

JOSAINÉ DE SOUSA PALMIERI

**PROPOSTA PARA UM MODELO EXPERIMENTAL DE
CARCINOGENÊSE UTILIZANDO BENZOPIRENO B[a]P EM RATOS .**

CAMPO GRANDE-MS

2009

JOSAINÉ DE SOUSA PALMIERI

**PROPOSTA PARA UM MODELO EXPERIMENTAL DE
CARCINOGENESE UTILIZANDO BENZOPIRENO B[a]P EM RATOS .**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Iandara Schettert Silva

CAMPO GRANDE-MS

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

JOSAINE DE SOUSA PALMIERI

**PROPOSTA PARA UM MODELO EXPERIMENTAL DE
CARCINOGENESE UTILIZANDO BENZOPIRENO B[a]P EM RATOS .**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado_____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dr. Iandara Schettert Silva
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul-MS.

Profª. Dr. Doroty Mesquita Dourado
Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal.

Profª. Dr. Guido Marks
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul-MS.

Dedico este trabalho

A Deus que é o Ser maior

*A meus pais Airton e Sueli
que sempre me incentivaram e me
deram a vida para que eu pudesse realizar
todos os meus sonhos.*

*A minha avó, Sebastiana, pelo incentivo e
apoio que sempre me deu em toda a minha vida.*

Ao meu marido Gisley que sempre me apoiou.

E a minha Filha Maria Fernanda que esta preste a nascer.

AGRADECIMENTOS

- *A Professora Rose Mary Mathias, por sempre ter me apoiado e me ajudado em todos os meus trabalhos acadêmicos.*
- *A Professora Dr. Jussara Peixoto Ennes, por ter me incentivando a entrar neste programa de mestrado.*
- *À professora Dr. Márcia Maria Silva por ter dedicado algumas horas do seu dia para me ajudar na leitura das lâminas.*
- *Ao Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos, Coordenador do Programa Multidisciplinar de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste, pela iniciativa e liderança na formação acadêmica.*
- *À Prof. Dr. Paulo de Tarso Camilo, pelo incentivo, apoio e colaboração.*
- *Ao Manoel da silva técnico do laboratório de Histologia da Uniderp. Pelo apoio e dedicação.*
- *A Ana Paula Machado pela dedicação ao meu trabalho, sempre me ajudou sem medir esforços.*
- *A Vera Nascimento Silva secretaria do Mestrado por sempre tirar minhas duvidas e estar sempre à disposição.*
- *A Todos os professores do programa que ao longo do período trouxeram seus ensinamentos.*
- *A todos aqueles que de alguma forma colaboram.*

À profa Dr^a Iandara Schettert Silva, pela sua paciência que teve comigo, por ter aceitado me orientar nesta jornada de formação acadêmica e por tudo que me ensinou. Muito obrigada.

À querida Profa. Dra. Doroty Mesquita Dourado. Agradecer talvez seria pouco por tudo que fez, e que vem fazendo ainda .

Durante todos esses anos de convivência que se tornou para mim, mãe e amiga que sempre procurou me ajudar e aconselhar sempre que possível.

Aprendi que nós podemos e devemos ser os melhores, mas sempre com humildade, "orando e vigiando".

Sou eternamente grata a vocês.

Muito obrigado de coração...

RESUMO

Palmieri JS. Proposta para um modelo experimental de carcinogênese utilizando Benzopireno B[A]P em ratos. Campo Grande;2009. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O objetivo deste estudo foi propor modelo experimental de carcinogênese induzida por benzopireno. Para tanto, foi realizada aplicação subcutânea, na proporção de 9 mg/kg, de (B[a]P), um hidrocarboneto amplamente conhecido por seu poder de indução tumoral. Após a realização do estudo para verificação do grau de proliferação celular em cada um dos órgãos atingidos pelo B[a]P (pele, fígado e pulmão), foi feita a análise histológica pela coloração de hematoxilina e eosina (H.E). Foram utilizados 18 exemplares, machos, adultos, com peso variando de 150 a 200g; divididos em dois grupos (controle e teste), cada um com nove animais. Após procedimento experimental, foram submetidos a eutanásia com 15,30 e 45 dias. As peças foram cortadas e coradas por H.E e submetidas à análise macroscópica e microscópica. Em todos os grupos observou-se a presença de alterações inflamatórias, porém a análise do tecido pulmonar dos grupos experimentais revelou alterações hiperplásicas de BALT. Concluiu-se neste estudo que a injeção subcutânea de benzopireno é um método de fácil realização e pode constituir um modelo adequado de carcinogênese e que no pulmão ocorreu lesão pré-carcinogênica. Hiperplasias nodulares de BALT são consideradas por alguns autores como possíveis lesões pré-carcinogênicas e sugerem que a injeção subcutânea possa constituir um modelo adequado quando utilizadas doses maiores e períodos de observação mais prolongados. As principais alterações secundárias foram encontradas na pele, com ulceração, vasos neoformados, exsudação, infiltrado celular; no fígado, com congestão vascular, tumefação celular, exsudação e fibras irregulares; e no pulmão, com congestão vascular.

Palavras-chave: Carcinogênese experimental, benzopireno, ratos.

ABSTRACT

Palmieri JS. Proposal for an experimental model of carcinogenesis using Benzopyrene B[A]P in rats. Campo Grande;2009. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

The aim of this study was to propose an experimental model of benzopyrene-induced carcinogenesis. In a proportion of 9 mg/kg, B[a]P, a hydrocarbon widely known for its tumor-inducing characteristic, was applied subcutaneously. After analyzing the extent of cellular proliferation in each one of the organs affected by B[a]P (skin, liver and lung), hematoxylin and eosin (H.E) staining was used for histological assay. Eighteen male, adult, healthy exemplars with weight ranging from 150 to 200g have been used. They were divided into two groups (control and test), each one with nine animals, and euthanized on days 15, 30 and 45 post application. The fragments were sectioned, stained with H.E and then observed by macroscopy and microscopy. Inflammatory alterations were seen in all groups, but the lung tissue of the experimental groups presented BALT hyperplastic alterations. This study showed that B[a]P subcutaneous application is a simple method and may constitute a suitable model of carcinogenesis; another conclusion is that pre-carcinogenic lesions occurred in the lungs. Some authors regard BALT nodular hyperplasia as possible pre-carcinogenic lesions and suggest that the subcutaneous injection may account for a proper model when used in larger doses and for longer observation periods. The main secondary alterations were found in the skin, with ulceration, vessel neoformation, exudation, cellular infiltrate; in the liver, with vascular congestion, cellular tumescence, exudation and irregular fibers; and in the lungs, with vascular congestion.

Keywords: experimental carcinogenesis, benzopyrene, rats.

LISTA DE TABELA

Tabela 1-	Presença ou ausência das alterações macroscópicas encontradas na pele dos ratos 1, 2 e 3, dos grupos I e II aos 15, 30 e 45 dias.....	34
Tabela 2-	Presença ou ausência das alterações microscópicas encontradas na pele dos ratos 1, 2 e 3, dos grupos I e II aos 15, 30 e 45 dias.....	35
Tabela 3-	Presença ou ausência das alterações macroscópicas encontradas no fígado dos ratos 1, 2 e 3, dos grupos I e II aos 15, 30 e 45 dias..	40
Tabela 4-	Presença ou ausência das alterações microscópicas encontradas no fígado dos ratos 1, 2 e 3, dos grupos I e II aos 15, 30 e 45 dias..	40
Tabela 5-	Presença ou ausência das alterações macroscópicas encontradas no pulmão dos ratos 1, 2 e 3, dos grupos I e II aos 15, 30 e 45 dias..	43
Tabela 6-	Presença ou ausência das alterações microscópicas encontradas no pulmão dos ratos 1, 2 e 3, dos grupos I e II aos 15, 30 e 45 dias..	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Organograma mostrando a distribuição dos animais conforme grupos e subgrupos.....	29
Figura 2-	Fotografia mostrando o aspecto da cicatriz do local de aplicação do B[a]P; 3 dias (A);11 dias (B);15 dias (C) e 45 dias (D).....	34
Figura 3-	Fotomicrografia da pele de ratos Wistar com aspecto normal (Controle) animal . A - Visão geral da epiderme (e) e derme (d). B - todas as camada epiderme C e D - aspecto habitual da derme mostrando as fibras colágenas (fc), fibroblastos (c) e vascularização (v). HE. A e B 100x ,C e D 400x.....	36
Figura 4-	Fotomicrografia da pele de ratos Wistar com 15 dias após a aplicação de benzopireno na proporção de 9 mg/kg animal 2. C e D). A) - restos de neutrófilos e necrose formando uma crosta fibrinoleucocitária (cfl). B) numerosos vasos neo-formados. C e D) vasos neo-formados revestidos por endotélio proeminente (seta). HE. A , C e D 400x; B 100x.....	37
Figura 5-	Fotomicrografia da pele de ratos Wistar com 30 dias após a aplicação de benzopireno na proporção de 9 mg/kg , animal 2. A e B) áreas de acantose (seta) evidenciando uma discreta hiperplasia de células epiteliais. C) Infiltrado inflamatório misto: neutrófilos e linfócitos (inf). Macrófago com pigmento intracitoplasmático (m). D) vasos neoformados com endotélio de aspecto habitual (v). HE/100x A e C; 400x B e D.....	38
Figura 6-	Fotomicrografia da pele de ratos Wistar com 45 dias após a aplicação de benzopireno na proporção de 9 mg/kg, animal 1. A) pele exibindo depósito de colágeno (dc) na derme. B e C) Epiderme íntegra, retificada (seta). D) vaso revestido por endotélio (setas) proeminente e ao redor, fibroblastos (f). HE/ A e B, 100x; C e D, 400x.....	39
Figura 7-	Fotomicrografia do fígado de ratos Wistar com aspecto normal (Controle) animal 3. A e B. HE/400x.....	41
Figura 8-	Fotomicrografia do fígado de ratos Wistar com 15 dias após a aplicação de benzopireno na proporção de 9 mg/kg animal 2. A) Congestão Vascular(seta) ;B) Área de tumefação celular. HE/400x A e B.....	41
Figura 9-	Fotomicrografia do fígado de ratos Wistar com 30 dias após a aplicação de benzopireno na proporção de 9 mg/kg animal 2 A)Congestão vascular(seta); B) Área de tumefação celular (seta). HE/400x. A e B.....	42

- Figura 10- Fotomicrografia do fígado de ratos Wistar com 45 dias após a 42
aplicação de benzopireno na proporção de 9 mg/kg animal 3. A)
Área de tumefação celular (seta). B) Esteatose -vacúolos e gordura
intracitoplasmática (seta) . HE/400x A e B.....
- Figura 11- Fotomicrografia do pulmão de ratos Wistar com aspecto habitua 44
(Controle). alvéolos aerados (A) e septos alveolares (setas), animal
2. HE/100x A e 400x B.....
- Figura 12- Fotomicrografia do pulmão de ratos Wistar com 15 dias após a 45
aplicação de benzopireno na proporção de 9 mg/kg, animal 2. A)
septos alveolares (setas). B) congestão vascular CONG), HE/400x
A e B.....
- Figura 13- Fotomicrografia do pulmão de ratos Wistar com 45 dias após a 46
aplicação de benzopireno na proporção de 9 mg/kg, animal 2.A)
tecido linfóide ligado à mucosa brônquica (BALT). B) alvéolos
aerados (A) e septos alveolares (setas). C) congestão vascular
maior (CONG) e D) congestão (seta). HE/100x A e 400x B, C e D....

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Alterações macroscópicas avaliadas no término do período para cada grupo, conforme presença e ausência, observadas e anotadas em protocolo para cada animal na pele.....	31
Quadro 2-	Alterações microscópicas, avaliadas no término do período para cada grupo, conforme presença e ausência, observadas e anotadas em protocolo para cada animal na pele.....	32
Quadro 3-	Alterações macroscópicas, avaliadas no término do período para cada grupo, conforme presença e ausência, observadas e anotadas em protocolo para o fígado de cada animal.....	32
Quadro 4-	Alterações microscópicas, avaliadas no término do período para cada grupo, conforme presença e ausência, observadas e anotadas em protocolo para o fígado de cada animal.....	32
Quadro 5-	Alterações macroscópicas, avaliadas no término do período para cada grupo, conforme presença e ausência, observadas e anotadas em protocolo para o pulmão de cada animal.....	33
Quadro 6-	Alterações microscópicas, avaliadas no término do período para cada grupo, conforme presença e ausência, observadas e anotadas em protocolo para o pulmão de cada animal.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(B[a]P)	Benzoapireno.
BALT	Tecido linfóide ligado à mucosa brônquica
CEUA	Comissão de Ética em Pesquisa com Animais.
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
HE	Hematoxilina-Eosina.
IARC	International Agency for Research on Câncer como carcinogênicos e mutagênicos.
IFN	Inteferon.
IL	Interleucina.
INCA	Instituto Nacional de Câncer.
MMP	Membrane-type Matrix Metalloproteinase.
NR 15	Norma Regulamentadora 15.
PAH	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos.
PMN	Polimorfonuclear.
RNA	Ácido ribonucléico.
TAM	Macrófagos associados a tumores.
TNF	Fator de necrose tumoral.

LISTA DE SÍMBOLOS

cm ²	Centímetros ao quadrado.
g	Gramas.
kg	Kilo Grama.
mg	Miligramas.
ml	Mililitros.
°C	Graus Celsius.
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Carcinogênese.....	18
2.2 Aspectos histológicos	19
2.3 Características neoplásicas na pele.....	20
2.4 Características neoplásicas no fígado.....	21
2.5 Características neoplásicas no pulmão.....	22
2.6 Benzopireno (B[a]P).....	24
3 OBJETIVOS.....	27
4 MATERIAL E MÉTODO.....	28
4.1 Local e período.....	28
4.2 Amostra	28
4.3 Delineamento experimental.....	29
4.4 Indução tumoral.....	29
4.5 Eutanásia e preparo das peças para análise histológica.....	30
4.6 Análise histopatológica.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSÃO.....	34
6 CONCLUSÕES	47
7 REFERÊNCIAS.....	48