

JOSAINÉ DE SOUSA PALMIERI

**PROPOSTA PARA UM MODELO EXPERIMENTAL DE  
CARCINOGENESE 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<sup>a</sup> Iandara Schettert Silva, pela sua paciência que teve comigo, por ter aceitado me orientar nesta fornada 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 <sup>2</sup>	Centímetros ao quadrado.
g	Gramas.
kg	Kilo Grama.
mg	Miligramas.
ml	Mililitros.
°C	Graus Celsius.
µg	Micrograma

## SUMÁRIO

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

## 1 INTRODUÇÃO

A carcinogênese é um processo múltiplo que se dá lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor. Este processo passa por vários estágios sendo eles a iniciação, promoção, progressão (MONTENEGRO; FRANCO, 1999).

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado sarcoma. Outras características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si é a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (metástases) (ORNELLAS; LANZONI; TOLEDO, 2000; AKEMI, 2004).

Visto que essas células se dividem rapidamente, elas tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (PINHEIRO; FRIEDMAN; CABRAL, 2003).

Dessa forma, o câncer é reconhecidamente a moléstia que mais apreensão tem provocado na história da humanidade. Os três tratamentos classicamente adotados contra o câncer são a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia (remoção do tecido lesado e seus arredores), que apresentam inúmeras desvantagens, por exemplo, a desfiguração do paciente, com prejuízos à sua auto-estima, inúmeros efeitos colaterais (quimioterapia e radioterapia), além de uma perspectiva de cura nem sempre eficaz (PINHEIRO; FRIEDMAN; CABRAL, 2003; MORAIS; SCHETTINI; CHIRANO, 2005).

Uma das substâncias apontadas como um potente carcinógeno, utilizada para esse fim em animais, tem sido o benzopireno (B[a]P), substância que, pelo simples contato com a região do corpo do animal sem pêlo, é capaz de induzir alterações celulares que podem evoluir para uma carcinogênese (OGA, 1996).

O B[a]P é um potente agente cancerígeno formado pela combustão incompleta do tabaco, hulha e óleo. Ele é encontrado no alcatrão da fumaça do

cigarro e pode ser um fator na relação entre fumo e câncer de pulmão, de laringe e da cavidade oral, e, possivelmente, câncer de bexiga e pâncreas. Ele e outros hidrocarbonetos policíclicos aromáticos estão também presentes em carnes fortemente grelhadas sobre carvão e em peixe defumado, assim como na atmosfera das grandes cidades, onde podem ser poluentes do ar (OGA, 1996).

O B[a]P tem um alto poder carcinogênico. Seu metabolismo tem sido estudado em sistemas *in vitro* e *in vivo* e sabe-se que se liga ao DNA com maior eficiência em células epiteliais do que em fibroblastos, com efeito indutivo, instalando-se em poucas horas após sua aplicação. A ligação de substâncias como o B[a]P com os constituintes celulares produz freqüentemente substâncias quimicamente reativas (processo conhecido como *bioativação*) responsáveis pela formação de inúmeros metabólitos ativos, cuja presença pode desencadear o início de processos tóxicos como mutagenicidade, carcinogenicidade e necrose (INCA, 2008).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Carcinogênese

A carcinogênese é um processo de múltiplos estágios que envolvem eventos genotóxicos (mutações), bem como expressões genéticas alteradas no momento da transcrição, tradução e pós-tradução (eventos epigenéticos) e alterações na sobrevivência celular (proliferação e apoptose) (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HERCEG, 2007).

Funcionalmente, o processo de carcinogênese é dividido em três etapas: iniciação, promoção e progressão. O primeiro estágio, iniciação, é onde ocorre uma ou mais mutações no DNA promovida pelo agente cancerígeno levando à transformação celular e tornando-a potencialmente capaz de se multiplicar de modo autônomo. O estágio seguinte, a promoção, ocorre depois de um período prolongado de tempo de exposição. A promoção é um processo complexo, que em momentos iniciais é reversível. A progressão tumoral é considerada irreversível e é caracterizada pelo aumento da instabilidade genômica e posterior progresso em direção à malignidade e ao crescimento celular autônomo. Carcinógenos completos possuem atividade iniciadora e promotora e podem atuar em diferentes estágios no processo carcinogênico, mas a forma de ação varia de acordo com o produto químico. O conhecimento dos mecanismos de carcinogênese induzida por produtos químicos tem oferecido base para novas pesquisas na prevenção ao câncer (MILLER; MILLER, 1981).

Camundongos expostos a carcinógenos desenvolvem tumores por um processo em múltiplos estágios, muito semelhante ao do homem, sendo um modelo experimental adequado para a pesquisa de genes de susceptibilidade ou resistência. Diferentemente das populações humanas, grande número de família de camundongos pode ser analisado em estudo de *linkage*, o que aumenta a probabilidade estatística de identificar os vários *loci* que controlam cada um destes subfenótipos podem ser mapeadas em modelos de câncer murinos, desde existam

polimorfismo funcionais nas linhagens parentais escolhidas para a análise (SOUZA, 2007).

## **2.2 Aspectos histológicos**

Em um ambiente o rico de células inflamatórias, fatores de crescimento, estroma ativado e agentes promotores de dano ao DNA potencializam e/ou promovem o risco e transformação neoplásica de células em proliferação. Num quadro normal, em resposta a injúria tissular, uma rede multifatorial de sinais químicos inicia e mantém uma resposta do hospedeiro destinado a curar o tecido lesado. Isto envolve ativação e migração dirigida de leucócitos (neutrófilo, monócito e eosinófilo) do sistema venoso aos sítios de dano, associada a um aumento da proliferação celular, enquanto o tecido regenera. A proliferação e inflamação cedem, quando o agente agressor é removido ou o reparo está completo. Em contraste, células em proliferação que carregam o dano ao DNA ou a mutação (células iniciais) continuam a proliferar em microambientes ricos em células inflamatórias e fatores de crescimento que suportam seu desenvolvimento (DVORAK, 1986; COUSSENS, WERB, 2002).

Embora a relação entre inflamação, imunidade inata e desenvolvimento de tumores seja bem aceita, muitos dos mecanismos celulares e moleculares que mediam esta relação permanecem não esclarecidos. O conceito fundamental é que inflamação associada ao reparo de lesão é usualmente autolimitante, porque a produção de citocinas anti-inflamatórias acompanha a das citocinas pré-inflamatórias; por outro lado, a persistência de fatores iniciadores, a desregulação ou falha dos mecanismos requeridos para resolver a resposta inflamatória, podem conduzir a anormalidade como inflamação crônica, resultando em patogênese. Esta parece ser a situação durante a progressão neoplásica. De certa forma tumores podem ser interpretados como lesões que não se reparam (DVORAK, 1986; COUSSENS, WERB, 2002).

Segundo Balkwill e Mantovani (2001), o componente inflamatório de um tumor em desenvolvimento pode incluir uma população diversificada de células, por exemplo, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos e mastócitos bem como linfócitos, todos capazes de produzir uma variedade de citocinas, mediadores

citotóxicos, incluindo espécies reativas de oxigênio e serina ou cisteína proteases, MMPs e agentes perfurante da membrana, além de mediadores de morte celular como TNF $\alpha$ , interleucinas e interferons.

As células neoplásicas produzem fatores solúveis que se dirigem a maturação de precursores mielóides a macrófagos. Macrófagos associados a tumores (TAM) exercem um papel ambíguo em neoplasias: embora eles possam matar as células neoplásicas após ativação com IL-2, IFN e IL-12, a infiltração de macrófagos está intimamente relacionada à angiogênese associada ao tumor, bem como à disseminação de metástases (SCHOPPMANN *et. al*/2002).

Segundo Di Carlo *et al.*, (2001) ; Ishihara, Ijima, Mastunga (1998), os neutrófilos PMNs, por sua vez, representam a primeira linha de defesa contra agressões e são potentes efetores da inflamação. Embora em diferenciação terminal, com pouca maquinaria biossintética, neutrófilos são capazes de produzir considerável quantidade de citocinas/ quimiocinas necessárias para o recrutamento, ativação e resposta de células efectoras. Porém estas células fagocíticas iniciam o reparo da lesão, servindo como uma fonte de citocinas de resposta precoce pró-inflamatórias.

### **2.3 Características neoplásicas na pele**

Há transformação maligna dos melanócitos (células produtoras de pigmentos), é o câncer que mais cresce no mundo, nos últimos dez anos aumentou 20%. O melanoma é uma doença, que se submetida a um tratamento, é curável. As pessoas, principalmente em países tropicais como o Brasil, se expõem excessivamente aos raios ultravioletas do sol, que são prejudiciais à epiderme (camada superficial da pele) (BALMAIN; HARRIS, 2000).

No caso do melanoma, que mais cresce o diagnóstico é feito principalmente através de pintas preexistentes, que mostram sinais como mudança de cor e aspecto. Para examinar essas pintas e constatar alguma irregularidade, usa-se o método ABCD, que significa: assimetria (A), bordas irregulares (B), cor negra ou mista (C), e diâmetro maior que 0,8 cm (D) ) (BALMAIN; HARRIS, 2000).

Segundo Grier; Robson (1976); Silva (1982); Vecchia (2005) existem três tipos histológicos de neoplasias malignas que podem se desenvolver sobre a

cicatriz: o tipo espinocelular ou carcinoma epidermóide; o basocelular e o sarcoma, sendo o primeiro o mais comum e o último mais raro.

As feridas malignas podem ser originadas de câncer primário na pele ou de metástases. Para o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer tem em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e os órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. Estas células dividem-se rapidamente, tendendo a ser agressivas e incontroláveis. O processo de carcinogênese, ou seja, de formação do câncer, em geral se dá lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e de origem a um tumor visível. Esse processo passa por vários estágios antes de chegar ao tumor. As células alteradas passam então a se comportar de forma anormal. Multiplicam-se de maneira descontrolada, mais rapidamente do que as células normais do tecido à sua volta, invadindo-o. Geralmente, tem capacidade para formar novos vasos sanguíneos que as nutrirão e manterão as atividades de crescimento descontrolado. O acúmulo dessas células forma os tumores malignos (SUCENA, 1973).

Segundo Franklin (2000), estas células têm a capacidade de se desprender do tumor e de migrar. Invadem inicialmente os tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através desses, disseminar-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases. Dependendo do tipo da célula do tumor, alguns dão metástases mais rápidas e mais precocemente, outros a fazem lentamente ou até não o fazem.

Segundo Rodrigues; Camargo (1999), no século XVIII, Percival Pott sugeriu a participação do alcatrão em tumores de pele. A confirmação destas suspeitas veio com os experimentos de Yamagiwa e Ichikawa em 1915, conforme Woolf (1998). A descoberta dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos se deu nesta época pela destilação do 3,4-benzopireno (RODRIGUES; CAMARGO, 1999).

## **2.4 Características neoplásicas no fígado**

O câncer de fígado é dividido em duas categorias: o primário do fígado e o secundário, ou metastático (originado em outro órgão e que atinge também o fígado). O termo "primário do fígado" é usado nos tumores originados no fígado, como o hepatocarcinoma ou carcinoma hepatocelular (tumor maligno primário mais

freqüente que ocorre em mais de 80% dos casos), o colangiocarcinoma (que acomete os ductos biliares dentro do fígado), angiossarcoma (tumor do vaso sanguíneo) e, na criança, o hepatoblastoma (GRIER, 1976).

A maioria dos tumores de fígado já se esparramou (metastatizou) para o fígado vindo de outros órgãos, geralmente do cólon, reto, pulmão, mama, pâncreas e estômago. Quando um câncer se esparrama de outro lugar para o fígado, as células do câncer são as mesmas em ambos os lugares. Por exemplo, se o câncer de pulmão se alastrou para o fígado, as células cancerosas no fígado serão iguais às células cancerosas do pulmão. O fígado é o lugar mais comum para os cânceres se alastrarem (ZEJMANOWIICZ, 2006).

Segundo Zejmanowicz, (2006) há quatro tipos principais de câncer primário de fígado. O carcinoma hepatocelular (hepatoma) se comporta de forma agressiva e responde por aproximadamente 84% de cânceres primários de fígado. O colangiocarcinoma (câncer do canal da bile) responde por aproximadamente 13%, e muitos fatores podem aumentar o risco de desenvolver esse câncer, inclusive os cálculos de vesícula, a inflamação da vesícula biliar e, às vezes, a colite ulcerativa crônica (uma inflamação do intestino grosso). O angiossarcoma (hemangiossarcoma) é uma forma muito rara de câncer de fígado. O hepatoblastoma é outro tipo raro de câncer de fígado, normalmente encontrado em crianças abaixo dos 4 anos de idade.

## **2.5 Características neoplásicas no pulmão**

Há muitos fatores que contribuem para o risco de câncer de pulmão, o mais conhecido e aceito é o hábito de fumar. Entretanto apenas uma pequena fração de fumantes desenvolve câncer de pulmão, o que indica uma susceptibilidade diferencial para o desenvolvimento de neoplasias, em parte do diferencial genético no metabolismo do carcinógeno e/ou por variação na capacidade de reparo do DNA. Estudos de bases moleculares mostram que o dano genético ao epitélio respiratório secundário à exposição tabágica persiste por décadas após a cessação do tabagismo. Outros fatores demonstrados são radônio, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, níquel, cromo, arsênio, asbestos e éter clorometílicos, além da poluição atmosférica cuja influencia foi demonstrada em diversos estudos (OLIVEIRA, 2002; FONG, 2003).

O desenvolvimento do câncer deve-se ao acúmulo de alterações que ocorrem de forma espontânea ou induzida na estrutura ou expressão de determinados genes. Essas mutações genéticas ocorrem continuamente e é reparada pelo mecanismo de defesa celular, que exerce controle sobre o crescimento, a latência e a apoptose celular. A presença de falhas no mecanismo de defesa, herdadas ou geradas por mutações, possibilita a reprodução de clones de células resistentes à indução para a fase de latência, ou a apoptose e ao controle de crescimento, podendo dar origem ao desenvolvimento de neoplasias (MIRANDA; JAMNIK; SANTORO; UEHARA, 2003).

A carcinogênese começa com a exposição do epitélio a um agente agressor, resultando em dano genético, usualmente associado à lesão celular crônica. A ação constante do agente pode resultar na transformação maligna da célula epitelial. Alterações morfológicas pré-neoplásicas caracterizadas como hiperplasia, displasia e carcinoma *in situ* podem ser observados no epitélio brônquico antes do aparecimento do quadro clínico de câncer de pulmão (MIRANDA; JAMNIK; SANTORO; UEHARA, 2003).

A classificação de câncer de pulmão é baseada na aparência histológica do tumor corado por hematoxilina e eosina. O esquema de classificação mais amplamente aceito é o da Organização Mundial de Saúde (FRANKLIN, 2000).

As alterações histológicas associadas ao desenvolvimento do câncer de pulmão consistem em hiperplasia de células basais, neoplasias escamosas, displasia e carcinoma *in situ*. O número de lesões metaplásicas escamosas e o grau de displasia aumentam conforme o número de cigarros consumidos. Essas relações são mais evidentes em carcinomas celulares escamosos que derivam diretamente de células epiteliais bronquiais, não estando presente em outros tipos de câncer de pulmão (PONTICIELLO *et al*, 2000).

Há poucos modelos animais do câncer pulmonar; e um modelo animal do tumor permite a avaliação *in vivo* de novas drogas quimioterápicas no tratamento do câncer de pulmão brocogênicos (ROM *et al.*, 2000; SILVA *et al*, 2006).

Os tumores espontâneos do pulmão nos ratos são similares aos adenocarcinomas humanos na morfologia, na histopatologia e em características moleculares (MEUWISSEN; BERNIS, 2005; SILVA *et al*, 2006).

## 2.6 Benzopireno (B[a]P)

O B[a]P é um membro da família do HAP usado frequentemente por ser modelo comprovado para estudos de toxicidade do HAP; mostrou-se um carcinogênico poderoso do pulmão nos modelos animais do câncer pulmonar. A carcinogênese seletiva da exposição de segmento do pulmão a B[a]P pode ser uma consequência de muitos fatores bioquímicos, incluindo aqueles que afetam a absorção, o metabolismo e o reparo do DNA (KONG *et al.*, 1994; SILVA, 2006).

Desde o seu isolamento do piche de carvão nos anos 30, o B[a]P, um tipo de hidrocarboneto aromático policíclico tem sido usado como protótipo de carcinogênese. Ele induz uma larga escala de toxicidade, inclusive a carcinogenicidade em animais experimentais (DESCHNER, 1974).

O B[a]P é citado pelo Ministério do Trabalho e Emprego do Brasil, que o reconhece como cancerígeno no Anexo 13 da NR 15 (Norma Regulamentadora 15). Não se fala em “substância cancerígena”, apenas que “as operações” com benzopireno são “*insalubres em grau máximo*”, não se prestando qualquer explicação do motivo pelo qual são assim classificadas. Há mais de cem anos o B[a]P tem sido reconhecido como cancerígeno e mutagênico (que causa mutação, ou seja, qualquer mudança hereditária no material genético do indivíduo) (DESCHNER, 1974).

Azevedo e Chasin (2003) indicam, dentre alguns poluentes atmosféricos urbanos, o benzo (a) pireno, o benzo (e) pireno, o benzo (a) antraceno e os fluorantenos como agentes carcinogênicos identificados no ar urbano, indicando os gases da exaustão de veículos automotores como fontes significativas de tais poluentes. Chega a destacar que o benzo (a) pireno foi encontrado no solo das proximidades das rodovias em elevadas concentrações (2.000 µg/kg).

Segundo Wong e Biswas (1985); Gerde *et. al.*(1997); Hetch (2000) os hábitos ambientais da poluição do ar e de fumo são as fontes principais de exposição de inalação aos agentes carcinogênicos, tais como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP). HAPs é reconhecido atualmente como uma das classes principais de poluente carcinogênico ambiental e ocupacional, sendo encontrado em diferentes apresentações e, dependendo da sua estrutura, causando distintas atividades carcinogênicas. A relação quantitativa entre disposição, metabolismo e aderência

tecidual dos HAP e outros carcinogênicos relacionados ao tabaco evocam dúvidas sobre a importância isolada dos HAP no câncer de pulmão, tanto pela alta dose necessária à produção dos efeitos carcinogênicos quanto pela necessidade de ativação metabólica dos mesmos, função fracamente observada no tecido pulmonar.

Cohen (1977) citam as emissões de diesel (contendo benzopireno) como causadoras de câncer nos pulmões e classificam o trabalho dos motoristas de caminhão, mecânicos e funcionários de garagens de ônibus como profissões de risco.

Pereira Netto (2000) relatou que uma das mais representativas fontes ambientais de HPA é a exaustão de motores a diesel e que os grupos populacionais mais expostos são aqueles que residem ou trabalham em ambientes diretamente influenciados por tais fontes. De acordo com os autores, a meia-vida (período de tempo necessário para que a metade dos átomos presentes num elemento se desintegre) do benzopireno é de 270 dias a 8 anos. Também afirmam que a contaminação humana tanto pode se dar pela inalação, mencionando novamente a exposição às emissões dos motores diesel, quanto pela via dérmica. Finalmente, confirmam que o benzopireno e os benzofluorantenos já são indicados pela IARC - International Agency for Research on Cancer como carcinogênicos e mutagênicos.

O B[a]P é um dos HAP que se destacam na toxicologia humana. As vias de penetração do benzopireno no organismo humano são duas: por inalação e pela epiderme. Quando os trabalhadores estão no local aplicando o asfalto quente, não apenas inalam esse agente químico, mas também são por ele atingidos no corpo, causando câncer de pele (FASSONI; SALLES, 1993).

O Instituto Nacional de Saúde e Segurança Ocupacional dos Efeitos Carcinogênicos da Exposição à Combustão de Diesel (National Institute for Occupational Safety and Health Carcinogenic Effects of Exposure to Diesel Exhaust) faz importante observação quanto aos efeitos combinados do diesel e das emissões de asfalto, uma vez que todas as máquinas pesadas que atuam nas operações de pavimentação de ruas, avenidas e estradas fazem uso desse combustível. Conforme esses estudos há aumento das emissões de benzopireno pela combinação das duas emissões, asfalto e diesel, o que aumenta o risco de desenvolvimento de câncer pulmonar. De fato, nas emissões do diesel há, dentre diversos hidrocarbonetos, a presença marcante dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, sendo o benzopireno um deles (NIOSH, 2001).

Através da indução de uma ou mais hidroxila ao substrato, um pró-carcinogênico, pode tornar-se um carcinogênico. Como exemplo o benzopireno e convertido em epóxido de benzopireno, um composto altamente reativo. A maioria dos agentes mutagênicos / carcinogênicos requer ativação metabólica antes de se ligar ao DNA, ao RNA e as proteínas. As variações nos processos de ativação e detoxificação de compostos químicos e drogas desempenham papel na formação do tumor. A quantidade final de efeito carcinogênico produzido depende da ação competitiva entre os mecanismos de ativação e detoxificação, envolvendo as enzimas que tomam parte nessas vias bioquímicas da célula (HARRIGAN, 2003).

Não foram encontrados relatos na literatura consultada que relacione o uso do benzopireno via cutânea com alterações morfológicas no pulmão. Os trabalhos relatam que os HPA são altamente lipossolúveis e rapidamente absorvidos pelos pulmões, intestinos e pele em experimento com animais, independente da rota de administração (IARC, 1985; FOTH; KAHL, KAHL, 1988). Em trabalho realizado pelos mesmos pesquisadores, o padrão de distribuição foi similar depois de administração subcutânea, intravenosa e intratraqueal, tanto em ratos quanto em camundongos. Níveis detectáveis de HPAs podem ser observados em muitos órgãos internos de minuto a horas após a administração. Os maiores níveis são encontrados no fígado. Em ratos, foi observado que entre 30 a 50% da dose oral de benzopireno foram rapidamente absorvidas e a maior parte dos compostos foi prontamente metabolizada no fígado (efeito de primeira passagem) (FOTH; KAHL; KAHL, 1988; WITHEY; SHEDDEN, 1993).

### **3 OBJETIVOS**

- a,** Propor modelo experimental de carcinogênese induzida por benzopireno.
  
- b,** Avaliar o efeito da indução do benzopireno como modelo experimental de carcinogênese através de análises histológicas das lesões.
  
- c,** Avaliar o efeito que o benzopireno causa nos órgãos: pele, fígado e pulmão, no modelo experimental, através de análises histológicas.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi realizado após aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa com Animais/ CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), conforme certificado nº127/2006.

### 4.1 Local e período

O estudo experimental foi executado no laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, UNIDERP, Campus III, Campo Grande – MS e o procedimento histológico no Laboratório de Pesquisa Tecidual e Biologia Molecular da UNIDERP em Campo Grande – MS, durante os meses de dezembro de 2007 a janeiro de 2008.

### 4.2 Amostra

A amostra consistiu de 18 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, adultos, com peso variando de 150 a 200g, com idade de dois a três meses (sessenta a noventa dias), procedentes do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do sul – UFMS.

Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, com tampa/grades de aço inoxidável contendo espaço para ração e água. Foi utilizada uma gaiola para cada animal, para evitar o contanto entre si.

A oferta alimentar e hídrica foi realizada de forma continua, receberam dieta sólida<sup>1</sup> e a água, *ad libitum*, substituída uma vez por dia.

---

1- Ração da marca Nuvitalab CR1- Nuvital Nutrientes

### 4.3 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos em dois grupos chamados I e II, conforme o tempo de avaliação em subgrupos: 15 dias, 30 dias e 45 dias, com 3 animais cada, foram redistribuídos.

- Grupo I (Grupo controle): 9 animais, apenas alimentados e observados até o dia da eutanásia, nos tempos de 15,30 e 45 dias.

- Grupo II (Grupo teste): 9 animais, submetidos a uma única aplicação de benzopireno, com injeção subcutânea na região do dorso e a eutanásia ocorreu nos tempos de 15, 30 e 45 dias após a aplicação do B[a]P.

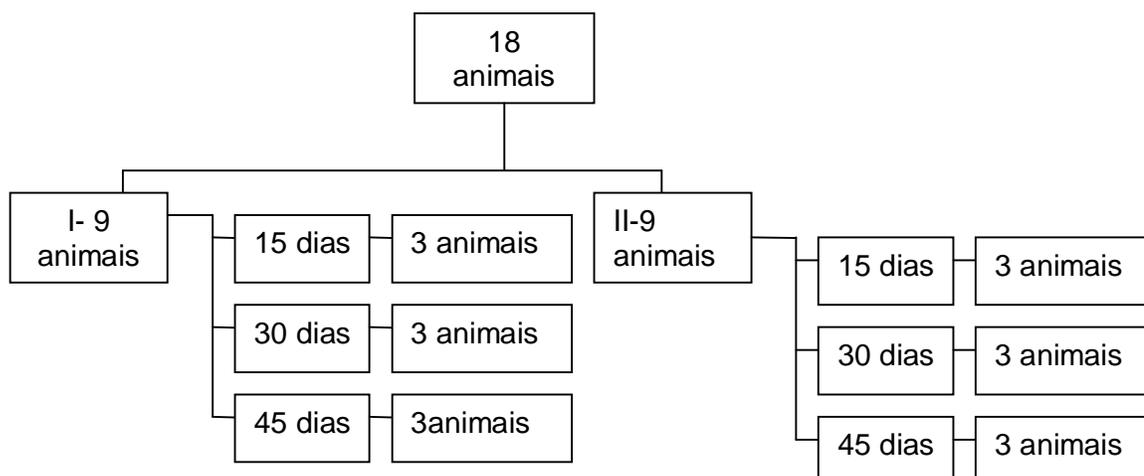


Figura 1- Organograma mostrando a distribuição dos animais conforme grupos e subgrupos.

### 4.4 Indução tumoral

Os animais foram submetidos à injeção subcutânea única de benzopireno<sup>2</sup> (B[a]P) na dose de 9 mg/kg, na região dorsal, variando-se o volume conforme peso de cada animal.

---

2- SIGMA (Bioquímicos e reagentes)

O preparo da solução de B[a]P foi realizado com a pesagem e separação em frascos estéreis com capacidade de 10 ml. O preparo da solução se deu pela diluição de 9 mg de B[a]P em 10 ml de solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% e agitados até completa homogeneização. Para pesagem das doses foi utilizada balança milimesimal de grama Ohaus- Analytical Standard.

A injeção subcutânea foi realizada logo após tricotomia na região do dorso com tamanho de 2cm<sup>2</sup>. Para este procedimento não foi utilizado anestésico.

#### **4. 5 Eutanásia e preparo das peças para análise histológica**

A eutanásia, dos animais foi realizada mediante dose letal de tiopental sódico (Cristalia – produtos químicos e farmacêuticos Ltda. – Campinas) pó estéril diluído em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% , por via intraperitoneal 150mg/kg,

A retirada de amostras de pele (2 cm<sup>2</sup>) e de órgãos foi realizada com os animais posicionados e fixados em decúbito dorsal, após constatação de óbito.

As peças foram identificadas (data da eutanásia, número do animal e grupo), colocadas em cassetes e fixadas em formol a 10% por um período de 24 horas após o processo de retirada.

O processo histológico foi iniciado após 24 horas de imersão em formaldeído, com 01 hora de imersão em álcool etílico a 90%, 01 hora de imersão em álcool a 95%, e 04 sessões de imersão com uma 01 hora de duração cada em álcool etílico absoluto.

Posteriormente as peças foram submersas em 02 sessões de 01 hora cada em xilol, seguida de imersão em parafina I durante 02 horas, parafina II durante 02 horas e emblocamento com parafina histológica acrescida de 20% de cera de abelha em 02 sessões de 2,05 minutos.

Os blocos foram cortados com navalha de 04 micras, os cortes resultantes foram colocados em lâminas e posteriormente em estufa a 60°C por aproximadamente 12 horas.

Após a desparafinização, os cortes sofreram coloração com hematoxilina eosina (HE). Inicialmente as lâminas foram submersas durante 02 minutos em xilol I, seguido de 02 minutos em xilol II, hidratadas com imersão por 1,5 minutos em álcool

etílico a 80%; 1,5 minutos em álcool etílico a 70%; 02 minutos em água e imersas em hematoxilina por 1,5 minutos.

O processo de desidratação foi realizado com imersão em água seguida de imersão por 04 minutos em eosina. Foram realizadas sessões de imersão com duração de 1,5 minuto em álcool etílico a 80%; 90%; e 03 sessões em álcool etílico absoluto. Novamente banho de xilol I duração de 01 minuto, banho de xilol II duração 01 minuto e imersão em Xilol III durante aproximadamente 20 minutos.

Os cortes foram analisados por um profissional patologista e os achados histológicos descritos para posterior análise. As imagens foram analisadas e depois capturadas em microscópio Carl Zeiss acoplado a uma microcâmera Samsung conectada a um computador com placa de captura de imagens e o software IMAGELAB pertencente ao laboratório de Pesquisa Tecidual e Biologia Molecular.

#### 4.6 Análise histopatologia

Para a descrição dos resultados, as análises foram distribuídas em avaliação macroscópica e microscópica da pele, fígado e pulmão.

Para tanto foram definidos como critérios macroscópicos e microscópicos para cada órgão, conforme presença e ausência, apresentados nos quadros 1 a 6, configurando o protocolo de anotação dos resultados para cada animal, ao término do tempo para cada grupo.

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.

<b>Aspecto macroscópico</b>	<b>Presente (+)</b>	<b>Ausente (-)</b>
Ulceração local		
Estrutura exposta		
Crosta		
Exsudação		
Evolução da cicatriz		
Tecido de granulação		

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.

<b>Aspecto microscópico</b>	<b>Presente (+)</b>	<b>Ausente (-)</b>
Ulceração		
Tecido de granulação		
Vasos neoformados		
Acantose		
Exsudação		
Infiltrado celular		
Macrófagos		
Fibroblastos		

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.

<b>Aspecto macroscópico</b>	<b>Presente (+)</b>	<b>Ausente (-)</b>
Pontos nodulares		
Deformidade		

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.

<b>Aspecto microscópico</b>	<b>Presente (+)</b>	<b>Ausente (-)</b>
Congestão		
Tumefação		
Exudação		
Esteatose		
Carcinoma hepatocelular		

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.

<b>Aspecto macroscópico</b>	<b>Presente (+)</b>	<b>Ausente (-)</b>
Alteração do tamanho		
Pontos pretos		

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.

<b>Aspecto microscópico</b>	<b>Presente (+)</b>	<b>Ausente (-)</b>
Alvéolos aerados		
Septos inter alveolares		
Congestão vascular		
Hiperplasia de BALT		

## 5 Resultados e Discussão

Os resultados que foram observados foram tabelados conforme presença ou ausência dos parâmetros que caracterizaram as alterações encontradas nas análises macro e microscópicas da pele, estão apresentados nas tabelas 1 e 2.

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.

Aspecto macroscópico	Grupo I									Grupo II								
	15 dias			30 dias			45 dias			15 dias			30 dias			45 dias		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Ulceração local	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Estrutura exposta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Crosta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Exsudação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Evolução da cicatriz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Tecido de granulação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-

(+): presença da alteração

(-): ausência da alteração

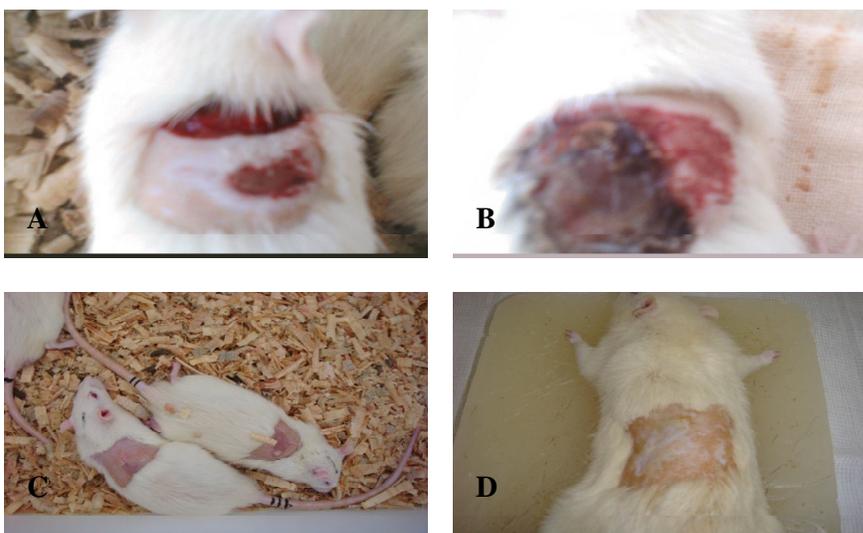


Figura 2- Fotografia mostrando o aspecto da cicatriz do local de aplicação do B[a]P; 15 dias (A), 30 dias (B) e 45 dias (C e D).

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.

Aspecto microscópico	Grupo I									Grupo II								
	15 dias			30 dias			45 dias			15 dias			30 dias			45 dias		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Ulceração	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Tecido de granulação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Vasos neoformados	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Acantose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Exsudação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Infiltrado celular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Macrófagos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Fibroblastos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

(+): presença da alteração

(-): ausência da alteração

Apresenta-se na tabela 2 a presença ou ausência de características observadas histopatologicamente, onde no grupo 1 não há qualquer incidência de tais alterações já que os animais foram apenas alimentados e observados até o dia da eutanásia, nos tempos de 15,30 e 45 dias.

No grupo II, dada a evolução da lesão e a cicatrização da mesma, na observação feita nos 15 dias de evolução, considera-se compatível a incidência de ulceração em todos os animais, tecido de granulação, exsudação e neovascularização até os 30 dias, pois também estes parâmetros são observados durante o processo de cicatrização. O B[a]P foi diluído em substância inerte, restando à responsabilidade pelas demais alterações características de lesão em processo de cicatrização, causada pelo próprio químico.

Não há evidência de que a observação dos parâmetros macro e microscópicos possam caracterizar um relato neoplásico, no entanto como o B[a]P é reconhecido como carcinógeno, a avaliação das alterações nos demais órgão poderão mostrar que durante este processo, houve efeito carcinogênico.

Segundo Kong *et al.* (1994), o B[a]P constitui um dos mais estudados HAP, por ser comumente encontrado em produtos contaminastes advindos da queimada de combustível fósseis, especialmente carvão mineral, bem como nos produtos de exaustão de motores de combustão interna. É capaz de produzir uma ampla variedade de lesões tóxicas, incluindo a carcinogênese em modelos animais.

Para a observação das alterações histológicas caracterizadas pelos parâmetros definidos considera-se importante a visualização das mesmas estruturas que se apresentam sem alterações, conforme a figura 3.

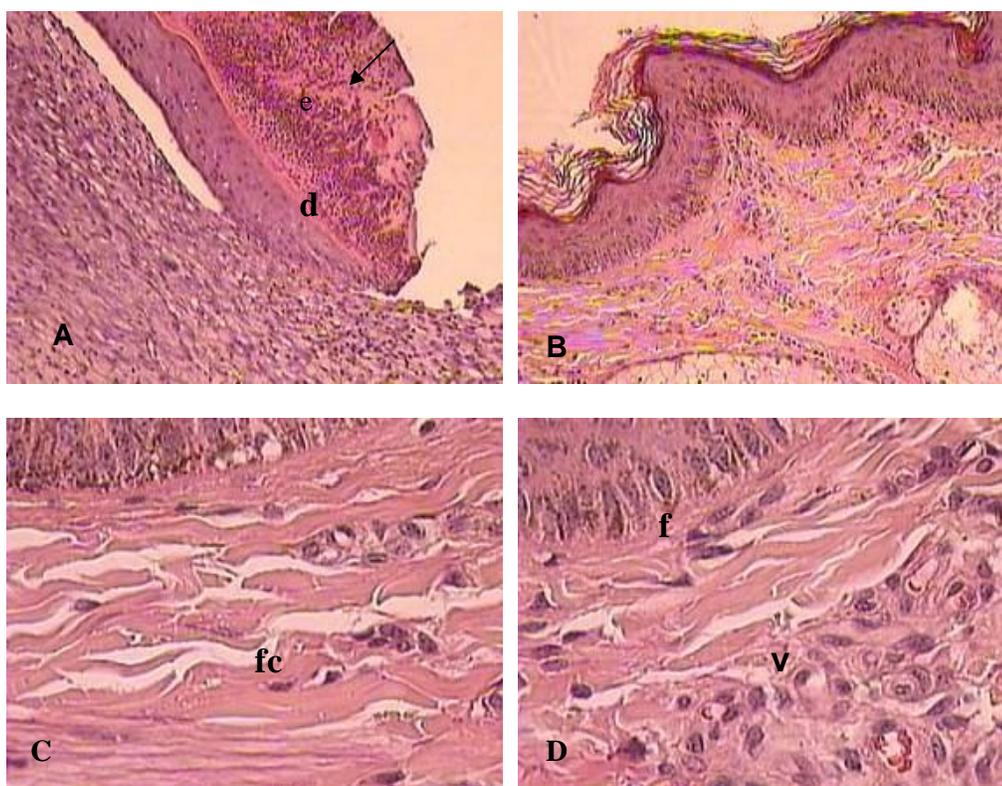


Figura 3- Fotomicrografia da pele de ratos Wistar com aspecto normal (Controle) animal . A - Visão geral da epiderme (e) e derme (d). B - todas as camadas da epiderme C e D - aspecto habitual da derme mostrando as fibras colágenas (fc), fibroblastos (c) e vascularização (v). HE. A e B 100x ,C e D 400x.

A figura 4 mostra as alterações na pele após 15 dias de exposição ao B[a]P, área de ulceração da epiderme revestida por crosta fibrinoleucocitária. Na derme subjacente à crosta, notou-se a presença de tecido de granulação inicial constituído por vasos capilares neoformados com luz irregular revestida por endotélio

proeminente. Verificou-se, ainda, exsudação neutrofílica importante e discreto depósito de colágeno, mostradas nas tabelas 1 e 2.

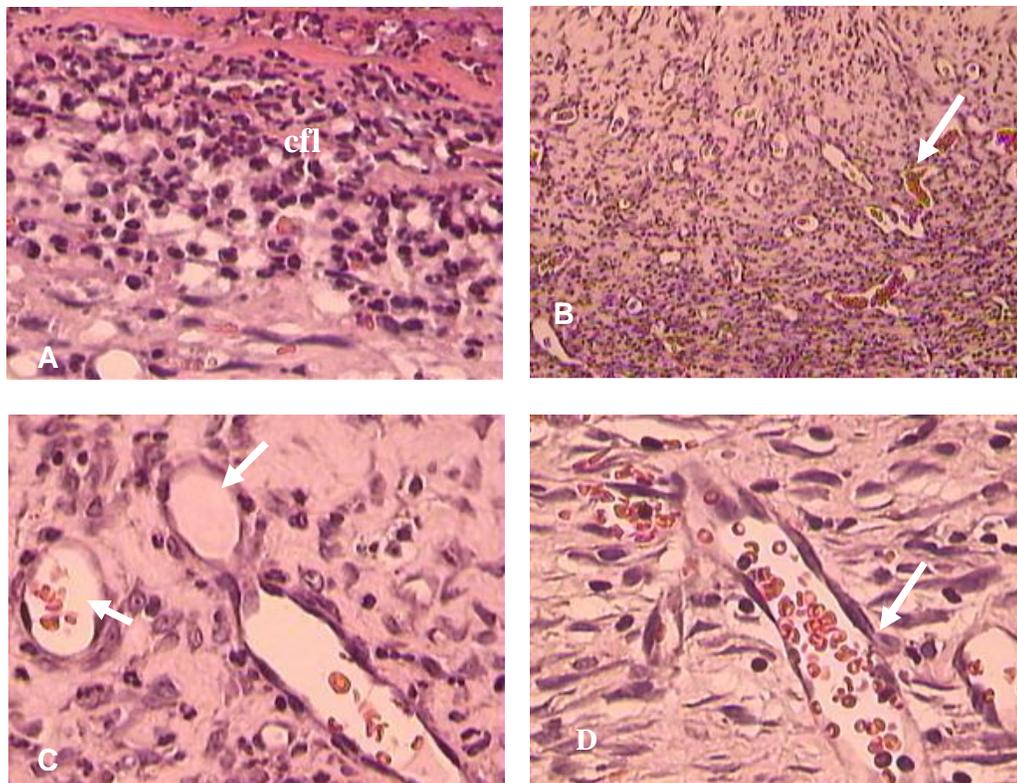


Figura 4 – Fotomicrografia da pele de ratos Wistar com 15 dias após a aplicação de benzopireno na proporção de 9 mg/kg animal 2. A) - restos de neutrófilos e necrose formando uma crosta fibrinoleucocitária (cfl). B) numerosos vasos neo-formados (seta). C e D) vasos neo-formados revestidos por endotélio proeminente (seta). HE. A , C e D 400x; B 100x.

A figura 5 mostra as alterações na pele após 30 dias de exposição ao B[a]P, observaram-se aumento da camada espinhosa da epiderme (acantose) em relação ao controle e alguns ninhos dérmicos. Na derme subjacente notou-se tecido de granulação mais tardio constituído por vasos neoformados, mostrando endotélio de aspecto habitual. Foram observados, ainda, discreta exsudação neutrofílica e infiltrado de células mononucleares com predominância de macrófagos, alguns com pigmentos de hemosiderina intracitoplasmático. Havia, também, proliferação fibroblástica e depósito de colágeno, mostradas nas tabelas 1 e 2.

Segundo Balkwill e Mantovani (2001), o componente inflamatório de um tumor em desenvolvimento pode incluir diversas células, por exemplo, neutrófilos, células

dendríticas , macrófagos, eosiófilos e mastócitos bem como linfócitos, todos capazes de produzir uma variedade de citocinas , mediadores citotóxicos, incluindo espécies reativas de oxigênio e serina ou cisteínoas, proteases, MMPs e agentes perfurantes de membrana, além de mediadores de morte celular, interleucinas e interferons.

Segundo Scoppmann et al.(2002)os macrófagos associados a tumores exercem um papel ambíguo em neoplasias, a infiltração de macrófagoa esta intimamente relacionada à angiogênese associada ao tumor, bem como à disseminação de metástases.

Segundo Di Carlos et al.,(2001) e Ishihara, Ijima e Matsunaga, (1998)os neutrófilos representam a primeira linha de defesa contra agressões e são potentes efetores da inflamação.

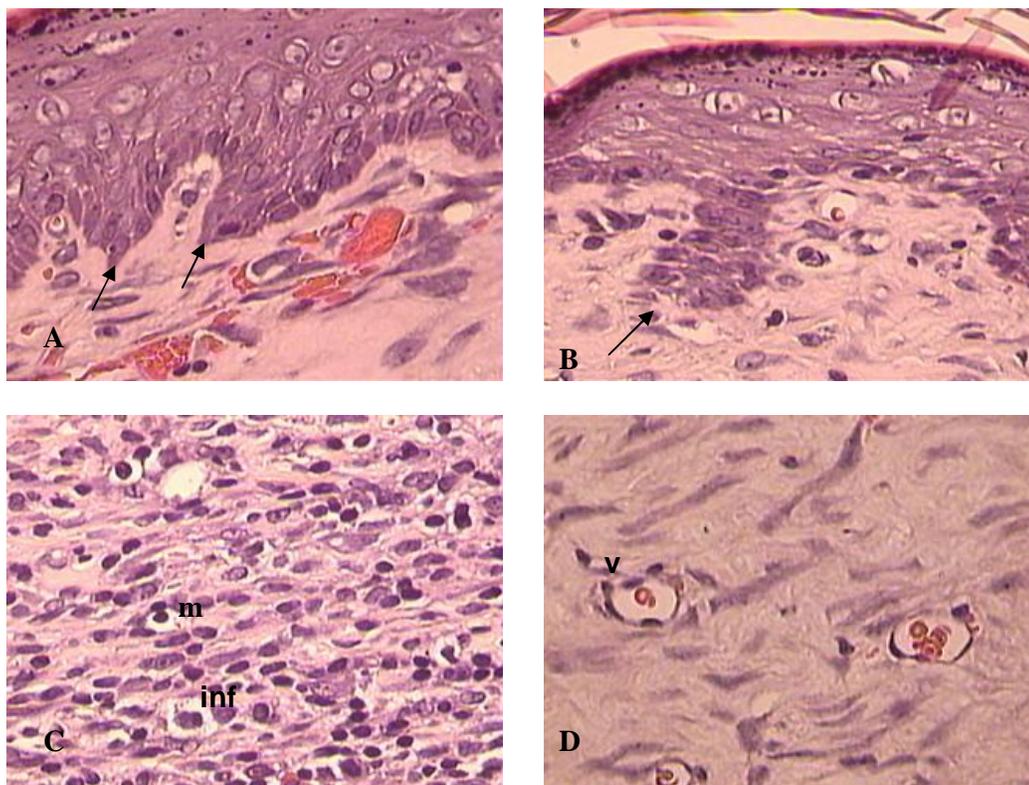


Figura 5 – Fotomicrografia da pele de ratos Wistar com 30 dias após a aplicação de benzopireno na proporção de 9 mg/kg , animal 2. A e B) áreas de acantose (seta) evidenciando uma discreta hiperplasia de células epiteliais. C) Infiltrado inflamatório misto: neutrófilos e linfócitos (inf). Macrófago com pigmento intracitoplasmático (m). D) vasos neoformados com endotélio de aspecto habitual (v). HE/100x A e C; 400x B e D.

A figura 6 mostra as alterações na pele após 45 dias de exposição ao B[a]P, a pele encontrava-se íntegra, cicatrizada, com discreto aumento de camadas de células. Na derme subjacente predominava importante depósito de colágeno acompanhado de discreto infiltrado mononuclear, configurando um processo de cicatrização, mostradas nas tabelas 1 e 2. Mesmo a presença de vasos revestidos por endotélio (setas) proeminente e ao redor, fibroblastos ainda não se considera caracteristicamente a neoplasia, pois conforme Botelho *et al* (2007), o Vascular Endotelial Growth Factor (VEGF) tem atividade mitogênica, estimula a migração celular, a angiogênese e a permeabilidade vascular que podem ser importantes para a carcinogênese em diversos órgãos e glândulas marcação esta, não realizada neste experimento.

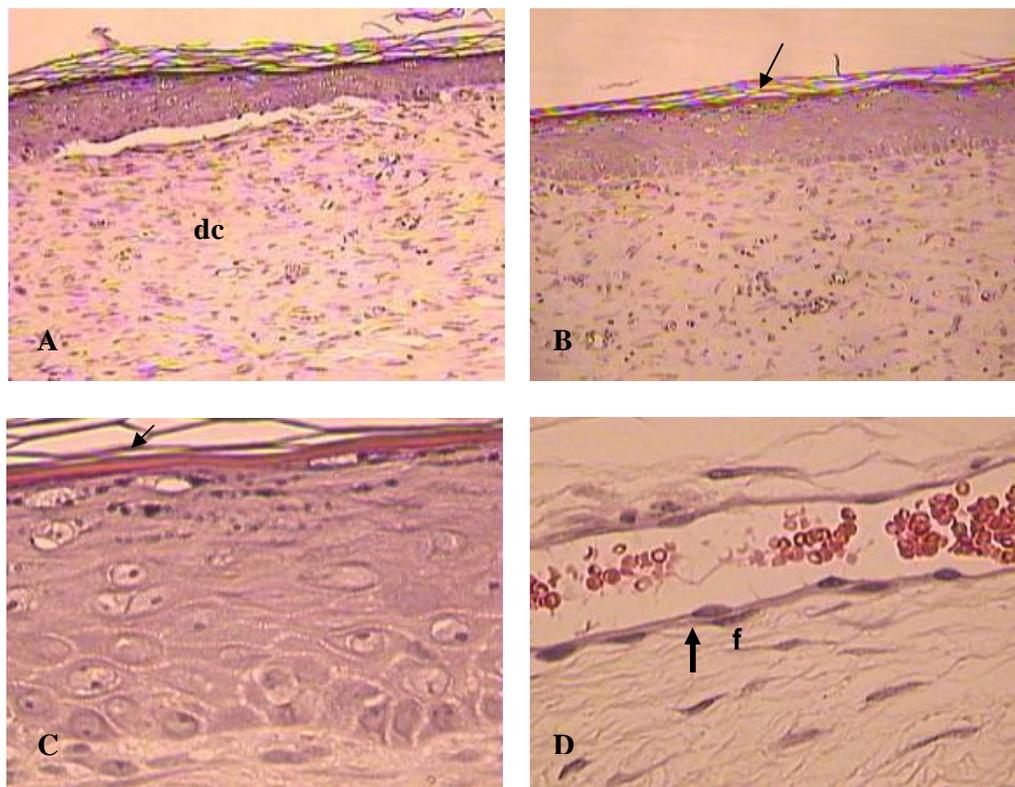


Figura 6 – Fotomicrografia da pele de ratos Wistar com 45 dias após a aplicação de benzopireno na proporção de 9 mg/kg, animal 1. A) pele exibindo depósito de colágeno (dc) na derme. B e C) Epiderme íntegra, retificada (seta). D) vaso revestido por endotélio (setas) proeminente e ao redor, fibroblastos (f). HE/ A e B, 100x; C e D, 400x.

Nas tabelas 3 e 4, apresentam-se os parâmetros observados macro e microscopicamente no fígado dos ratos 1, 2 e 3 , aos 15, 30 e 45 dias.

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.

Aspecto macroscópico	Grupo I									Grupo II											
	15 dias			30 dias			45 dias			15 dias			30 dias			45 dias					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Pontos nodulares	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Deformidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-

(+): presença da alteração

(-): ausência da alteração

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.

Aspecto microscópico	Grupo I									Grupo II											
	15 dias			30 dias			45 dias			15 dias			30 dias			45 dias					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Congestão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tumefação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Exudação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Esteatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Carcinoma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hepatocelular																					

(+): presença da alteração

(-): ausência da alteração

No grupo II, observa-se congestão vascular e tumefação dos 15 aos 45 dias comum para todos os animais, com 15 dias ainda observamos exudação, aos 30 dia encontramos pontos nodulares, deformidades e exudação, aos 45 dias encontramos esteatose.

Tipos de lesões celulares no fígado, tumefação celular, esteatose, necrose (coagulativa, de liquefação e caseosa) e apoptose (KUMAR , 1994).

A figura 7 mostra o aspecto normal do fígado.

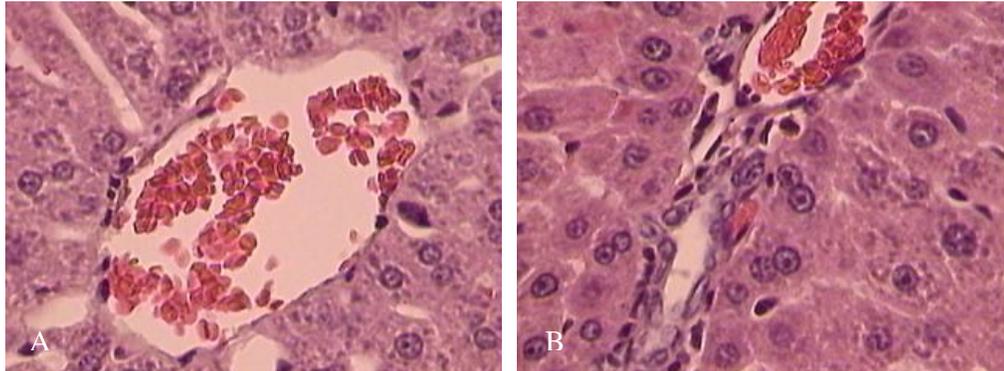


Figura 7 – Fotomicrografia do fígado de ratos Wistar com aspecto normal (Controle) animal 3. A e B. HE/400x.

A figura 8 mostra as alterações no fígado após 15 dias de exposição ao B[a]P, apresentou congestão vascular em sinusóides e em vasos maiores, tumefação celular dos hepatócitos. No entanto, a arquitetura hexagonal do tecido foi mantida mostradas nas tabelas 3 e 4.

Segundo, Silva, (1989), Sebe, (1999), Miranda, (2004) a Congestão vascular dos sinusóides hepáticos reflete uma resistência à circulação sangüínea traduzindo um processo de edema e obstrução vascular intra-parenquimatosa. A presença de hemácias extravasadas nos sinusóides pode estar associada a uma vaso dilatação como conseqüência de um processo inflamatório na sua fase inicial ou de uma solução de continuidade vascular, conseqüência de lesão endotelial.

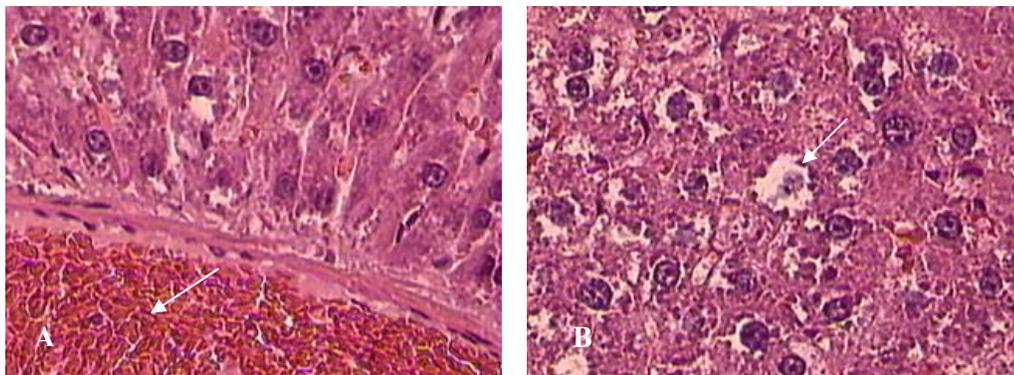


Figura 8 – Fotomicrografia do fígado de ratos Wistar com 15 dias após a aplicação de benzopireno na proporção de 9 mg/kg animal 2. A) Congestão Vascular(seta) ;B) Área de tumefação celular (seta). HE/400x A e B.

A figura 9 mostra as alterações no fígado após 30 dias de exposição ao B[a]P, tumefação celular diminuiu e a congestão vascular é ainda observada nos vasos maiores. A arquitetura hexagonal foi mantida, mostradas nas tabelas 3 e 4.

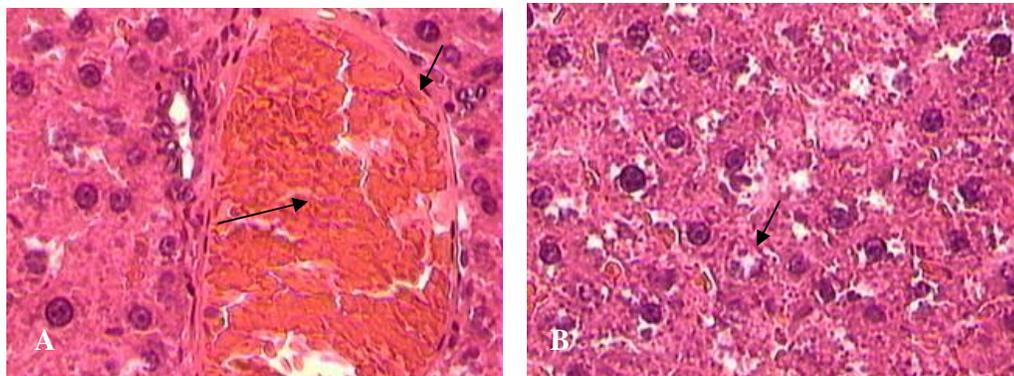


Figura 9 – Fotomicrografia do fígado de ratos Wistar com 30 dias após a aplicação de benzopireno na proporção de 9 mg/kg animal 2. A) Congestão vascular (seta); B) Área de tumefação celular (seta). HE/400x. A e B.

A figura 10 mostra as alterações no fígado após 45 dias de exposição ao B[a]P, o aspecto anterior se repete, acrescido de discreta esteatose, mostradas nas tabelas 3 e 4.

Segundo Foth, Kahl, Kahl, (1988) e Withey, Shedden, (1993) níveis detectáveis de HPAs podem ser observados em muitos órgãos internos de minuto a horas após a administração. Os maiores níveis são encontrados no fígado. Em ratos, foi observado que entre 30 a 50% da dose oral de benzopireno foram rapidamente absorvidas e a maior parte dos compostos foi prontamente metabolizada no fígado (efeito de primeira passagem).

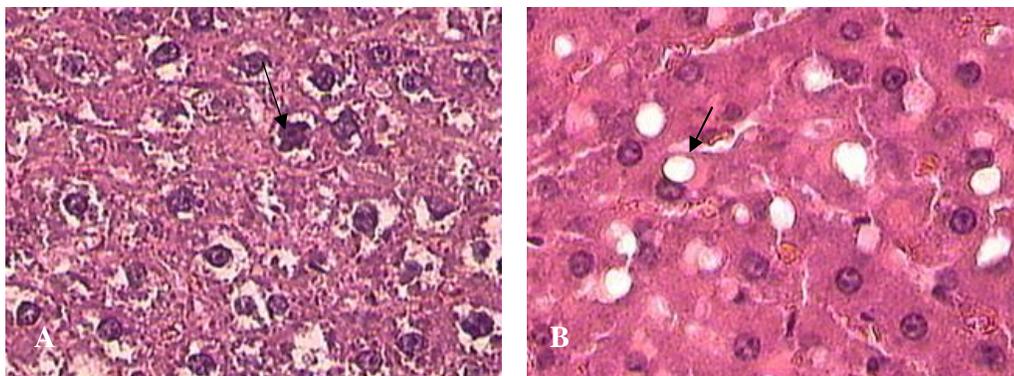


Figura 10 – Fotomicrografia do fígado de ratos Wistar com 45 dias após a aplicação de benzopireno na proporção de 9 mg/kg animal 3. A) Área de tumefação celular (seta). B) Esteatose -vacúolos e gordura intracitoplasmática (seta) . HE/400x A e B.

Nas tabelas 5 e 6, apresentam-se os parâmetros observados macro e microscopicamente no pulmão dos ratos 1, 2 e 3, aos 15, 30 e 45 dias.

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.

Aspecto macroscópico	Grupo I									Grupo II											
	15 dias			30 dias			45 dias			15 dias			30 dias			45 dias					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Alteração do tamanho	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Pontos pretos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+): presença da alteração

(-): ausência da alteração

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.

Aspecto microscópico	Grupo I									Grupo II											
	15 dias			30 dias			45 dias			15 dias			30 dias			45 dias					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
Alvéolos aerados	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Septos inter alveolares	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Congestão vascular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hiperplasia de BALT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

(+): presença da alteração

(-): ausência da alteração

Apresenta-se na tabela 6 a presença ou ausência de características observadas histopatologicamente, onde no grupo I não há qualquer incidência de tais alterações já que os animais foram apenas alimentados e observados até o dia da eutanásia, nos tempos de 15,30 e 45 dias.

No grupo II, na observação feita nos 15 dias de evolução, considera-se compatível a incidência de congestão vascular em todos os animais e em todos os tempos de observação e aos 45 dias observa-se hiperplasia de BALT.

O B[a]P foi diluído em substância inerte, restando à responsabilidade pelas demais alterações características de lesão em processo de cicatrização, causada pelo próprio químico.

Não há evidência de que a observação dos parâmetros macro e microscópicos possam caracterizar um relato neoplásico, no entanto como o B[a]P é reconhecido como carcinógeno, a avaliação das alterações no pulmão pode mostrar que durante este processo, houve efeito carcinogênico. Pois, a hiperplasia de BALT e considerada carcinogênese segundo alguns autores.

A figura 11 mostra o aspecto normal do fígado.

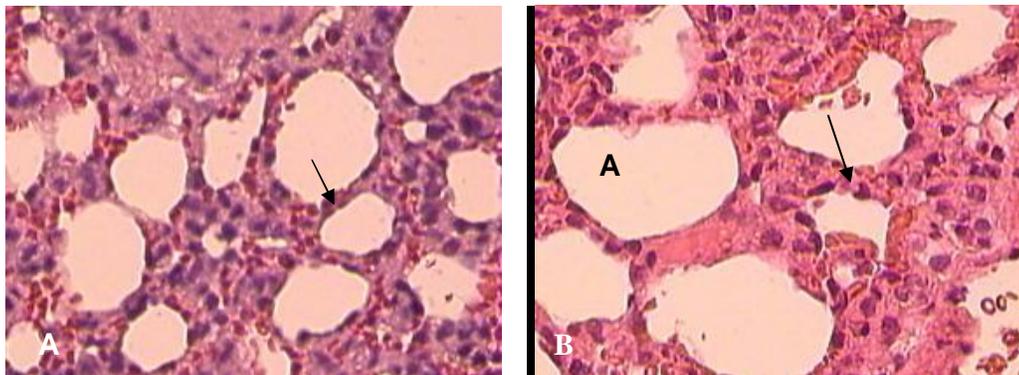


Figura 11 – Fotomicrografia do pulmão de ratos Wistar com aspecto habitua (Controle), animal 2. Alvéolos aerados (A) e septos alveolares (setas), HE/100x A e 400x B.

Na avaliação realizada no pulmão após 15, 30 e 45 dias da aplicação de benzopireno, o aspecto histológico do órgão foi semelhante em todos os períodos.

A figura 12 mostra as alterações no pulmão após 15 dias de exposição ao B[a]P, observou-se parênquima pulmonar constituído por alvéolos areados (com ar), septos inter-alveolares delgados. Os brônquios e as artérias mantiveram o aspecto habitual. Também foram observadas discreta congestão vascular em vasos menores e na artéria pulmonar, mostradas nas tabelas 5 e 6.

Não foram encontrados relatos na literatura consultada que relacione o uso do benzopireno via cutânea com alterações morfológicas no pulmão.

Segundo Foth, Kahl, Kahl,(1988) Os trabalhos relatam que os HPA são altamente lipossolúveis e rapidamente absorvido pelos pulmões, intestinos e pele em experimento com animais, independente da rota de administração. Em trabalho realizado pelos mesmos pesquisadores, o padrão de distribuição foi similar depois de administração subcutânea, intravenosa e intratraqueal, tanto em ratos quanto em camundongos.

Silva *et al.*, (2006), em seu trabalho usou uma metodologia diferente, injetou B[a]P intrapulmonar e observou hiperplasia de BALT após a 12ª semana.

Segundo Harrigan *et al.*, (2003), a carcinogênese de pulmão após a exposição ao benzopireno pode ser uma consequência de muitos fatores bioquímicos, incluindo os que afetam a absorção, metabolismo e reparo de DNA.

Ponticiello *et al.*, (2000) e Miranda *et al.*, (2003), consideram a lesão hiperplásica como uma das alterações associadas ao desenvolvimento do câncer de pulmão, como outros linfomas, acredita-se que a hiperplasia de BALT origina-se a partir de uma hiperplasia linfóide por seleção neoplásica anormal, freqüentemente associada a interação antigênica com poluentes ambientais.

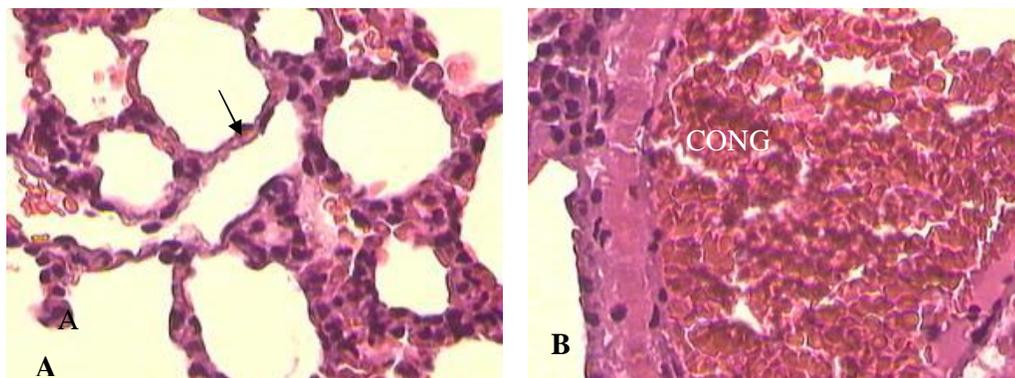


Figura 12– Fotomicrografia do pulmão de ratos Wistar com 15 dias após a aplicação de benzopireno na proporção de 9 mg/kg, animal 2. A) septos alveolares (setas). B) congestão vascular (CONG), HE/400x A e B.

A figura 13 mostra as alterações no pulmão após 45 dias de exposição ao B[a]P, alvéolos areados (com ar), septos inter-alveolares delgados. Os brônquios e as artérias mantiveram o aspecto habitual. Também foi observada discreta congestão vascular em vasos menores e na artéria pulmonar, maior quantidade de congestão vascular e hiperplasia de BALT, mostradas nas tabelas 5 e 6.

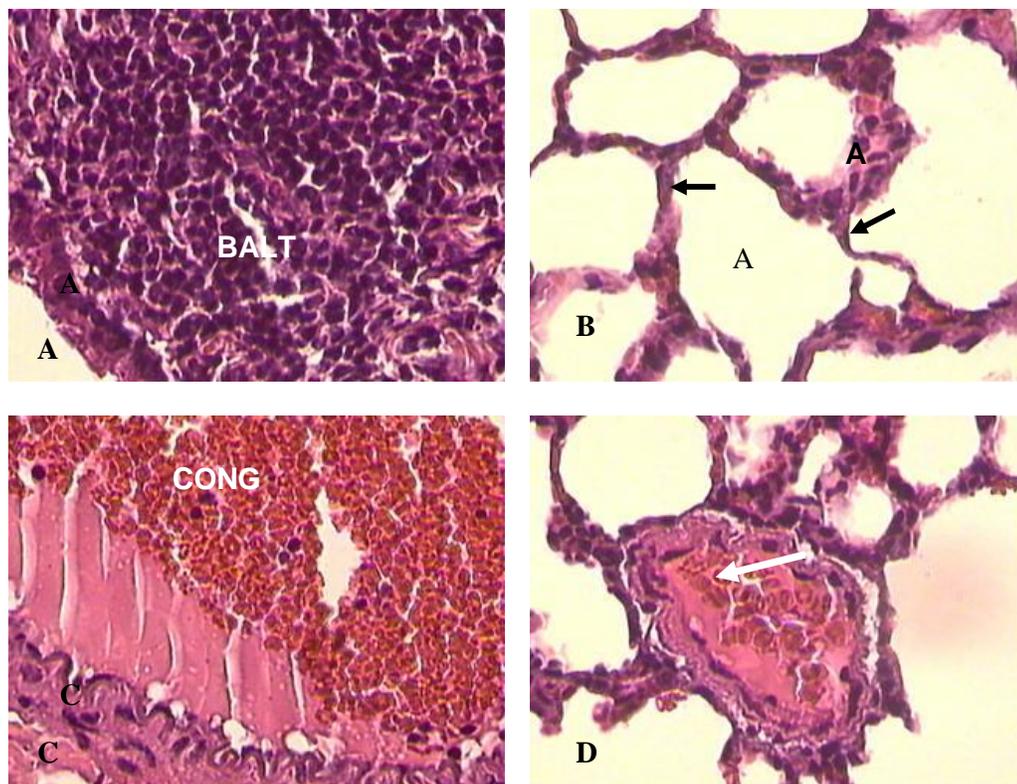


Figura 13– Fotomicrografia do pulmão de ratos Wistar com 45 dias após a aplicação de benzopireno na proporção de 9 mg/kg, animal 2.A) tecido linfóide ligado à mucosa brônquica (BALT). B) alvéolos aerados (A) e septos alveolares (setas). C) congestão vascular maior (CONG) e D) congestão (seta). HE/100x A e 400x B, C e D.

## 6 CONCLUSÕES

A injeção subcutânea de benzopireno é um método de fácil realização e pode constituir um modelo adequado de carcinogênese.

Considerou-se a hiperplasia modular de BALT como lesão carcinogênica inicial no pulmão.

As principais alterações secundárias ocorreram 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.

Em modelos com maiores tempos de evolução, outras características histológicas, carcinogênicas poderão ser observadas.

## 7 REFERÊNCIAS

- Akemi IL. Basal cell carcinoma of the eyelid: factors related to recurrence. *An. Bras. Dermatol.* Rio de Janeiro 2004, 79, (4).
- Azevedo FA, Chasin AM. *As bases toxicológicas da ecotoxicologia.* São Carlos: São Paulo: 2003: 340.
- Balkwil F, Mantovani, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 2001: 357: 539-345.
- Balmain A, Harris CC. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. *Carcinogenesis*, 2000;21,(3): 371-377.
- Botelho F, Pina F, Silva P, Figueiredo G, Lunet N, Cruz F, Barros H. Vascular Endotelial growth factor(VGEF)e patologia prostática.*act. urol.*2007,24(2):55-134.
- Cohen A J. Ambient air pollution as a risk factor for lung cancer. *Salud pública Méx, Cuernavaca*, 1997; 39, (4).
- Deschner E E. Experimentally induced cancer of the colon. *Cancer*.1974; 34:824-828.
- DiCarlos E, Lezzi M, Pannellini T, Zaccardi F, Modesti A, Forni G, MUSIANI P. Neutrophils in anti-cancer immunological strategies: old players in new games. *J. Hermatother. Stem Cell Res.* 2001; 10: 739-748.
- Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities tumor stroma, generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* 1986; 315: 1659-1986.
- Fassoni AA, Salles CLF, Consolaro A. Carcinogênese bucal quimicamente induzida por DMBA: Estudo em hamsters sírios dourados. *Rev Odontol USP*, 1993; 7, (4), 285-91.
- Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax Surg.* 2003; 76: 167-174.
- Foth H, Kahl R. Kahl GF. Pharmacokinetics of low doses of benzo[a]pyrene in the rat. *Food Chemistry Toxicology*, 1988; (26), 45–51.
- Franklin WA. Diagnosis of lung cancer- pathology of invasive and preinvasive neoplasia. *chest*.2000; 117, 80-89.
- Gerde P, Muggenburg BA, Thornton-manning JR, Lewis JL, Pyon KH, Dahl AR. Benzo[a]pyrene at an environmentally relevant dose is slowly absorbed by, and

extensively metabolized in, tracheal epithelium. *Carcinogenesis*. 1997; 18(9): 1825-1832.

Grier W, Robson N - In: Andrade e cols. - *Cancer of the skin*. Philadelphia. WB Saunders Company, 1976; (2), 916-932.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of câncer.cell. 2000; 100, (1): 57-70.

Harrigan JA, Vezina CM, McGarrigle BP, Ersing N, Box HC, Maccubbin AE, Olson JR. DNA adduct formation in precision-cut rat liver and lung slices exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicol Sci*. 2003; 77: 307-14.

Herceg, Z. epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis*. 2007; 22,(2): 91-103.

Hetch SS. Mtabolically activated carcinogenesis and mutations in the p53 tumor suppressor gene in lung cancer. *J Natl Cancer inst*. 2000; 92(10): 782-783.

IARC - International Agency For Research On Cancer. *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Humans*, Lyon, France: 1985(35) Instituto nacional do câncer. Descrição do câncer: INCA, 2008.

Kong LY, Luster MI, Dixon D, O'Grady J. Rosenthal GJ. inhibition of lung immunity after intratracheal instillation of benzo[a]pireno. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*. 1994; 150: 1123-1129.

KUMAR, V. *Patologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 608p

Meuwissen R, Berns A. Modelo para o câncer pulmonar humano. *Genes e colaborador*. 2005; 19: 643 -664.

Miranda DGN, Jamnik S, Santoro IL, Uehara C. Avaliação do escarro induzido no diagnóstico do carcinoma brônquico. *Ver Brás Cancerol*.2003; 49(2): 91-98.

Miranda LEC, Viaro F, Ceneviva R, Evora, PRB. Bases experimentais da lesão por isquemia e reperfusão do fígado. *Acta Cir Bras*. 2004;19(1):3-12

Miller EC, Miller JA. Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Câncer*. 1981; 1: 1055-1064.

Montenegro MR, Franco M. *Patologia processos gerais*. 4ª ed. Ateneu; 1999.p. 223-254.

Morais PM, Schettini APM, Chirano CA. Bednar tumor (pigmented dermatofibrosarcoma protuberans). *An. Bras. Dermatol.*, May/June. 2005, 80, (3), 273-276.

NIOSH – National Institute for Occupational Safety and Health *Carcinogenic Effects of Exposure to Diesel Exhaust*, 2001.

Oliveira TB, Cury PM. Câncer de pulmão. *HB cient*.2002; 9(1), 25-38.

Oga, S. Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Ateneu, 1996.

Ornellas LC, Lanzoni VP, Toledo CF. Malignant melanoma with liver and spleen metastases: case report. *Med. J. Sao Paulo*, 2000, 118 (2): 53-56.

Pereira N A. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. *Quím. Nova*, 2000, 23, (6), 765-773.

Pinheiro AMC, Friedman H, Cabral ALSV. Cutaneous Melanoma: clinical, epidemiological and histopathological characteristics at the University Hospital of Brasília between January 1994 and April 1999. *An. Bras. Dermatol.*, Mar./Apr. 2003, 78, (2), 179-186.

Ponticiello A, Barra E, Giani U, Bocchino M, Sanduzzi A. p53 immunohistochemistry can identify bronchial dysplastic lesions proceeding to lung cancer: a prospective study. *Eur respire. J.* 2000.15: 547-552.

Rodrigues MAM; Camargo JLV. Carcinogênese. In: Montenegro MR, Franco M. *Patologia processos gerais*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1999; 13, 23-40.

Rom WN, Feno JG, Lee TC, Jiang Y, Tchou-Wong . Aspectos moleculares e genéticos do câncer pulmonar. *MED do cuidado do Am J Res Crit.* 2000; 161:1355 - 1367.

Scoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Cauco G, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K, Kerjaschki D. Tumor-Associated Macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am. J. Pathol.* 2002; 161: 947-956.

Sebe AA. Efeito da isquemia no fígado de ratos em diferentes tempos. [Tese – Doutorado], São Paulo (SP): Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina; 1999

Silva BAK; Silva IS, Pereira DM, Aydos RD; Carvalho PTC. Usefulness of argyrophilic nucleolar organizer regions in detection of lung cells alterations after benzo[a]pyrene instillation. *Acta Cir Bras.* 2006;21(Suppl 4):36-39.

Silva JG - In: Sucena RC - *Cirurgia plástica São Paulo*. Livraria Roca Ltda.1982; (1), Sucena RC - *Cicatriz de queimadura: degeneração maligna*. São Paulo, 1973; (Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Silva Jr OC, Beer AJR. *Modelos Experimentais de pesquisa em cirurgia*. 1998; São Paulo, Robe, 840p

Souza CRV. Carcinogênese de pele e pulmão de em linhagens de camundongos selecionados segundo a reatividade inflamatória aguda [tese]. São Paulo: Instituição de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

Vecchia JVS. O câncer. UFV, 2005.

Withey J R, Shedden J, Law F C. S. Distribution of benzo[a]pyrene in pregnant rats following inhalation exposure and a comparison with similar data obtained with pyrene. *Journal of Applied Toxicology*, 1993, (13), 193-202.

Wong DTW, Biswas DK. Mechanism of benzo[a]pyrene induction of alpha-human chorionic gonadotropin gene expression in human lung tumor cells. *J Cell Biol.* 1985; 1001: 2245-2252.

Woolf N. Oncogenesis In: Pathology, basic and systemic, London: W.B. Saunders, 1998;29, 290-304.

Zeimanowicz MA, Câncer de fígado – detecção precoce, ABC da Saúde, 2006.