ductos biliares	10(20)	64*(94)	38(100)	18(100)	15(100)	14(100)
Hiperplasia de células ovais	3(6)	43*(63)	31(82)	14(78)	15*(100)	14*(100)
Cariomegalia	0	11*(16)	21*(55)	17*(94)	13*(87)	14*(100)
Hipertrofia centrolobular	0	5(7)	17*(45)	6*(33)	8*(53)	0
Hipertrofia difusa	0	4(6)	6(16)	5*(28)	3(20)	11*(79)
Esteatose focal	12(24)	33*(49)	18(47)	14(78)	7(47)	9(64)
Esteatose difusa	17(34)	23(34)	7(18)	3(17)	4(27)	4(29)
Cisto biliar único	0	4(6)	1(3)	0	0	0
Cistos biliares múltiplos	1(2)	58*(85)	37(97)	18(100)	15(100)	14(100)
Necrose individual	0	3(4)	1(3)	8*(44)	1(7)	8*(57)
Necrose focal	0	3(4)	3(8)	1(6)	3(20)	4*(29)
Colangiofibrose	0	6(9)	10*(26)	9*(50)	6*(40)	14*(100)
Degeneração cística	0	21*(31)	3*(8)	18*(100)	9(60)	0*
Infiltrado inflamatório	19(38)	38(56)	24(63)	14(78)	6(40)	10(71)
Colangite	0	1(1)	0	1(6)	0	13*(93)
Angiectasia	0	0	0	1(6)	0	0
Colestase biliar	0	10*(15)	1(3)	6(33)	6*(40)	1(7)

Iniciados: Animais iniciados com protocolo DMBDD^b; Iniciados + FB: Animais iniciados e tratados com fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno; *Significativamente diferente do respectivo grupo controle quando $p < 0,05$.

Tabela 9. Número de focos¹ GST-P⁺ (por cm²) e área agregada de focos (mm²/cm²) em fígado de ratos *Wistar* machos e fêmeas iniciados para carcinogênese pelo protocolo DMBDD^b.

Grupos	N° efetivo de animais	N° de Focos/cm ²			Área Agregada de Focos/Área Hepática (mm ² /cm ²)		
		0,25	Mediana	0,75	0,25	Mediana	0,75
Machos							
Controle negativo	37	0	0	0	0	0	0
Iniciados	56	2,90	5,20*	7,63	0,11	0,32*	0,65
Total Iniciados + FB	59	4,14	8,03*	13,25	0,14	0,46	1,12
- Iniciados + 0,05% FB	36	2,69	5,45	10,38	0,07	0,21	0,38
- Iniciados + 0,075% FB	10	12,02	16,99*	20,85	1,67	2,03*	3,35
- Iniciados + 0,10% FB	13	5,80	6,89*	15,77	0,56	0,89*	1,27
Iniciados + 2'-AAF	9	5,13	11,39*	14,61	0,24	0,519	1,04
Fêmeas							
Controle negativo	40	0	0	0	0	0	0
Iniciados	54	3,54	5,96*	8,67	0,14	0,36*	0,99
Total Iniciados + FB	61	5,29	10,32*	15,84	0,27	0,87*	2,14
- Iniciados + 0,05% FB	36	4,24	6,98	11,17	0,13	0,32	0,75
- Iniciados + 0,075% FB	10	14,60	16,93*	23,10	2,63	4,13*	4,46
- Iniciados + 0,10% FB	15	9,56	11,36*	15,67	0,92	1,65*	2,88
Iniciados + 2'-AAF	6	8,85	11,051*	26,72	0,39	0,514	0,88

¹ Focos >0,15 mm de diâmetro; Iniciados: Animais iniciados com protocolo DMBDD^b; Iniciados + 0,05; 0,075; 0,10% FB: Animais iniciados e tratados com três concentrações de fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno; *Significativamente diferente do respectivo grupo controle quando p<0,05.

Tabela 10. Imunoistoquímica hepática para CYP 2B1/2B2 em ratos *Wistar* submetidos ao protocolo DMBDD^b.

Grupos	Controle negativo (%)	Iniciados (%)	Iniciados + FB ² (%)	Iniciados + 2'-AAF (%)
Nº efetivo de animais	10	10	10	10
Machos				
Negativa	2(20)	1(10)	0	0
Méiozonal				
- leve	0	2(20)	0	0
- moderada	0	0	0	4(40)*
- alta	0	0	0	0
Centrolobular				
- leve	8(80)	9(90)	0*	0*
- moderada	0	0	0	1(10)
- alta	0	0	9(90)*	3(30)
Difusa				
- leve	0	1(10)	0	0
- moderada	0	0	0	1(10)
- alta	0	0	1(10)	5(50)*
Fêmeas				
Negativa	1(10)	0	0	1(10)
Méiozonal				
- leve	0	5(50)*	0*	0*
- moderada	0	0	1(10)	4(40)*
- alta	0	0	1(10)	1(10)
Centrolobular				
- leve	7(70)	5(50)	0*	0*
- moderada	2(20)	3	1(10)	0
- alta	0	0	8(80)*	5(50)*
Difusa				
- leve	0	2(20)	0	0
- moderada	0	0	0	0
- alta	0	0	1(10)	4(40)*

Iniciados: Animais iniciados com protocolo DMBDD^b; Iniciados + FB: Animais iniciados e tratados com fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno; ²Grupo composto por animais expostos às doses de 0,05, 0,075 e 0,10% de FB; *Significativamente diferente do respectivo grupo controle quando $p < 0,05$.

Tabela 11. Imunoistoquímica hepática para CYP 1A2 em ratos *Wistar* submetidos ao protocolo DMBDD^b.

Grupos	Controle negativo (%)	Iniciados (%)	Iniciados + FB ² (%)	Iniciados + 2'-AAF (%)
Nº efetivo de animais	10	10	10	10
Machos				
Negativa	2(20)	1(10)	0	0
Médiozonal				
- leve	0	0	1(10)	0
- moderada	0	0	0	0
- alta	0	0	0	0
Centrolobular				
- leve	4(40)	6(60)	6(60)	0*
- moderada	3(30)	0	0	0
- alta	0	0	0	1(10)
Difusa				
- leve	0	1(10)	1(10)	0
- moderada	1(10)	2(20)	3(30)	1(10)
- alta	0	0	0	8(80)*
Fêmeas				
Negativa	0	0	0	0
Médiozonal				
- leve	0	0	0	0
- moderada	0	0	0	0
- alta	0	0	0	0
Centrolobular				
- leve	9(90)	6(60)	7(70)	0*
- moderada	1(10)	0	2(20)	0
- alta	0	0	0	0
Difusa				
- leve	0	4(40)*	1(10)	0*
- moderada	0	0	0	3(30)
- alta	0	0	0	7(70)*

Iniciados: Animais iniciados com protocolo DMBDD^b; Iniciados + FB: Animais iniciados e tratados com fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno; ²Grupo composto por animais expostos às doses de 0,05, 0,075 e 0,10% de FB; *Significamente diferente do respectivo grupo controle quando $p < 0,05$.

Tabela 12. Incidência (%) de lesões renais preneoplásicas e neoplásicas em ratos *Wistar* machos submetidos ao protocolo DMBDD^b.

Grupos	Controle negativo (%)	Iniciados (%)	Iniciados + FB ¹ (%)	Iniciados + 2'-AAF (%)
Nº efetivo de animais	45	69	68	12
Hiperplasia tubular atípica	1(2)	9(13)	23*(34)	1(8)
Adenoma tubular renal	0	10*(14)	5(7)	0
Carcinoma tubular renal	0	3(4)	6(9)	0
Tumor mesenquimal renal	0	14*(20)	14(21)	2(17)

Iniciados: Animais iniciados com protocolo DMBDD^b; Iniciados + FB: Animais iniciados e tratados com fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno; ¹Grupo composto por animais expostos às doses de 0,05, 0,075 e 0,10% de FB; *Significamente diferente do respectivo grupo controle quando $p < 0,05$.

Tabela 13. Incidência (%) de lesões renais preneoplásicas e neoplásicas em ratos *Wistar* fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD^b.

Grupos	Controle negativo (%)	Iniciados (%)	Iniciados + FB ² (%)	Iniciados + 2'-AAF (%)
Nº efetivo de animais	50	68	71	14
Hiperplasia tubular atípica	0	19*(28)	22(31)	1(7)
Adenoma tubular renal	0	11*(16)	12(17)	0
Carcinoma tubular renal	0	7(10)	3(4)	0
Tumor mesenquimal renal	0	44*(65)	32*(45)	4*(29)

Iniciados: Animais iniciados com protocolo DMBDD^b; Iniciados + FB: Animais iniciados e tratados com fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno; ¹Grupo composto por animais expostos às doses de 0,05, 0,075 e 0,10% de FB; *Significamente diferente do respectivo grupo controle quando $p < 0,05$.

Tabela 14. Incidência (%) de lesões renais não neoplásicas em ratos *Wistar* machos submetidos ao protocolo DMBDD^b.

Grupos	Controle negativo (%)	Iniciados (%)	Iniciados + FB ¹ (%)	Iniciados + 2'-AAF (%)
Nº efetivo de animais	45	69	68	12
Hiperplasia tubular simples	11(24)	32*(46)	38(56)	6(50)
Cilindros hialinos	8(18)	27*(39)	33(48)	9*(75)
Túbulos císticos	0	1(1)	6(9)	0
Infiltrado inflamatório	5(11)	7(10)	8(12)	1(8)
Pigmentação célula tubular	1(2)	9(13)	14(21)	1(8)

Iniciados: Animais iniciados com protocolo DMBDD^b; Iniciados + FB: Animais iniciados e tratados com fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno; ¹Grupo composto por animais expostos às doses de 0,05, 0,075 e 0,10% de FB; *Significativamente diferente do respectivo grupo controle quando $p < 0,05$.

Tabela 15. Incidência (%) de lesões renais não neoplásicas em ratos *Wistar* fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD^b.

Grupos	Controle negativo (%)	Iniciados (%)	Iniciados + FB ¹ (%)	Iniciados + 2'-AAF (%)
Nº efetivo de animais	50	68	71	14
Hiperplasia tubular simples	4(8)	25*(37)	26(37)	5(36)
Cilindros hialinos	12(24)	10(15)	12(17)	3(21)
Túbulos císticos	2(4)	8(12)	6(8)	2(14)
Infiltrado inflamatório	4(8)	2(3)	3(4)	1(7)
Pigmentação célula tubular	10(20)	23(34)	45*(64)	0*

Iniciados: Animais iniciados com protocolo DMBDD^b; Iniciados + FB: Animais iniciados e tratados com fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno; ¹Grupo composto por animais expostos às doses de 0,05, 0,075 e 0,10% de FB; *Significativamente diferente do respectivo grupo controle quando $p < 0,05$.

Tabela 16. Incidência (%) de lesões intestinais em ratos *Wistar* machos submetidos ao protocolo DMBDD^b.

Grupos	Controle negativo (%)	Iniciados (%)	Iniciados + FB ¹ (%)	Iniciados + 2'-AAF (%)
Nº efetivo de animais	45	69	68	12
Colón proximal				
Foco criptas aberrantes	0	0	1(1)	0
Adenoma	0	1(1)	3(4)	0
Adenocarcinoma	0	4(6)	2(3)	0
Colón médio				
Foco criptas aberrantes	0	3(4)	3(4)	1(8)
Adenoma	0	4(6)	2(3)	0
Adenocarcinoma	0	7(10)	10(15)	3(25)
Cólon distal				
Foco criptas aberrantes	0	4(6)	2(3)	1(8)
Adenoma	0	2(3)	7(10)	0
Adenocarcinoma	0	10*(14)	11(16)	5*(42)
Duodeno				
Adenocarcinoma	0	2(3)	3(4)	0
Jejuno				
Adenocarcinoma	0	0	1(1)	0
Íleo				
Adenoma	0	1(1)	3(4)	0
Adenocarcinoma	0	1(1)	3(4)	1(8)

Iniciados: Animais iniciados com protocolo DMBDD; Iniciados + FB: Animais iniciados e tratados com fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno; ¹Grupo composto por animais expostos às doses de 0,05, 0,075 e 0,10% de FB; *Significativamente diferente do respectivo grupo controle quando $p < 0,05$.

Tabela 17. Incidência (%) de lesões intestinais em ratos *Wistar* fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD^b.

Grupos	Controle negativo (%)	Iniciados (%)	Iniciados + FB ¹ (%)	Iniciados + 2'-AAF (%)
Nº efetivo de animais	50	68	71	14
Colón proximal				
Adenoma	0	2(3)	1(1)	0
Adenocarcinoma	0	2(3)	3(4)	0
Colón médio				
Foco criptas aberrantes	0	5(7)	5(7)	0
Adenoma	0	1(1)	2(3)	0
Adenocarcinoma	0	7(10)	5(7)	1(7)
Cólon distal				
Foco criptas aberrantes	0	2(3)	1(1)	1(7)
Adenoma	0	0	1(1)	1(7)
Adenocarcinoma	0	7(10)	4(6)	1(7)
Duodeno				
Adenoma	0	0	0	1*(7)
Jejuno				
Adenocarcinoma	0	1(1)	0	0
Íleo				
Adenocarcinoma	0	1(1)	1(1)	1(7)

Iniciados: Animais iniciados com protocolo DMBDD^b; Iniciados + FB: Animais iniciados e tratados com fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno; ¹Grupo composto por animais expostos às doses de 0,05, 0,075 e 0,10% de FB; *Significativamente diferente do respectivo grupo controle quando $p < 0,05$.

Tabela 18. Incidência¹ (%) e frequência de neoplasias e preneoplasias em fígado, rins e intestinos de ratos *Wistar* machos submetidos ao protocolo DMBDD^b.

Grupos	Controle negativo (%)	Iniciados (%)	Iniciados + FB ³ (%)	Iniciados + 2'-AAF (%)
Nº efetivo de animais	45	69	68	12
Total de animais com preneoplasias	9(20)	57*(83)	65*(96)	12(100)
Com > 01 neoplasia	0	21*(30)	30(44)	10*(83)
Só com neoplasia benignas	0	8*(12)	14(21)	5*(42)
Só com neoplasia malignas	0	14*(20)	13(19)	0
Com neoplasias benignas e malignas	0	17*(25)	24(35)	7*(58)
Total de animais com neoplasias	0	39*(56)	51*(75)	12*(100)
² Nº neoplasias benignas	0	34*	53	22
² Nº neoplasias malignas	0	38*	47*	11*
² Total de neoplasias	0	72*	100*	33*
² Carga tumoral (Nº tumores/animal com tumor)	-	1,85	1,96	2,75*

¹Nº de animais com lesão por grupo; ² Análise estatística de dados não paramétricos; Iniciados:

Animais iniciados com protocolo DMBDD^b; Iniciados + FB: Animais iniciados e tratados com fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno;

³Grupo composto por animais expostos às doses de 0,05, 0,075 e 0,10% de FB;

*Significantemente diferente do respectivo grupo controle quando $p < 0,05$.

Tabela 19. Incidência¹ (%) e frequência de neoplasias e preneoplasias em fígado, rins e intestinos de ratos *Wistar* fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD^b.

Grupos	Controle negativo (%)	Iniciados (%)	Iniciados + FB ³ (%)	Iniciados + 2'-AAF (%)
Nº efetivo de animais	50	68	71	14
Total de animais com preneoplasias	3(6)	58*(85)	68(96)	14(100)
Com > 01 neoplasia	0	29*(43)	37(52)	9(64)
Só com neoplasia benignas	0	6(9)	18*(25)	7*(50)
Só com neoplasia malignas	0	33*(48)	10*(14)	0*
Com neoplasias benignas e malignas	0	17*(25)	29(41)	7(50)
Total de animais com neoplasias	0	56*(82)	57(80)	14(100)
² Nº neoplasias benignas	0	39*	73*	23*
² Nº neoplasias malignas	0	64*	52	7
² Total de neoplasias	0	103*	125*	30*
² Carga tumoral (Nº tumores/animal com tumor)	-	1,84	2,19	2,14

¹Nº de animais com lesão por grupo; ² Análise estatística de dados não paramétricos Iniciados:

Animais iniciados com protocolo DMBDD^b; Iniciados + FB: Animais iniciados e tratados com fenobarbital; Iniciados + 2'-AAF: Animais iniciados e tratados com 2'-acetoaminofluoreno;

³Grupo composto por animais expostos às doses de 0,05, 0,075 e 0,10% de FB;

*Significantemente diferente do respectivo grupo controle quando $p < 0,05$.

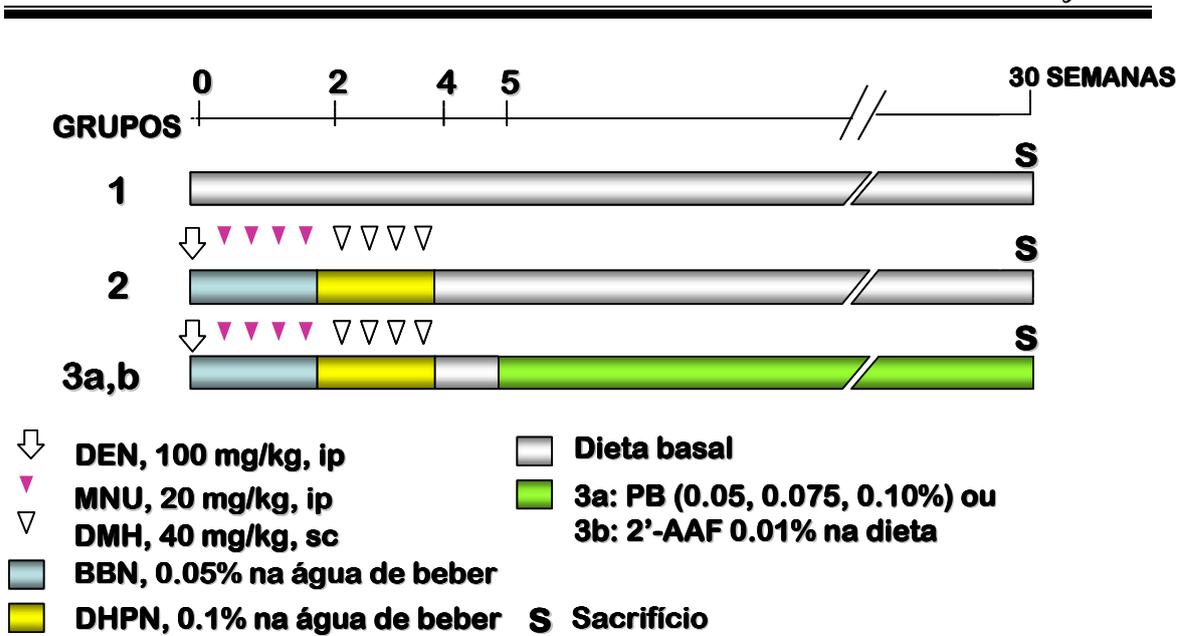


Figura 1: Delineamento experimental.

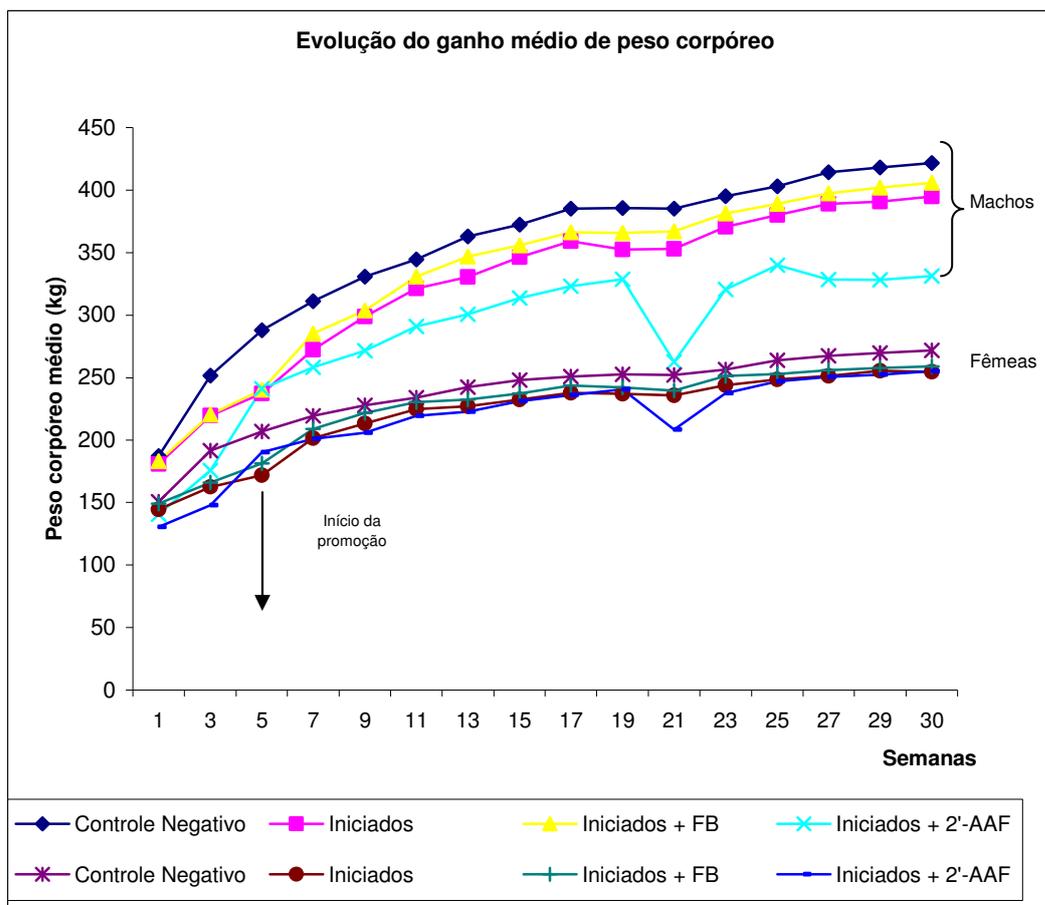


Figura 2: Evolução do peso corpóreo médio de ratos *Wistar* machos e fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD^b.

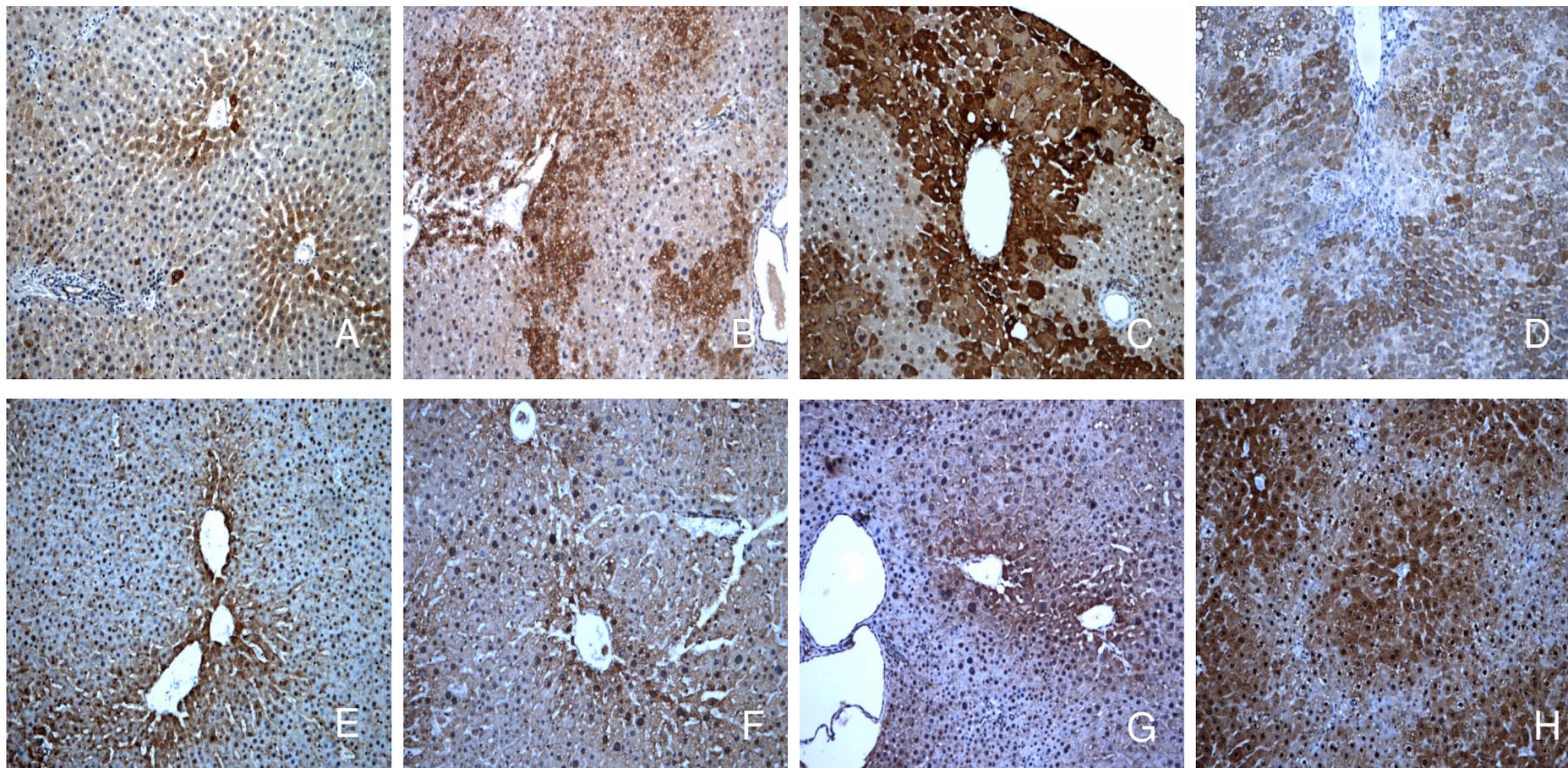


Figura 3. Isoformas de CYP 2B1/2B2 e 1A2 (Imunohistoquímica, 200X): (A) CYP 2B1/2B2, grupo controle não tratado; (B) CYP 2B1/2B2, grupo iniciado DMBDD^b; (C) CYP 2B1/2B2, grupo iniciado e promovido com FB; (D) CYP 2B1/2B2 grupo iniciado e promovido com 2'-AAF; (E) CYP 1A2, grupo controle não tratado; (F) CYP 1A2, grupo iniciado DMBDD^b; (G) CYP 1A2, grupo iniciado e promovido com FB; (H) CYP 1A2 grupo iniciado e promovido com 2'-AAF.

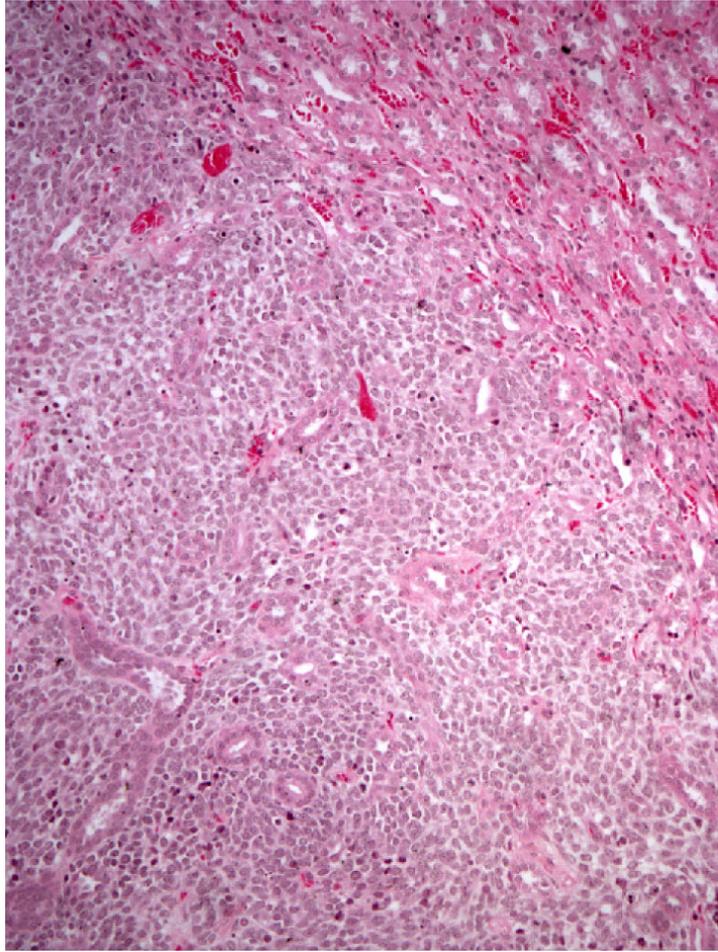
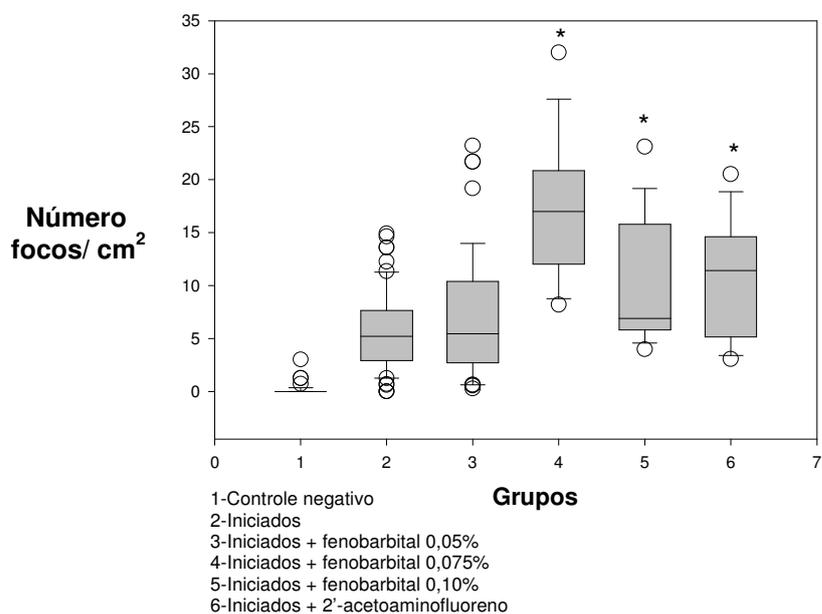
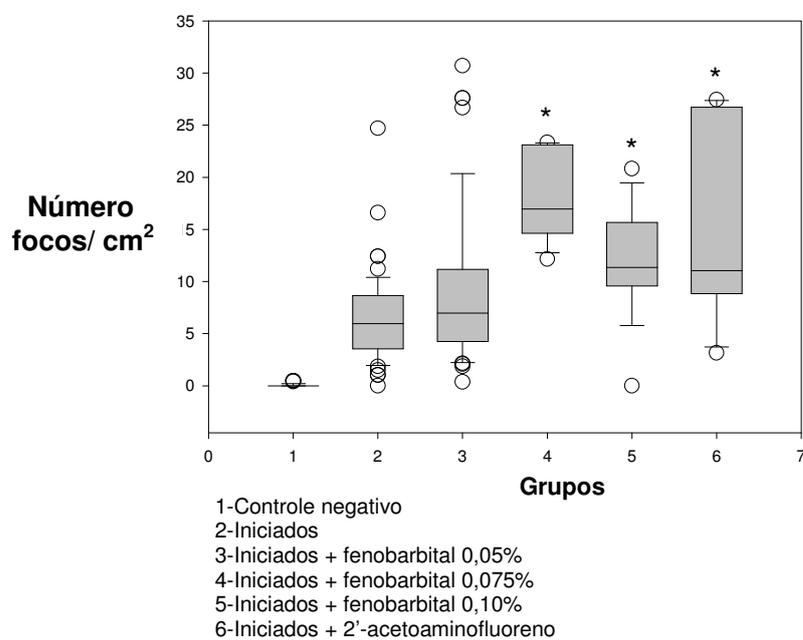


Figura 4. Tumor mesenquimal renal, invadindo medula renal, com envolvimento e compressão tubular. 200X.

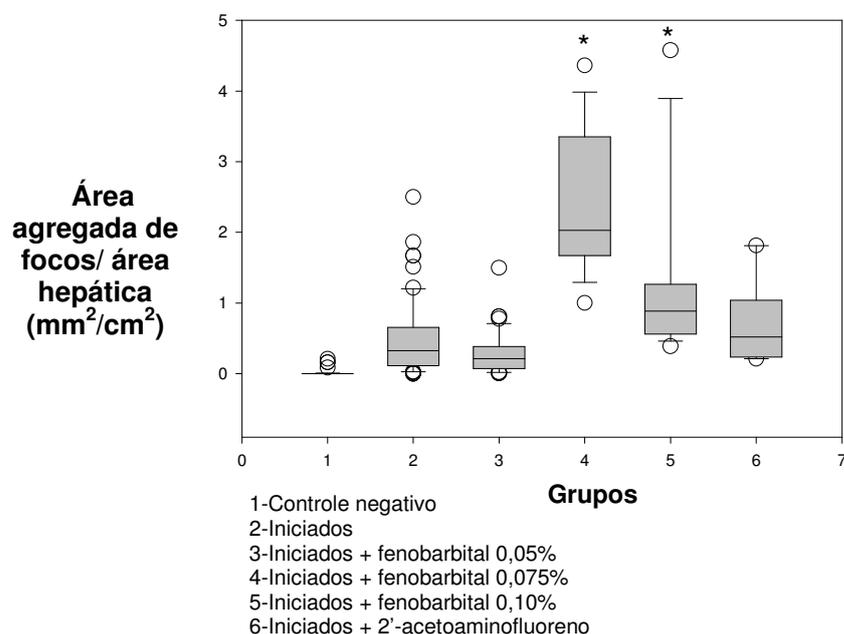
Anexo 1. Número de focos GST-P⁺ (por cm²) em ratos *Wistar* machos submetidos ao protocolo DMBDD^b



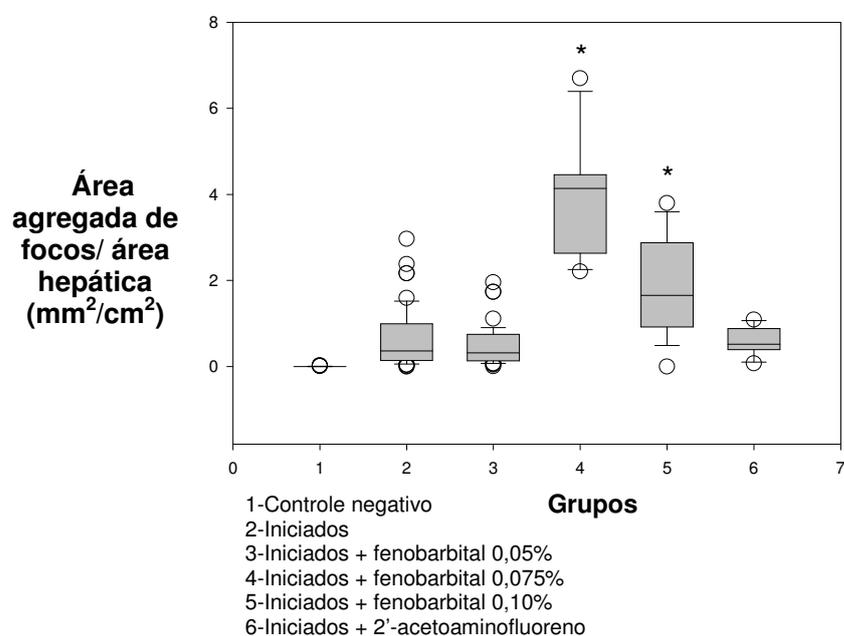
Anexo 2. Número de focos GST-P⁺ (por cm²) em ratos *Wistar* fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD^b



Anexo 3. Área agregada de focos GST-P⁺ (mm²/cm²) em ratos *Wistar* machos submetidos ao protocolo DMBDD^b



Anexo 4. Área agregada de focos GST-P⁺ (mm²/cm²) em ratos *Wistar* fêmeas submetidos ao protocolo DMBDD^b



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)