

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

EFEITO DA NICOTINA INJETÁVEL E DA FUMAÇA DO CIGARRO EM UM MODELO
EXPERIMENTAL DE LESÕES INTRA-EPITELIAIS E DE ADENOCARCINOMA
PANCREÁTICO INDUZIDOS POR
7,12-DIMETILBENZANTRACENO (DMBA) EM CAMUNDONGOS

VIVIAN PIERRI BERSCH

Porto Alegre, outubro de 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

Efeito da nicotina injetável e da fumaça do cigarro em um modelo experimental de
lesões intra-epiteliais e de adenocarcinoma pancreático induzidos por 7,12-
dimetilbenzantraceno (DMBA) em camundongos

Tese de Doutorado

VIVIAN PIERRI BERSCH

Orientadores: Prof. Luiz Rohde
Profa. Maria Isabel Albano Edelweiss

Porto Alegre, outubro de 2006

ORIENTADORES

Prof. Luiz Rohde

Prof. Titular de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFRGS
Chefe do Serviço de Cirurgia do Aparelho Digestivo do HCPA

Profa. Maria Isabel Albano Edelweis

Profa. Adjunta de Patologia da Faculdade de Medicina da UFRGS

A defesa da Tese ocorreu em 09 de novembro de 2006 na Faculdade de Medicina da UFRGS.

Participaram da Banca Examinadora os Professores Doutores:

José Eduardo Ferreira Manso (UFRJ)

Sérgio Gabriel Silva de Barros (UFRGS)

Richard Gurski (UFRGS)

Luise Meuer (UFRGS)

Aprovação com conceito final **A**, “com louvor”.

1 B535E BERSCH, VIVIAN PIERRI

Efeito da nicotina injetável e da fumaça do cigarro em um modelo experimental de lesões intra-epiteliais e de adenocarcinoma pancreático induzidos por 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) em camundongos / Vivian Pierr Bersch ; orient. Luiz Rohde, Maria Isabel Albano Edelweiss. – 2006.

120 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Cirurgia. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Neoplasias pancreáticas 2. Adenocarcinoma 3. Nicotina 4. 9,10-Dimetil-1,2-benzantraceno 5. Modelos animais de doenças 6. Camundongos I. Rohde, Luiz II. Edelweiss, Maria Isabel Albano III. Título.

NLM: WI 810

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

"A verdadeira viagem de descoberta consiste não em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos."

Marcel Proust, escritor francês (1871-1922)

À minha Família.

Aos novos

e aos eternos integrantes.

Obrigada pelos momentos de descontração, alegria e estímulo,
mas principalmente obrigada pelo incondicional apoio que sempre recebi.

Obrigada Ros, Paulo, Roberto, Paula, Mariana, Dilmar, Laurinha e Gabi.

Ao Professor Luiz Rohde.

Seus ensinamentos podem ser adquiridos em várias das bibliografias de sua autoria,
entretanto o prazer da convivência dia a dia,
possibilitando sedimentá-los, é imensurável.

Para mim, é o verdadeiro Mestre cujas atitudes e o bom senso
representam sempre um exemplo a ser seguido.

Obrigada pelo carinho,
pela paciência e principalmente pelo incansável incentivo.

À Professora Maria Isabel Albano Edelweis.

Seu saber, seu humanismo, sua atenção com os alunos,
além de seu constante esmero em suas atividades
são exemplos de obstinação
e seguramente são reconhecidos por todos aqueles com quem convive.

Obrigada pelas suas orientações, sua bondade e sua amizade.

Ao Dr Alessandro Bersch Osvaldt,
Preciosidades são raras,
Amigos, poucos.
Um amigo precioso, uma dádiva.
Resumido em uma só criatura, concentras um enorme talento e múltiplas aptidões.
Obrigada por estar sempre por perto.

AGRADECIMENTOS

A pesquisa em nosso meio científico ainda necessita contornar uma série de dificuldades para se concretizar. Muitos pesquisadores desistem no meio do caminho. Os que persistem, geralmente são os afortunados que encontraram profissionais engajados com a investigação, cujo estímulo e auxílio se tornam fundamentais para conclusão de seus projetos. Foi o meu caso. A todos estes profissionais, o meu profundo agradecimento.

Aos funcionários da Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Prof. Dr. Luiz Lavinski e Profa. Dra. Roseli de Oliveira Möllerke e seus colaboradores, Veterinário Dr. Marcos Eugênio Soares Duarte e Biólogo Eduardo Mottola Amaro da Silveira, administradora Sra. Rosane Paixão Schlatter e secretária Srta. Fabiana Silva da Silva. A presteza de seus serviços, assim como o auxílio na experimentação, o cuidado com o material e com os animais, além do apoio pessoal, foram inestimáveis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia UFRGS, na pessoa de seu Coordenador, o Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Kruel, pela gestão e organização do curso, assim como à sua auxiliar Sra. Helena Beatriz Costa.

Agradeço especialmente a Sra. Estela Maris Araripe, secretária do Mestrado Interinstitucional do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da UFRGS pelos anos de constante atenção, cuidado e carinho que dispensou à minha pessoa, além de sua inquestionável competência na organização e bom andamento dos programas de pós-graduação onde trabalhou e trabalha.

À minha querida colega Dra. Rita de Cássia Alves Schumacher, Patologista do Serviço de Patologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição e mestre em Patologia pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da UFRGS, pela dedicação e competência na sua avaliação histopatológica.

À veterinária Dra. Luisa Macedo Braga e à bióloga Patrícia Sesterheim da Divisão de Produção e Experimentação Animal da Fundação Estadual de Estudos e Pesquisas da Saúde (FEEPS) pela qualidade do atendimento e fornecimento dos camundongos para experimentação.

Ao querido colega Dr. Fabiano Nagel pela minuciosa e crítica revisão do banco de dados. Suas idéias foram fundamentais no direcionamento inicial deste projeto.

Ao estimado amigo Dr. Mário Sérgio Borges da Costa, Cirurgião Geral do HCPA, agradeço pelo companheirismo, incentivo e auxílio na revisão da versão em língua estrangeira, além do excelente exemplo de médico e cirurgião que é. Seu

espírito investigatório, buscando informações solidificadas e concretas a respeito de todos os assuntos em que se envolve, é admirável. Espero poder alcançar tal estágio de conhecimentos na minha atuação profissional.

Ao prezado e igualmente colega Dr. Luiz Roberto Wendt pelo valioso auxílio no treinamento da técnica operatória utilizada nos animais da experimentação, e não menos importante, pela constante tranqüilidade que transmitiu nas mais diversas situações e em suas resoluções durante todos estes anos de trabalho conjunto.

Mais uma vez, ao Professor Dr. Mário Bernardes Wagner pela preciosa orientação estatística.

Às Doutoras Dinara Westphalen Xavier Fernandez e Dierê Xavier Fernandez pela brilhante e cuidadosa revisão estatística.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA e da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde pelo apoio ao protocolo de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, ao Fundo de Incentivo a Pesquisas (FIPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, pelo auxílio financeiro prestado.

Aos funcionários do Serviço de Patologia e do Laboratório de Patologia Experimental do HCPA pela prontidão e qualidade na confecção das lâminas, principalmente na pessoa da Sra. Flávia Grossmann.

Ao Prof. Parimal Choudhury que de maneira tão afável, respondeu prontamente aos e-mails com questionamentos sobre a adequação da solução de nicotina para o estudo e pelo envio de separatas de seus artigos mais atuais sobre o assunto.

À Bibliotecária Sra. Hellen Rose Flores de Flores pelo auxílio com a catalogação bibliográfica.

Aos alunos da graduação da Faculdade de Medicina da UFRGS, Lais Pilau de Abreu, Gabriela Pilau de Abreu, Carla Blom, Leonardo Costa e Pedro Piccinini que foram indispensáveis e incansáveis na exposição dos animais à fumaça dos cigarros e na aplicação subcutânea da nicotina, além da preparação pré-operatória dos animais. Desejo que este trabalho sirva como estímulo para que continuem a desbravar os caminhos da ciência.

Agradeço ao Prof. Dr. Jorge Luiz Antoniazzi, chefe do Serviço de Cirurgia Geral do HCPA, pela liderança e organização e à sua secretária a Srta. Gislaíne Fraga, amiga e merecedora de todos os elogios pela sua excelente qualificação.

Ao querido Prof. Dr. Santo Pascoal Vitola pelo contagiante entusiasmo com que transmite seus diários ensinamentos ao nosso grupo de trabalho.

Aos especiais colegas cirurgiões, amigos e eternos instrutores Prof. Dr. Jarcedy Alves Machado, Prof. Dr. Leandro Totti Cavazzola, Dra. Christina Duarte, Prof. Dr. Antonio Nocchi Kalil, Dra. Maira Caleffi, Dr. Ignácio Mallmann, Dra. Lídia Marques Silveira, Dr. José Ricardo Guimarães, Dr. Raul Pruinelli, Dr. André Rosa, Dr. Carlos Cauduro Shirmer, Dr. Richard Gurski, Dra. Maria Lúcia Zanotelli, Prof. Dr. Alceu Migliavaca, Prof. Dr. Guido Cantisani, Prof. Dr. Luis Amaral, Dr. Artur Seabra, Dr. Luiz Foergens, Dr. Mauro Sielbert Jr, Dr. Rodrigo Cericatto, Dra. Roberta Rigo Dalcin, Dr. Ian Liepnitz, Dr. Vinícius Von Diemen, Dra. Taismar Oliveira, Dr. Nicolino Rosito, além das minhas adoráveis anestesistas Dra. Lúcia Pizzato, Dra. Lyryst Helena Schönnel e Dra. Ivone Chiao. O convívio com colegas tão qualificados e com princípios éticos consolidados permite que cada momento compartilhado seja um propagador de novos conhecimentos e de novas certezas.

Finalmente não poderia deixar de agradecer aos queridos e talentosos residentes do Serviço de Cirurgia do Aparelho Digestivo do HCPA que me acompanham há alguns anos Dr. Guilherme Pretto, Dr. Maurício Zulian e Dr. Diego Mossmann. Sua evolução diária é um orgulho para mim e representa que nossa troca de experiências tem sido muito válida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da progressão histológica e molecular do tecido pancreático normal até o adenocarcinoma.....	36
Figura 2. Representação esquemática do grupo <i>Sham</i>	48
Figura 3. Representação esquemática do grupo DMBA-fumaça	48
Figura 4. Representação esquemática do grupo DMBA-nicotina	48
Figura 5. Aparelho injetor de DMBA	50
Figura 6. Preenchimento do aparelho injetor de DMBA.....	51
Figura 7. Fumódromo - vista externa	54
Figura 8. Fumódromo - vista interna	55
Figura 9. Técnica cirúrgica. Laparotomia	58
Figura 10. Técnica cirúrgica. Exposição do duodeno	58
Figura 11. Técnica cirúrgica. Confecção da bolsa pancreática	59
Figura 12. Técnica cirúrgica. Aplicação do DMBA na bolsa pancreática	59
Figura 13. Técnica cirúrgica. Bolsa Pancreática com DMBA vista anterior	60
Figura 14. Técnica cirúrgica. Bolsa Pancreática com DMBA vista posterior	60
Figura 15. Necropsia – incisão tóraco-abdominal.....	62
Figura 16. Desenho representativo da histologia do ducto pancreático normal.....	63
Figura 17. Desenho representativo da histologia do NIPan 1a	64
Figura 18. Desenho representativo da histologia do NIPan 1b	64
Figura 19. Desenho representativo da histologia do NIPan 2	65

Figura 20. Desenho representativo da histologia do NIPan 3	66
Figura 21. Desenho representativo da histologia do carcinoma pancreático invasor..	67
Figura 22. Escores utilizados nos diagnósticos histológicos do gráfico 1.....	69
Figura 23. Histologia em HE. Pâncreas normal em camundongo.....	73
Figura 24. Histologia em HE. Hiperplasia ductal reacional no tecido pancreático em camundongo.....	73
Figura 25. Histologia em HE. NIPan 1a em camundongos.....	74
Figura 26. Histologia em HE. NIPan 1b em camundongos.....	74
Figura 27. Histologia em HE. NIPan 2 em camundongos	75
Figura 28. Histologia em HE. NIPan 3 em camundongos.....	75
Figura 29. Histologia em HE. Adenocarcinoma pancreático em camundongos.....	75
Figura 30. Histologia em HE. Complexos tubulares no tecido pancreático em camundongo.....	76
Figura 31. Histologia em HE. Bolsa pancreática com cristais de DMBA em camundongo.....	76
Figura 32. Histologia em HE. Alterações inflamatórias crônicas em camundongo do Grupo DMBA-fumaça.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Doses da nicotina.....	52
Tabela 2. Ocorrência dos diagnósticos histológicos de maior gravidade em cada grupo experimental.....	79
Tabela 3. Frequência das lesões de maior grau entre as neoplasias intra-epiteliais em cada grupo experimental	79
Tabela 4. Ocorrência absoluta de todos os graus de neoplasia intra-epitelial nos grupos experimentais.....	80
Tabela 5. Diferença entre os escores das medianas das lesões de maior grau dos grupos estudados	82
Tabela 6. Causas de morte pré-operatória	83
Tabela 7. Causas de morte pós-operatória	84

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Valores máximos e mínimos da Mediana dos diagnósticos histológicos em cada grupo experimental classificados por seqüência de escores	81
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BRCA2 - *Breast Cancer 2 gene*

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DMBA - 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno ou 7,12-dimetilbenzantraceno

DPC4 - *Deleted in Pancreatic Cancer Locus 4*

DPEA - Divisão de Produção e Experimentação Animal

EUA - Estados Unidos da América

FEEPS - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

FIPE - Fundo de Incentivo a Pesquisas

HER-2 / neu - *Human-epidermal-growth-factor receptor 2*

HE - Hematoxilina e eosina

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

IHPBA - International Hepato Pancreato Biliary Association

K-ras - *Kirsten Ras gene*

MUC - Mucina intra-epitelial

NIPan - Neoplasia intra-epitelial pancreática

PanIN - *Pancreatic Intraepithelial neoplasm*

SEA - Seção de Experimentação Animal

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	X.
LISTA DE FIGURAS.....	XV
LISTA DE TABELAS.....	XVII
LISTA DE GRÁFICOS.....	XVIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIX
SUMÁRIO.....	XX
RESUMO	XXII
ABSTRACT.....	XXIII
INTRODUÇÃO.....	24
OBJETIVO.....	40
MATERIAIS E MÉTODOS	42
METODOLOGIA	43
Delineamento	43
Revisão da literatura	43
POPULAÇÃO ESTUDADA.....	43
ALOCAÇÃO EM GRUPOS.....	44
DETALHAMENTO DOS GRUPOS	46
Grupo <i>Sham</i>	46
Grupo DMBA-fumaça	46
Grupo DMBA-nicotina.....	47

Grupo DMBA-exclusivo.....	47
PROCOLO DE EXPOSICÃO.....	48
MODELO EXPERIMENTAL	49
Alojamento.....	49
Preparo da substância indutora e dos agentes promotores.....	50
Preparação do DMBA.....	50
Preparação da nicotina injetável.....	51
Módulo para inalação da fumaça de cigarros.....	52
Técnica anestésica	55
Técnica cirúrgica	56
Morte dos animais	61
Preparação do Material para análise histológica	61
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	62
ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
ÉTICA	69
ATIVIDADES DOS ALUNOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA	69
RESULTADOS.....	71
DISCUSSÃO.....	85
CONCLUSÕES	105
PERSPECTIVAS.....	107
REFERÊNCIAS.....	109

RESUMO

INTRODUÇÃO: O adenocarcinoma de pâncreas é uma doença com prognóstico reservado e tem como um dos fatores de risco mais importantes o tabagismo. Dentre os componentes do cigarro a nicotina é o que apresenta maior concentração, sendo considerada a principal substância envolvida na carcinogênese pancreática. Visando o diagnóstico precoce e buscando novos tratamentos, os modelos experimentais se tornam úteis, à medida que possibilitam a compreensão do comportamento biológico tumoral e dos fatores indutores e promotores da doença. Para o desenvolvimento experimental do câncer de pâncreas em ratos e camundongos, o 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) é um dos indutores químicos mais utilizados. **OBJETIVO:** Avaliar o efeito da nicotina injetável e da fumaça do cigarro sobre o pâncreas de camundongos submetidos à carcinogênese pelo DMBA, aplicando, para os achados histológicos, a nova classificação das neoplasias intra-epiteliais pancreáticas (NIPan) proposta em 2001 por Hruban e colaboradores. **MATERIAIS e MÉTODOS:** 114 camundongos machos foram alocados em 3 grupos. O grupo denominado DMBA-n recebeu 2mg/kg/dose de nicotina ([3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)pyridine]) subcutânea durante 45 dias. Após o décimo quinto dia de nicotina, foi operado sendo implantado 1 mg de cristais de DMBA na cabeça pancreática, mediante sutura em bolsa. O grupo DMBA-f foi exposto à fumaça de cigarro na concentração de 100mg/m³ de nicotina também por 45 dias, e submetido à cirurgia com o implante de DMBA em seu pâncreas no 16° dia. O grupo denominado Sham, considerado como controle da cirurgia, permaneceu no alojamento pelo mesmo período de tempo e no 16° dia foi operado sendo confeccionada a bolsa sem o implante de DMBA. Este grupo não foi exposto à fumaça e não recebeu a nicotina. Transcorridos 30 dias de pós-operatório, todos os animais foram mortos e seus pâncreas foram preparados para avaliação histológica através da coloração com hematoxilina e eosina. Dois patologistas e dois dos autores procederam a avaliação histológica. Os diagnósticos considerados foram: pâncreas normal, hiperplasia reacional, NIPan 1a, NIPan 1b, NIPan 2, NIPan 3 e carcinoma. Os resultados foram comparados a um quarto grupo de camundongos (controle histórico) designado com DMBA-exclusivo, para fins de análise estatística. **RESULTADOS:** A comparação entre os quatro grupos demonstrou que a frequência geral de NIPan foi praticamente a mesma entre todos os animais expostos ao DMBA, sendo de 16 (66,7%) no DMBA-exclusivo, 20 (66,7%) no DMBA-f e 12 (44,4 %) no DMBA-n, quando consideradas as lesões de maior gravidade. O grupo Sham não apresentou NIPan. A frequência do adenocarcinoma pancreático, entretanto foi maior no grupo DMBA-n (14 ou 51,9%) do que no DMBA-exclusivo (4 ou 16,7%) e no DMBA-f (4 ou 13,3%). Igualmente o grupo Sham não apresentou carcinoma. A diferença entre os grupos apresentou significância estatística ($p = 0,05$ – teste Exato de Fisher). **CONCLUSÃO:** A nicotina, associada ao modelo experimental de carcinogênese pancreática induzida pelo DMBA em camundongos, promove o desenvolvimento do adenocarcinoma pancreático invasor, semelhante ao humano. A exposição à fumaça não atuou como promotora do adenocarcinoma pancreático invasivo, mas proporcionou o maior aparecimento de NIPan 3 ou carcinoma “*in situ*” quando comparado com o grupo DMBA-exclusivo.

ABSTRACT

BACKGROUND: Pancreatic adenocarcinoma has a bad prognosis. There are some risk factors involved in this disease, but cigarette smoking and the nicotine, which is the greatest element in the cigarette, are the most important ones. Experimental models can provide us the study of new technology in early diagnosis and treatment, improving this situation. Besides this, can give us the comprehension of the tumoral biological behavior and its relationship with inductors and promoters elements. The 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) is one of the best chemical agent applied to induce pancreatic cancer in rats and mice

OBJECTIVE: To evaluate the effects of the nicotine and the effects of cigarette smoke exposure in mice with pancreatic DMBA implantation for carcinogenesis using Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) classification system described by Hruban in 2001.

MATERIALS AND METHODS: 114 male mice were divided in 3 groups. To the DMBA-n group were given subcutaneous 2 mg/kg/dose nicotine ([3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)pyridine]) 2 times daily for 45 days. During this period and at the day 16, all the animals were operated and received 1mg of DMBA crystals in their pancreatic head in a purse-string suture. The DMBA-f group was exposed to 100mg/m³ of nicotine cigarette smoke 3 times a day also for 45 days and was operated at the sixteen day like the DMBA-n group. The Sham group (surgery control group) did not received nicotine nor was exposed to cigarette smoke, but was also operated at the sixteen day of the reclusion with a purse-string suture in pancreatic head without the DMBA crystals. Euthanasia for all was performed after 30 days of the surgery. The entire pancreas was removed during the necropsy, and than prepared and stained with hematoxylin and eosin to the histological examination. The specimens were evaluated by two pathologists and two of the authors, using the following criteria: normal ducts, reactive hyperplasia, PanIN 1A, PanIN 1B, PanIN 2, PanIN 3 and carcinoma. To complete the statistical analysis, another group was associated to the study called the DMBA-exclusive group (historical control group).

RESULTS: The frequency of the PanIN in the 3 groups exposed to the DMBA was almost the same, when is considered the higher grade lesion (DMBA-exclusive= 16 or 66,7 %, DMBA-f=20 or 66,7% and DMBA-n= 12 or 44,4 %). Any PanIN was seen in the Sham group. The frequency of pancreatic adenocarcinoma was higher in the DMBA-n group (14 or 51,9%) than in the DMBA-exclusive (4 or 16,7%) and DMBA-f (4 or 13,3%). The Sham group did not shown carcinoma. The differences among groups were statistically significant (p = 0,05 – Fisher Test).

CONCLUSIONS: The association of the nicotine to the experimental model of pancreatic carcinogenesis induced by the DMBA in mice promotes the development of the same type of the human pancreatic adenocarcinoma. The cigarette smoke exposure in this study did not contribute to the cancer formation, but the development of the PanIN 3 in this group is higher than in the DMBA-exclusive group.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma pancreático, que representa a maior parte das neoplasias malignas do pâncreas, continua sendo uma das cinco mais freqüentes causas de morte por neoplasia do aparelho digestivo em vários países (1-5).

Na Austrália e nos Estados Unidos da América (EUA), a incidência anual do adenocarcinoma pancreático é de 10 casos novos para cada 100.000 habitantes, sendo que nos EUA a mortalidade gira em torno de 30.000 casos por ano (1-3).

De forma semelhante, ocorrem anualmente na Europa, entre 8 a 10 casos do adenocarcinoma de pâncreas por 100.000 habitantes, com conseqüentes 40.000 mortes neste período (3). Somente na Inglaterra, durante a década de 90, a freqüência da neoplasia no sexo masculino foi de 13 em 100.000 habitantes e de 7,7 no sexo feminino. A taxa de sobrevivência em cinco anos, para todos os casos diagnosticados naquele período, foi a mesma para ambos os sexos: apenas 3% (4). Já na França, são registradas a cada ano aproximadamente 6 mil mortes pelo adenocarcinoma pancreático (5).

No Brasil, esta neoplasia alcançou uma incidência 2,6 por 100.000 habitantes no ano de 2000 (6). É considerada a décima causa de morte entre todas as neoplasias malignas, representando 4% das mortes por câncer. No período compreendido entre os anos de 1993 e 2003, morreram 134 mil e 691 pessoas em consequência deste tumor (6).

Entre os Estados brasileiros, o Rio Grande do Sul ocupa o primeiro lugar em incidência do adenocarcinoma pancreático. Anualmente, ao redor de 6 novos casos da doença são diagnosticados em cada 100.000 habitantes. Entre os anos de 1993 e 2003, foram registrados 13.769 óbitos nessa região pela neoplasia, sendo esta a segunda causa de morte entre as neoplasias mais freqüentes (6).

Apesar dos avanços tecnológicos visando diagnóstico precoce e tratamento curativo, nenhum procedimento tem se mostrado efetivo (7). Entre todos os pacientes com suspeita de adenocarcinoma pancreático, 15 a 20% correspondem aos pacientes potencialmente curáveis através da ressecção cirúrgica. Os demais pacientes geralmente já apresentam tumores em estadio avançado no momento da investigação diagnóstica, e quase nenhum destes permanecerá vivo após cinco anos do diagnóstico (1,7,8).

A cirurgia de ressecção nos estadios iniciais continua a ser a única opção terapêutica que determina isoladamente um aumento da sobrevida global dos

pacientes tratados. Aproximadamente 35% dos casos são considerados "livres de doença" nos 5 anos subseqüentes ao tratamento cirúrgico (9,10).

A quimioterapia e a radioterapia, mesmo quando combinadas, não alteram a sobrevida dos pacientes nos casos de neoplasia de pâncreas em estadios iniciais, ou seja, aqueles com um melhor prognóstico (10). Neoptolemos e colaboradores realizaram um dos maiores ensaios clínicos randomizados conhecido como ESPAC-1 (*European Study Group for Pancreatic Câncer*). A quimioterapia e a radioterapia adjuvantes foram avaliadas sem terem demonstrado, no entanto, um aumento global na sobrevida dos pacientes pesquisados. Houve uma melhora na qualidade de vida daqueles que receberam a associação de 5-Fluoracil e Ácido folínico, inclusive com aumento da sobrevida em alguns casos isolados. Os autores concluíram que existe uma tendência de incremento na sobrevida com a melhora na qualidade de vida de um determinado grupo de pacientes tratados com quimioterapia adjuvante à cirurgia, porém os dados não podem ser extrapolados para a população geral (11,12).

O ESPAC-3 é um estudo em andamento, ainda sem resultados disponíveis que busca avaliar o papel da Gemcitabina como fármaco adjuvante ao tratamento cirúrgico para os pacientes com o adenocarcinoma pancreático em estadio inicial. Conforme demonstrado em uma metanálise recentemente publicada, este fármaco melhora a qualidade de vida dos pacientes com doença localmente avançada ou metastática (13).

Outra possibilidade de controle do adenocarcinoma de pâncreas é através de sua prevenção. Para tanto, devem ser reconhecidos seus fatores de risco e com isso identificar as medidas que possam proporcionar uma diminuição nas chances de desenvolvimento desta neoplasia (1,7,8,14).

O sexo masculino, a idade avançada e a raça negra, além de algumas doenças hereditárias como a polipose e o câncer de mama familiares entre outras, aumentam o risco do adenocarcinoma de pâncreas. O tabagismo é a única condição externa controlável que está relacionado com este aumento. Já a obesidade, o diabetes mérito, a pancreatite crônica, o consumo de álcool, de cafeína, a exposição ocupacional e algumas cirurgias gastrintestinais têm sido associadas ao aumento da frequência da neoplasia, mas ainda com informações conflitantes (1,14-16).

Desta maneira, incentivar a interrupção do fumo é uma das grandes providencias a serem tomadas, principalmente porque o tabagismo é mundialmente permitido, e muitas vezes, até estimulado (14-16).

O hábito de fumar cigarros é apontado como o responsável por mais de 30% das mortes por neoplasias nos EUA nas últimas décadas, e também por 30% dos adenocarcinomas pancreáticos (5,17-20). Estudos prospectivos demonstraram um aumento de 2 a 3 vezes no risco de desenvolvimento desta neoplasia, mesmo após

ter-se parado de fumar (16). Tal risco parece continuar existindo por um período de até 15 anos após a suspensão do fumo e está relacionado ao número de cigarros consumidos e aos anos que se fumou. O consumo de no mínimo 30 cigarros por dia está associado a este risco (5,16,18,19). Em 1996, um estudo multicêntrico coordenado por Boyle avaliou a exposição a cigarros nos pacientes com diagnóstico de câncer de pâncreas: o risco de desenvolver o adenocarcinoma pancreático pode ser reduzido se os pacientes pararem de fumar (18). Chiu e colaboradores, em 2001, publicaram os resultados da análise de um grande estudo de caso-controle de base populacional no Estado de Iowa nos EUA com aproximadamente 6 mil participantes. Mais de 3 mil pessoas com idades entre 40 e 65 anos que possuíam o diagnóstico de neoplasia de pâncreas, bexiga, rim ou cólon foram avaliadas quanto seus hábitos, incluindo o hábito de fumar. Os controles, que envolvia um grupo de mais de 2000 pessoas sem diagnóstico de neoplasia, igualmente tiveram seus hábitos diários pesquisados. Trezentos e setenta e seis portadores do adenocarcinoma de pâncreas foram acompanhados por 3 anos. O hábito de fumar cigarros esteve presente em mais de 96% dos pacientes com neoplasia pancreática. O risco relativo de tal exposição variou de 1,5 a 2,5 no grupo dos fumantes em relação aos não fumantes (19).

Além disso, os efeitos deletérios do cigarro sobre o organismo humano podem também atingir aqueles que não fumam em decorrência da inalação direta da

fumaça, uma vez que já foram isolados 43 carcinógenos desta fumaça. Os danos desta aspiração têm um risco maior de acontecer naqueles indivíduos considerados fumantes passivos, ou seja, pessoas habitualmente expostas à fumaça do cigarro porque mantêm um convívio próximo a fumantes ou porque freqüentam com regularidade ambientes fechados onde é permitido que se fume (14-17). Gallichio e seus colaboradores acompanharam duas coortes, onde foram avaliados os efeitos da fumaça de cigarro nos fumantes passivos no decorrer de 15 anos, mas os resultados não permitiram concluir tal associação (20).

Dentre os inúmeros componentes do cigarro, a nicotina é o elemento que apresenta maior concentração e que está mais relacionado ao fato dos usuários se tornarem aditos ao fumo (5). A nicotina e seus derivados parecem ser os responsáveis diretos pela ação carcinogênica do cigarro em vários sistemas do corpo humano, sendo que muitos autores afirmam que ela é a principal substância envolvida na carcinogênese do adenocarcinoma pancreático, embasados por evidências epidemiológicas e experimentais (5,22,23).

A cotinina e nornicotina são os metabólitos da nicotina mais conhecidos e apresentam um poder altamente carcinogênico (5,17,22). No pâncreas, o mecanismo pelo qual existe a indução da neoplasia parece ocorrer por três vias distintas que envolvem: a ativação da membrana celular via canais de cálcio,

provocando citotoxicidade e conseqüente morte celular, via obstrução à saída da amilase celular estimulando a autodigestão da célula e através da ativação do gene *Kirsten-ras (K-ras)*, entre outras teorias (17). Por sua vez, o próprio metabolismo destes dois componentes pode resultar na ativação das N-nitrosaminas, que são compostos derivados do cigarro com potente poder carcinogênico sobre o pâncreas (17,21).

Em 1998, foi publicada uma extensa revisão das características bioquímicas, biológicas e carcinogénica das nitrosaminas específicas do tabaco mais comumente associadas às neoplasias em animais. Entre estas, destacam-se os efeitos da nitrosamina 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, também conhecida com NNK, e da 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol ou NNAL. Esta última, contudo, apresenta uma atividade carcinogénica superior ao da NNK em relação a formação de tumores no tecido pancreático de ratos (23).

Recentemente o papel da NNK sobre a proliferação celular em cultura de células ductais pancreáticas neoplásicas humanas foi avaliado em dois trabalhos por Askari e colaboradores (24,25). O primeiro, publicado em 2005 demonstrou que a NNK se liga aos receptores β -adrenérgicos e desencadeia o processo de proliferação celular (24). O segundo, publicado em junho de 2006, demonstrou um

efeito cumulativo do álcool com a NNK também sobre a proliferação destas células neoplásicas, sugerindo que a rota de ativação de tal proliferação fosse através da transdução da membrana celular (25). Mesmo assim, a idéia real de quais as rotas e de como elas estão envolvidas nesse desenvolvimento celular ainda necessita de definições mais concretas.

Apesar de serem reconhecidos, controlados ou afastados os fatores de risco para o desenvolvimento do adenocarcinoma pancreático, esse conjunto de ações é insuficiente para uma doença tão incidente, de diagnóstico tardio, com tratamento insatisfatório, para a maior parte dos casos, e com conseqüente sobrevida pequena (26). É uma doença que ainda reserva um péssimo prognóstico. O diagnóstico precoce através de novos métodos é de fundamental importância. As pesquisas clínicas, entretanto, pouco têm avançado neste sentido (26,27).

A compreensão da biologia molecular e da carcinogênese tumoral no adenocarcinoma pancreático, por outro lado, abre perspectivas na busca de um tratamento mais eficiente e talvez venha a auxiliar na detecção de casos iniciais (2,26-28).

Alvo de pesquisas recentes, alguns receptores de tirosinoquinases, que são estruturas encontradas nas membranas celulares e que possuem a função de

regular o desenvolvimento celular, tem sido apontados como facilitadores do desencadeamento de uma reprodução celular descontrolada, quando desajustados, o que caracteriza a neoplasia (29). Utilizando-se como base a imunologia tumoral, substâncias que bloqueiam tais estruturas, estão sendo usadas com boa resposta, diminuindo, ou até mesmo cessando o crescimento de alguns tumores (30). Infelizmente os resultados voltados especificamente ao adenocarcinoma pancreático não revelaram tais estruturas como as únicas responsáveis pelo crescimento tumoral, nem tampouco sensíveis aos imunorreguladores neste tipo de tumor (31).

Estima-se que somente 10% das neoplasias de pâncreas sejam familiares, ligadas a síndromes hereditárias bem estabelecidas e com genes conhecidos, como no caso dos portadores das mutações no gene *Breast Cancer 2 (BRCA2)*. Os demais casos, aparentemente sem nenhuma correlação hereditária, representam a maioria (1,32).

Dominantemente, os tumores considerados "esporádicos" carregam alterações genéticas ditas próprias, ou fenotípicas, do adenocarcinoma pancreático. Modificações na carga genética que provocam uma atividade descontrolada do oncogene *K-ras* ou falhas no desempenho de alguns genes supressores como o *p16* e o *p53*, estão implicadas no desenvolvimento desta neoplasia. A expressão de certas proteínas, como as mucinas intra-epiteliais 1 e 5 (*MUC-1* e *MUC-5*), a *Human-epidermal-growth-factor receptor 2 (HER-2/neu)* e a *Deleted in Pancreatic Cancer*

Locus 4 (DPC4) em suas membranas citoplasmáticas ou em seus núcleos, igualmente reflete o desarranjo genético vigente (32-33).

O oncogene *K-ras* é mediador do crescimento, multiplicação e apoptose celular, sendo que em aproximadamente 90% dos adenocarcinomas de pâncreas está mutado, com a alteração mais freqüentemente localizada no códon 12 (32-37).

Os genes supressores *p16* e *p53* possuem funções semelhantes no bloqueio do ciclo celular normal e na indução da morte celular programada. Tais atividades encontram-se desajustadas em até 95% e 75% dos casos do adenocarcinoma pancreático em relação à mutação no *p16* e no *p53*, respectivamente (32-37).

Apesar da expressão genética os caracterizarem de forma molecular como adenocarcinoma pancreático, seu comportamento biológico (crescimento e agressividade), no entanto, ainda não possui uma nítida ligação com uma ou outra alteração genética específica. O que se sabe, é que durante a transformação tumoral (carcinogênese) e, dependendo da fase em que a lesão se encontra, alguns destes genes possuem implicação direta, e algumas destas proteínas estão ou deixam de estar expressas nas células tumorais (36,37).

No ano de 2000, Hruban e colaboradores propuseram uma classificação para as alterações intra-epiteliais encontradas em células ductais pancreáticas displásicas na periferia de tumores invasivos (34,35,38). À exemplo da progressão adenoma-adenocarcinoma que ocorre na neoplasia intra-epitelial do colo uterino (NIC), do intestino grosso e da próstata (NIP), foi criada a denominação Neoplasia Intra-epitelial Pancreática (NIPan), originalmente conhecida em inglês como *Pancreatic Intraepithelial Neoplasm (PanIN)*. Tal classificação refere-se a graus crescentes de gravidade da displasia, englobando alterações mínimas, intermediárias e graves, até a invasão da membrana basal e com isso obtendo-se a confirmação do diagnóstico de adenocarcinoma ductal invasor. Junto a esta classificação histopatológica, os autores associaram a análise molecular de cada fase da progressão das lesões, e verificaram que cada uma delas é acompanhada de alterações genéticas próprias bem definidas (30-36).

A figura 1 é representativa das alterações histológicas intra-epiteliais e das alterações genéticas e proteicas correspondentes (39). Os genes alterados e algumas proteínas foram comentados anteriormente. O encurtamento dos telômeros propicia a perda da estabilidade de alguns cromossomas, e pode estar presente nas lesões intra-epiteliais iniciais. A *ciclina D1* é uma proteína envolvida na replicação celular com mecanismo de ação dependente do *p16*. O aumento de sua expressão provoca uma reprodução celular descontrolada (33-37,39).

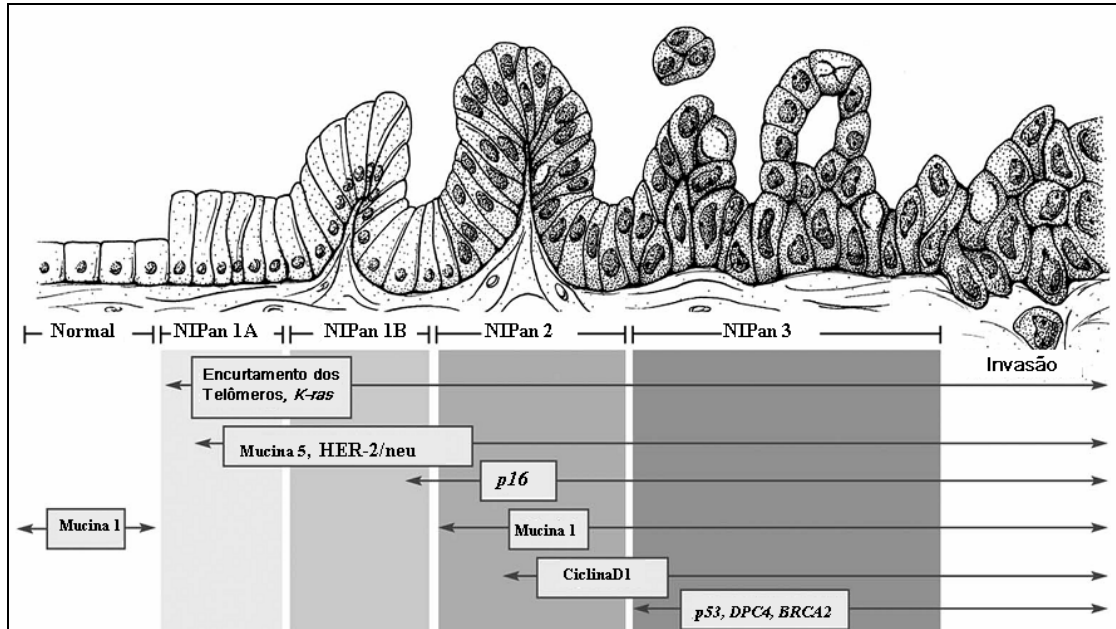


Figura 1. Representação esquemática das alterações histológicas encontradas na progressão do tecido pancreático ductal normal ao adenocarcinoma pancreático com as alterações genéticas correspondentes. Adaptado de Maitra A, et al (39).

As informações fornecidas pelos trabalhos previamente citados sobre a progressão das lesões ductais pancreáticas descrevem as frequências populacionais das manifestações histopatológicas, morfológicas e moleculares nos grupos abordados e assim abastecem o conhecimento científico e proporcionam a base para a investigação experimental (33-39). Esta, por sua vez, representa uma excelente estratégia para o entendimento da gênese das neoplasias nas mais diversas situações provocadas (40).

As pesquisas em modelos experimentais de carcinogênese, onde se pode estudar a patogênese tumoral, parecem ser uma alternativa rápida, econômica e passível de reprodução dos eventos que ocorrem na carcinogênese humana, e por isso, tornaram-se o foco em muitos centros de pesquisa (40).

Para o câncer de pâncreas do tipo ductal, um dos modelos experimentais mais estudados é o que utiliza o 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) no pâncreas de ratos como indutor químico da neoplasia e que foi desenvolvido por Dissin e Rivera (41,42). Tal modelo consiste na implantação do carcinógeno no pâncreas do animal, o que produz um adenocarcinoma semelhante ao humano, inclusive com avaliação imunohistoquímica compatível (43). Zehnder e colaboradores adaptaram este modelo utilizando o camundongo como animal de experimentação, mas este trabalho consta apenas nos anais do congresso do *International Hepato Pancreato Biliary Association* sob a forma de resumo (44).

Muito recentemente, esta autora integrou o grupo de pesquisadores liderados por Osvaldt onde foi reproduzido o modelo experimental de carcinogênese pancreática em camundongos utilizando o DMBA como indutor de neoplasia, visando principalmente diminuir o tempo necessário para desenvolver a neoplasia e o custo em relação ao modelo com ratos. A indução geral de neoplasia (lesões intra-epiteliais e invasora) foi de 83,3% no grupo de animais sacrificados em 30 dias após

a implantação da substância e de 72,9% no grupo de animais sacrificados após 60 dias. O segundo grupo apresentou um número maior de carcinoma (37,8%) do que o primeiro (16,7%). A conclusão do estudo foi de que este modelo é eficaz para o estudo do adenocarcinoma pancreático do tipo ductal em animais de laboratório (45).

Concomitante ao trabalho mencionado, os mesmos autores, desta vez, coordenados por Wendt, avaliaram o efeito da cafeína e do álcool na promoção das neoplasias intra-epiteliais e do adenocarcinoma pancreático utilizando o mesmo modelo de indução tumoral. Após terem sido operados com implante de DMBA em seus pâncreas, os animais foram divididos em três grupos e receberam uma solução de água com álcool ou água com cafeína ou água com álcool e cafeína, à vontade, durante 30 dias. A avaliação histopatológica dos pâncreas dos animais revelou adenocarcinoma invasor em 52,9% dos animais que receberam água e álcool, 15% naqueles com água e cafeína e 23,8% nos do grupo água, álcool e cafeína. Tais resultados demonstraram uma associação positiva entre o câncer de pâncreas e o consumo de álcool neste modelo experimental e uma possível ação protetora da cafeína (46).

Embora conhecidos os efeitos da nicotina sobre o pâncreas, os autores do presente estudo decidiram avaliar seu efeito quando inoculada em camundongos submetidos à indução de neoplasia pancreática pelo DMBA, aplicando a classificação e nomenclatura das lesões precursoras do adenocarcinoma descritas

em 2001 por Hruban e colaboradores (36). Também foram avaliadas as lesões induzidas pela inalação de fumaça do cigarro em camundongos igualmente induzidos com DMBA, tentando reproduzir a situação de um fumante passivo. Desta maneira, tentou-se criar um modelo de neoplasia pancreática com dois estágios (indução e promoção) em camundongos expostos a um dos fatores de risco ambiental mais reconhecidamente implicado, através de um trabalho original.

OBJETIVO

OBJETIVO

Estudar as lesões precursoras e o adenocarcinoma pancreático promovidos pela nicotina e pela fumaça do cigarro em modelo experimental de indução da carcinogênese pelo DMBA em camundongos, aplicando a nova classificação de neoplasia intra-epitelial do pâncreas (NIPan).

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

METODOLOGIA

Delineamento

Estudo Experimental

Revisão da literatura

A revisão da literatura foi realizada através da consulta on-line do *PubMed* e do *Lillacs* com o último acesso realizado em junho de 2006. Os unitermos utilizados foram: *pancreatic cancer, DMBA, experimental studies, rat, mice, pancreatic intraepithelial neoplasia, nicotine and cigarette smoke*.

POPULAÇÃO ESTUDADA

Cento e quatorze camundongos do tipo *Mus musculus*, linhagem CF1, machos, adultos, com mais de 60 dias de vida, pesando entre 20 e 40 gramas e provenientes do biotério da Seção de Experimentação Animal (SEA), da Divisão de Produção e Experimentação Animal (DPEA) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEEPS), foram incluídos no estudo.

Três grupos experimentais foram criados. O número final de camundongos necessários para cada um dos grupos foi calculado no início do estudo através do cálculo do tamanho da amostra. Desta forma, foram estipulados 30 animais para cada um dos dois grupos expostos ao carcinógeno, com base na prevalência de 83,3% de neoplasia de pâncreas desenvolvida no modelo experimental de camundongos submetidos a carcinogênese pelo DMBA descrito por Osvaldt e colaboradores (45). Para o grupo controle, ou *Sham*, um total de 10 animais seria o suficiente. Caso houvesse perdas de animais no decorrer do estudo, novos animais seriam incluídos para completar o número final estipulado para cada grupo. O poder estatístico adotado neste cálculo foi de 80% ($\beta = 0,2$) e o nível de significância, de 95% ($\alpha = 0,05$).

ALOCAÇÃO EM GRUPOS

Os animais foram alocados em 3 grupos aleatoriamente. Dois grupos receberam o DMBA para indução da neoplasia através de procedimento cirúrgico com confecção de bolsa na cabeça pancreática, além de um dos fatores promotores em estudo. O terceiro grupo foi submetido apenas ao procedimento cirúrgico de confecção da bolsa pancreática sem receber o indutor ou tampouco, um dos promotores. Tais animais foram indicados como grupo *Sham*.

Dos grupos que receberam o DMBA através da cirurgia, o grupo denominado *DMBA-fumaça (DMBA-f)* foi exposto à fumaça de cigarro, e o *DMBA-nicotina (DMBA-n)* recebeu nicotina por via injetável no subcutâneo.

Além dos três grupos descritos, foram associados a este estudo, para fins de análise posterior, os dados obtidos através da avaliação de um outro grupo onde os animais foram submetidos apenas ao procedimento cirúrgico padrão com implante de DMBA através de sutura em bolsa na cabeça pancreática. Tais resultados foram descritos por Osvaldt e colaboradores em seu trabalho onde o modelo experimental de carcinogênese pancreática em camundongos com aplicação de DMBA foi criado (45). No presente estudo, que é uma continuidade do estudo prévio, e que segue a mesma linha de pesquisa, este grupo será designado como DMBA-exclusivo, representando o Controle Histórico do trabalho.

Os grupos foram determinados desta forma:

Grupo Sham : Cirurgia com bolsa pancreática sem DMBA

Grupo DMBA-exclusivo : Cirurgia com bolsa pancreática com DMBA

Grupo DMBA- fumaça: Cirurgia com bolsa pancreática com DMBA
e fumaça de cigarro

Grupo DMBA-nicotina: Cirurgia com bolsa pancreática com DMBA
e nicotina subcutânea

DETALHAMENTO DOS GRUPOS

Grupo Sham

Dez animais foram designados a este grupo que foi confeccionado para o controle da cirurgia. Como todos os outros camundongos do experimento, esses também passaram por um período de sete dias de isolamento prévio. Dezesesseis dias após o término do isolamento, até então sem sofrerem nenhuma intervenção, foram submetidos ao procedimento cirúrgico. A cirurgia seguiu os passos da técnica descrita a seguir, no entanto os animais não receberam o conteúdo de DMBA em suas bolsas pancreáticas. No trigésimo dia de pós-operatório, os animais foram mortos e submetidos à necrópsia com coleta do material pancreático conforme descrição posterior.

Grupo DMBA-fumaça (DMBA-f)

Após sete dias de isolamento, os cinquenta e três animais que participaram deste grupo foram submetidos à exposição da fumaça de cigarros 3 vezes ao dia, por 20 minutos, durante 15 dias. No décimo sexto dia, foram operados, recebendo a implantação de DMBA em bolsa pancreática. No primeiro pós-operatório, reiniciaram sua exposição à fumaça, também por

3 vezes ao dia, durante 20 minutos, até o trigésimo dia de pós-operatório, quando foram mortos.

Grupo DMBA-nicotina (DMBA-n)

Este grupo envolveu cinquenta e um animais. De forma semelhante aos grupos anteriormente descritos, os camundongos cumpriram um período de sete dias de isolamento, após o qual foram submetidos à injeção subcutânea de nicotina duas vezes ao dia, durante 15 dias. No décimo sexto dia, foram operados com implantação de DMBA na cabeça pancreática, voltando a receber a nicotina injetável no dia seguinte, até completar 30 dias de pós-operatório, quando foi realizada a eutanásia.

Grupo DMBA-exclusivo (DMBA-e ou DMBA) / Controle Histórico

Foram incluídos neste grupo 30 animais que receberam somente o DMBA através da cirurgia preconizada. A eutanásia igualmente aconteceu no trigésimo dia de pós-operatório.

PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO

Os grupos seguiram uma mesma linha de tempo dentro deste estudo. Nas figuras 2,3 e 4, estão demonstrados os desenhos esquemáticos de cada um dos grupos experimentais em relação ao tempo.

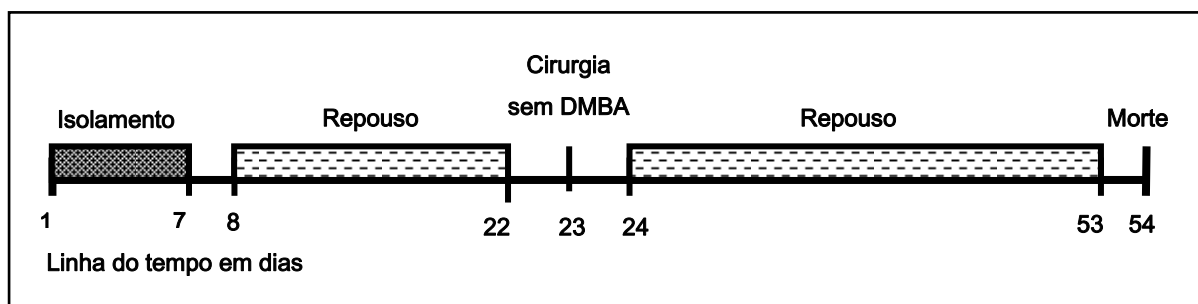


Figura 2. Representação esquemática grupo *Sham* em relação ao tempo do estudo

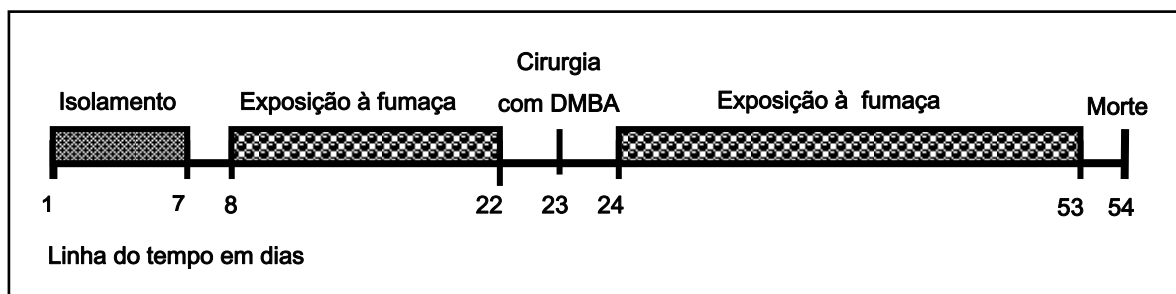


Figura 3. Representação esquemática grupo DMBA-fumaça em relação ao tempo do estudo

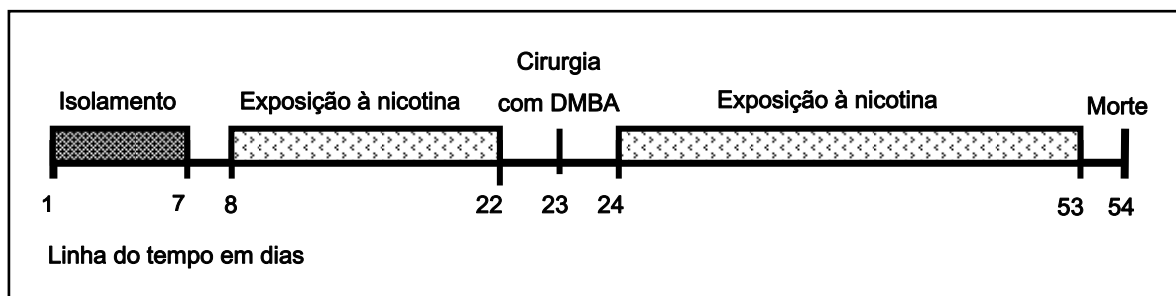


Figura 4. Representação esquemática grupo DMBA-nicotina em relação ao tempo do estudo

MODELO EXPERIMENTAL

Alojamento

O animais foram alojados no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre onde toda a parte experimental do trabalho foi realizada.

Inicialmente, quando os animais chegaram ao Centro de Pesquisa, os mesmos cumpriram um período de 7 dias de isolamento. Somente após este período, foram incluídos no estudo.

As condições locais de alojamento nas estufas, dentro de gaiolas plásticas, envolveram um ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura ambiente entre 18 e 23°C, umidade de 40 e 70%. Os animais foram mantidos em grupos de, no máximo, seis animais por gaiola, recebendo água e ração Nuvital CR® (Registro no Ministério da Agricultura e Reforma Agrária nº 4453-00103) à vontade.

As especificações técnicas para cuidado dos animais seguiram as previstas no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e foram baseadas em diretrizes para utilização de animais envolvidos em experimentos (47,48).

Preparo da Substância Indutora e dos Agentes Promotores

Preparação do DMBA

O DMBA (7,12-Dimetilbenzantraceno, Sigma-Aldrich, Sant-Louis, USA) é apresentado na forma de pó de microcristais. Para sua aplicação no pâncreas, foi necessária a produção de um aparelho injetor a partir de uma cânula de punção venosa (abocath) nº 14, cortada em 2 mm da extremidade metálica e preenchida com cola branca para formação de um êmbolo oclusivo. Este dispositivo foi calibrado de forma a conter exatamente 1 mg de cristais de DMBA no seu interior. Sua confecção foi idêntica a do instrumento desenvolvido por Osvaldt (45). A figura 5 mostra em detalhes tal aparelho, e a figura 6 procura demonstrar como era preenchido o interior da cânula.



Figura 5. Aparelho injetor do DMBA



Figura 6. Preenchimento do aparelho injetor pelos cristais de DMBA

Preparação da Nicotina Injetável

A nicotina escolhida foi a [3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl) pyridine], 98 -100%, isenta de base e líquida (Sigma, código brasileiro N3876). A diluição adotada foi a de 0,04 ml de nicotina em 100 ml de solução fisiológica isotônica. Desta maneira, 1 ml da solução representava 0,4 mg da nicotina.

Utilizando-se uma seringa com capacidade para 1ml, graduada a cada 0,02 ml, administrou-se em cada animal uma dose correspondente a 2 mg/Kg/dose por

via subcutânea na região dorsal, duas vezes ao dia, durante 45 dias. A pesagem dos animais foi efetuada no início de cada semana para o cálculo da dose a ser administrada. Os pesos e as dosagens mais comuns estão descritos a seguir na tabela 1.

Tabela 1. Doses da nicotina e da solução de nicotina para administração por via subcutânea em cada animal conforme seu peso

PESO do animal (g)	DOSE DE NICOTINA	SOLUÇÃO DE NICOTINA	
	2 mg/kg/dose (mg)	4 mg/ml (Dose calculada) (ml)	4 mg/ml (Dose fornecida) (ml)
30	0,06	0,15	0,14
35	0,07	0,175	0,16
40	0,08	0,20	0,20
45	0,09	0,22	0,22

Módulo para inalação da fumaça de cigarros

Foi confeccionada uma caixa de madeira com tampa e volume interno ajustável através de uma placa de isopor. A alteração do tamanho interno da caixa era necessária para promover a melhor disposição do número de gaiolas envolvido em cada exposição. Eventualmente foi preciso modificar este número de gaiolas em função da morte de algum animal com conseqüente inclusão de outro proveniente de

uma ninhada distinta. A caixa também possuía algumas perfurações para permitir uma certa ventilação e foi denominada pelo grupo de autores como “fumódromo”, já que a intenção foi de se reproduzir um ambiente de fumantes.

A concentração média da nicotina na suspensão de fumaça no interior do fumódromo deveria respeitar 100 mg/m³. Para isso, foi calculado em cada exposição, o volume interno da caixa de madeira e o número de cigarros necessários para produção de fumaça com tal concentração.

O cigarro escolhido para o experimento foi o da marca Derby, rótulo vermelho, com 0,8 mg de nicotina por unidade. Usualmente, nove gaiolas eram acomodadas no fumódromo, o que ocupava um volume de 0,24 m³ e gerava a necessidade da queima de 30 cigarros.

Dentro do fumódromo, os animais permaneceram nos mesmos grupos, porém foram trocados de suas gaiolas originais do alojamento para outras gaiolas usadas exclusivamente dentro da caixa de madeira, já que a fumaça do cigarro danifica intensamente o plástico das mesmas, ficando impregnada neste.

Em bases metálicas fenestradas, os cigarros foram unidos em grupos de 8 a 10 unidades e presos uns aos outros através de seu filtro por um fino arame. Os mesmos foram acesos com auxílio de uma lamparina de álcool. Três arranjos de

cigarros foram feitos e distribuídos em formato de triângulo no interior da caixa, com o intuito de proporcionar uma fumaça difundida de maneira homogênea.

Os camundongos foram expostos à fumaça 3 vezes ao dia, durante 20 minutos. Este tempo foi estipulado por ser suficiente para queima completa dos cigarros e para a saída de toda a fumaça do interior da caixa. As figuras 7 e 8 retratam a caixa designada como fumódromo em vistas externa e interna, respectivamente.



Figura 7. Fumódromo fechado. Vista externa



Figura 8. Fumódromo aberto. Vista interna

Técnica Anestésica

Os animais foram anestesiados com uma solução de Quetamina 50 mg/kg juntamente com Xilazina 50 mg/kg por via intraperitoneal. Caso fosse necessário, era administrada uma dose complementar de 0,1 ml, também intraperitoneal, no decorrer da cirurgia. O jejum observado foi de 12 horas (49).

Técnica Cirúrgica

Os animais foram anestesiados e posicionados em placas de cortiça em decúbito dorsal e presos à placa através da fixação de seus membros com fita adesiva, assim que estivessem sem reações motoras e em condições cirúrgicas.

Para o preparo do campo operatório, foi realizada a anti-sepsia com solução aquosa de iodo e tricotomia da parede abdominal desde o apêndice xifóide até a altura das cristas ilíacas

Através de uma incisão longitudinal na linha média do abdome, foi efetuada a laparotomia. Em seguida foram reconhecidos estômago e cólon transverso. Neste ponto, foram separadas as duas estruturas, o que permitiu a visualização do arco duodenal e do mesentério. Muito cuidadosamente foi descolada a parte do mesentério que recobre a porção cefálica do pâncreas junto ao duodeno. Esta dissecação pode ocasionar o rompimento parcial ou total da veia mesentérica superior, com sangramento, hipovolemia, e morte do animal no momento da cirurgia, ou então, isquemia intestinal com obstrução e morte no pós-operatório. Após ter sido executada esta dissecação com sucesso, foi confeccionada uma sutura em bolsa com polipropileno 7-0 na cabeça pancreática. A bolsa necessita ter tamanho suficiente para abrigar todo o conteúdo do carcinógeno a ser aplicado e não deve incluir a parede duodenal. Os pontos devem ser efetuados de forma superficial, para que não

haja sangramento de vasos mesentéricos e nem oclusão do ducto biliar. A posição correta da bolsa foi verificada com o auxílio da lupa de aumento de 2,5 a 10 vezes. Estando a bolsa em condições ideais, procedeu-se a implantação de 1 mg de DMBA, seguida de seu fechamento. A bolsa foi conferida novamente, desta vez através da visualização da parede posterior do duodeno, no intuito de diagnosticar um possível acidente com perfuração da mesma. Um cuidado especial quanto à contaminação da cavidade abdominal por cristais do DMBA também foi observado. A peritonite química causada por estes cristais é grave, evoluindo normalmente para a morte dos animais. Caso isso acontecesse, a minuciosa remoção dos cristais e a lavagem da cavidade com solução salina isotônica deveriam preceder o término da cirurgia. Revisada a hemostasia, foi efetuado o fechamento da parede abdominal incluindo a pele com pontos separados em “X” de fio mononylon 4-0. Os passos mais importantes do procedimento cirúrgico estão retratados nas figuras de número 9 a 14.

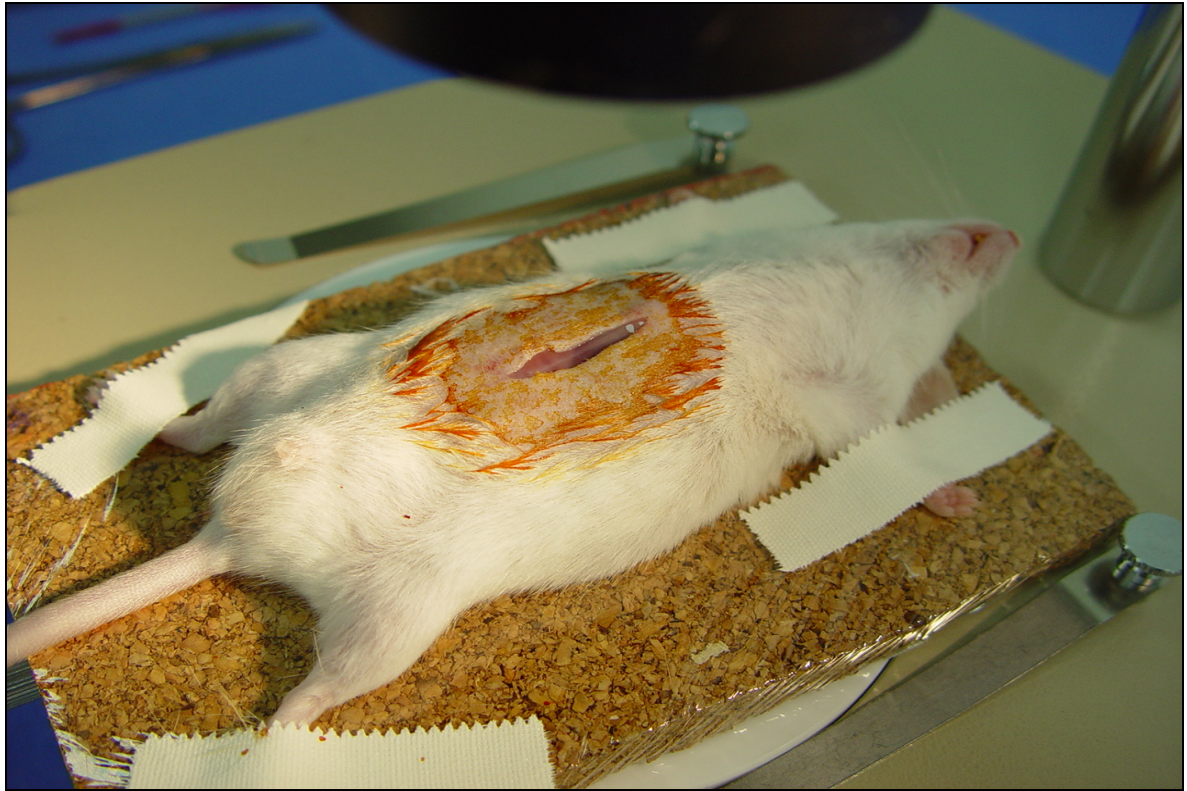


Figura 9. Incisão laparotômica



Figura 10. Exposição do duodeno

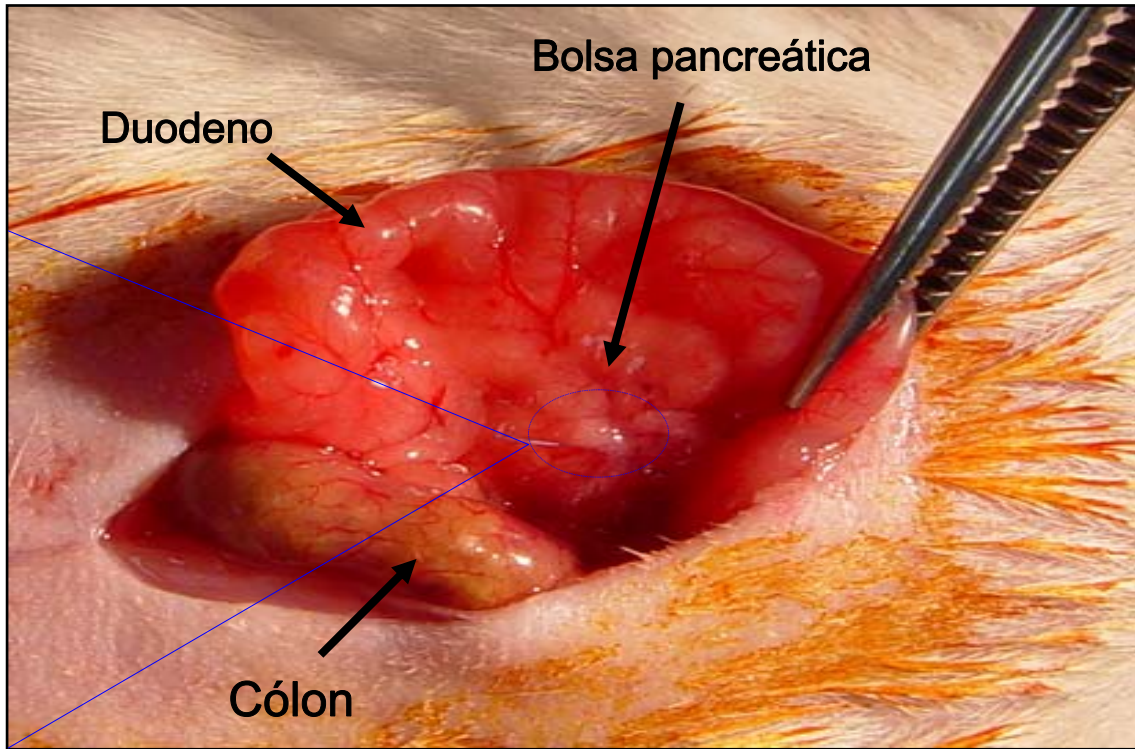


Figura 11. Confeção da bolsa na cabeça pancreática

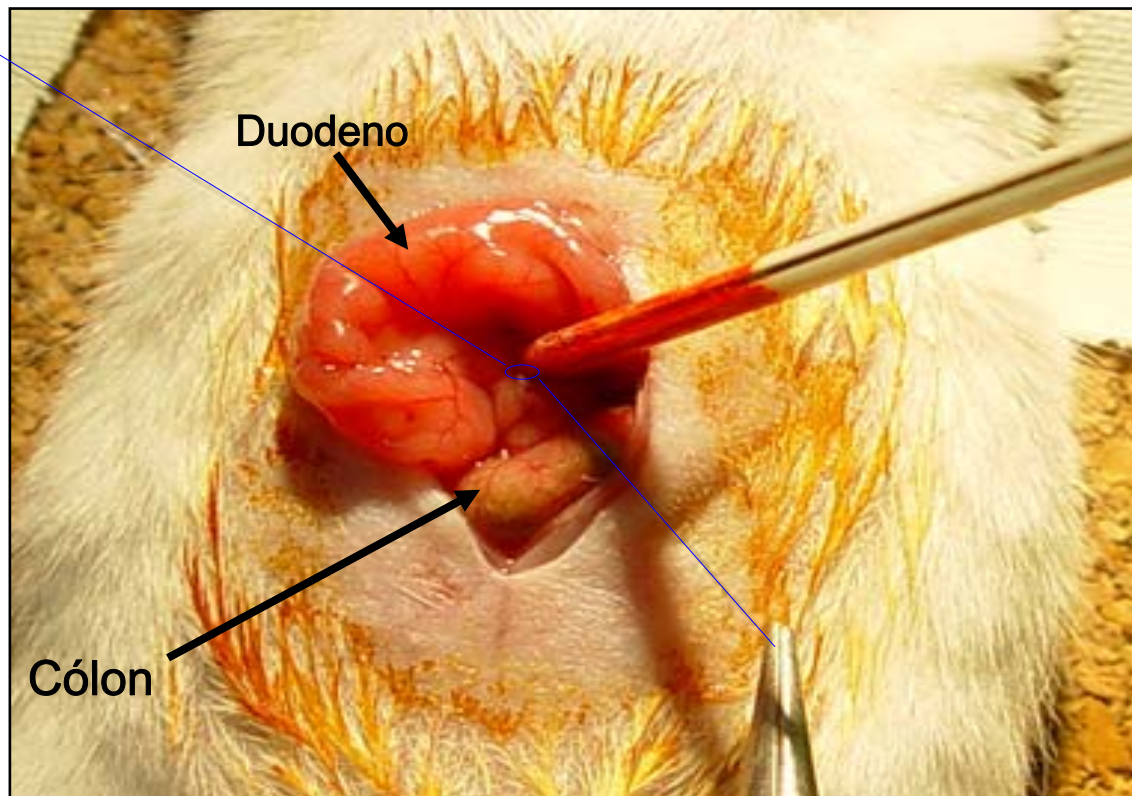


Figura 12. Aplicação do DMBA na bolsa pancreática

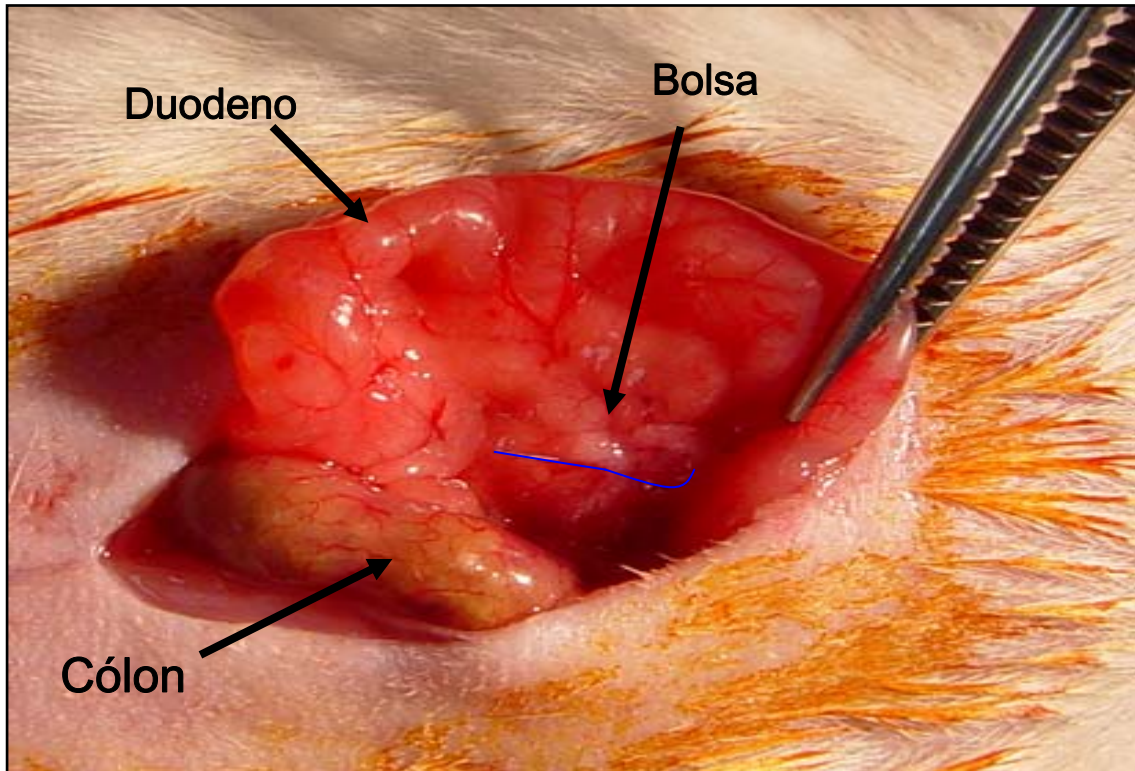


Figura 13. Bolsa pancreática com conteúdo do DMBA. Visão anterior

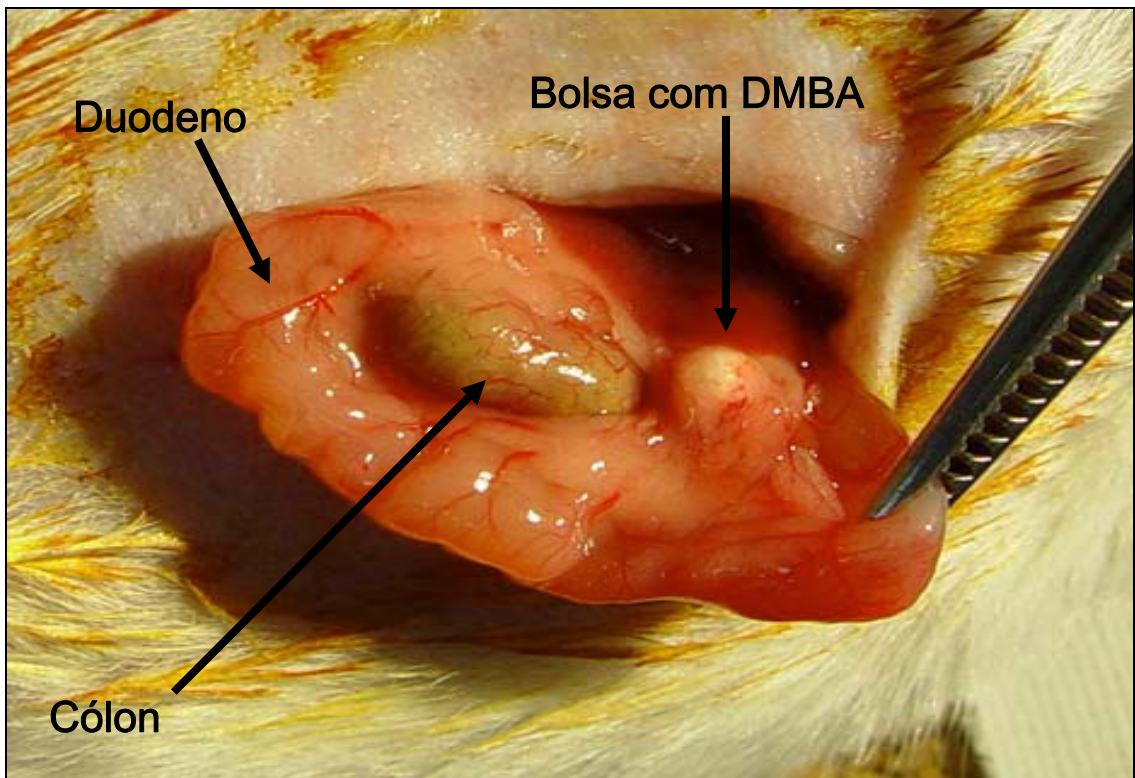


Figura 14. Bolsa pancreática com conteúdo do DMBA. Visão posterior.

Morte dos Animais

Os animais foram mortos 30 dias após a cirurgia por exposição à ciclo de 20 minutos em câmara fechada de CO₂ (48).

Todos os animais que morreram antes do período estabelecido para o término do experimento foram submetidos à necrópsia e a causa da morte, averiguada.

Preparação do Material para Análise Histopatológica

Após a eutanásia em câmara de CO₂, os animais foram submetidos à necropsia através de incisão toraco-abdominal com retirada em monobloco do esôfago, pulmões, coração, fígado, vias biliares, pâncreas, duodeno, intestinos e rins, conforme demonstrado na figura 15. As alterações tipo ascite, nódulos possivelmente metastáticos ou qualquer outro achado incomum foram verificadas e descritas. O material obtido foi fixado em formalina tamponada a 10% durante 7 dias. Após este período, foi realizada a macroscopia detalhada e dissecção das peças incluindo-se totalmente o pâncreas, desde sua porção cefálica até a cauda. Após o processamento dos tecidos, o material foi incluído em parafina e, com auxílio do micrótomo, foram obtidos cortes de 4 a 5 micrômetros, a partir dos quais foram confeccionadas lâminas coradas por hematoxilina e eosina (HE).

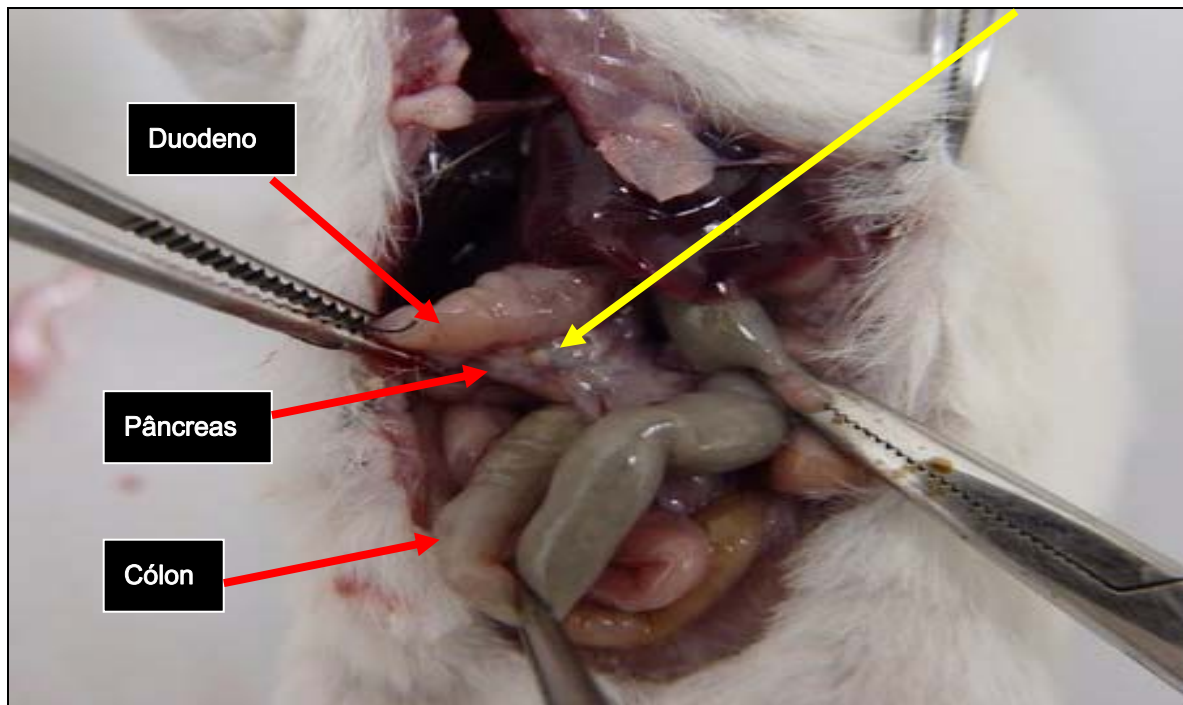


Figura 15. Necrópsia através de incisão tóraco-abdominal. A seta amarela mostra o DMBA na bolsa pancreática.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

As lâminas foram avaliadas por duas médicas patologistas e por dois autores do estudo, sem serem revelados seus grupos de origem. Após a observação, o diagnóstico final dos casos discordantes foi obtido por reavaliação das lâminas até o consenso diagnóstico.

Entre os diagnósticos histológicos os parâmetros avaliados compreenderam as lesões +precursoras e o adenocarcinoma.

A seguir são transcritos os critérios utilizados para os diagnósticos histológicos com os respectivos desenhos esquemáticos representativos conforme a classificação das lesões intra-epiteliais vigente na literatura (33-37,38).

Epitélio Ductal ou Ductular Normal: é um epitélio cuboidal ou colunar baixo com citoplasma anfofílico e ausência de mucina citoplasmática, hiper Cromatismo, amoldamento nuclear ou atipias. Ver figura 16.

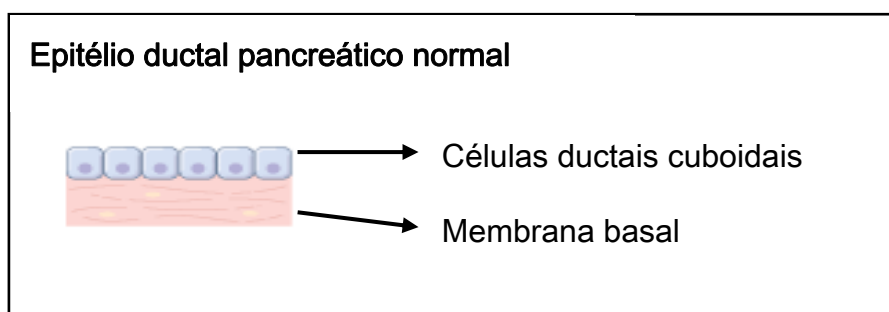


Figura 16. Desenho representativo do epitélio ductal pancreático normal, modificado de Hruban RH *et al* (50).

Neoplasia Pancreática Intra-epitelial 1a (NIPan 1a): são lesões planas compostas por células de epitélio colunar alto com núcleo basal e mucina citoplasmática supranuclear. Os núcleos são pequenos, de forma redonda ou ovalada. Quando são

ovais, seu maior eixo longitudinal é perpendicular à membrana basal, conforme visto na figura 17.

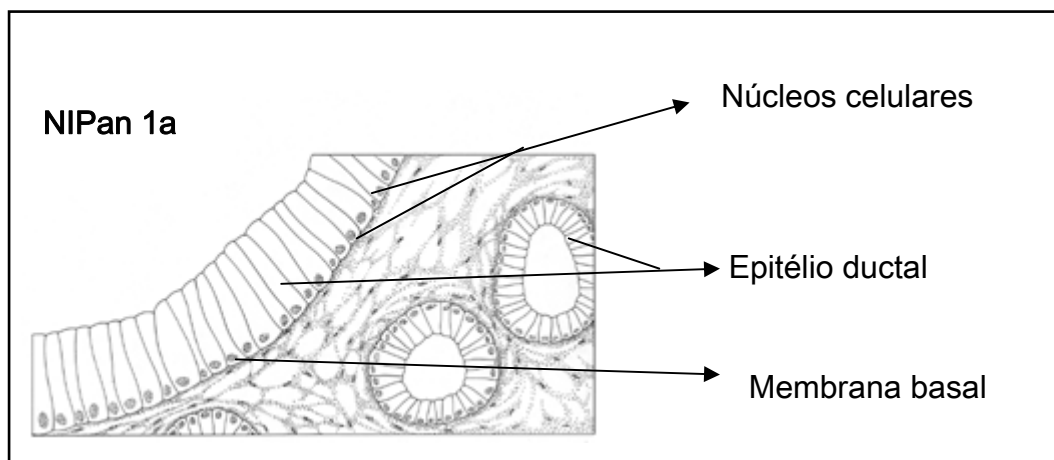


Figura 17. Desenho representativo do NIPan 1a. Adaptada de Hruban RH *et al* (51).

Neoplasia Pancreática Intra-epitelial 1b (NIPan 1b): são lesões semelhantes ao NIPan-1a, exceto pelo formato papilar ou micropapilar. Pseudoestratificação basal pode estar presente. A figura 18 apresenta estas características.

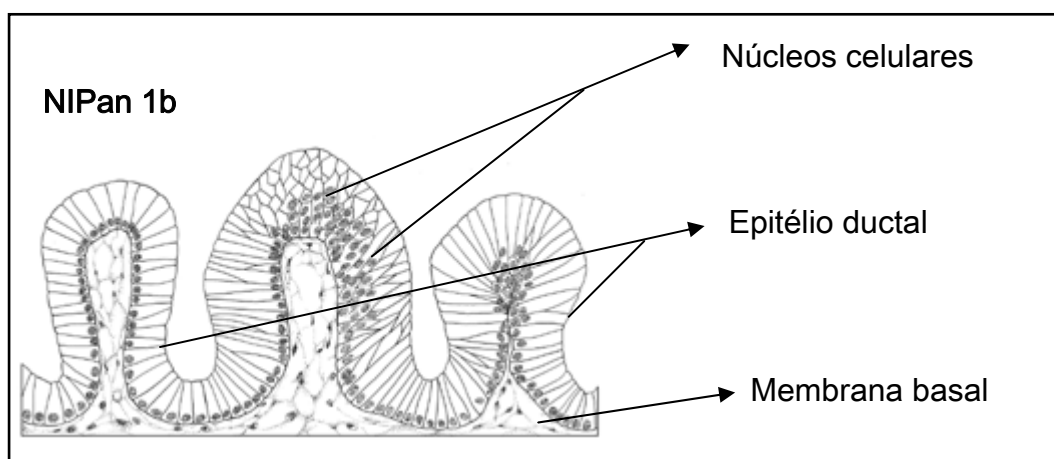


Figura 18. Desenho representativo do NIPan 1b. Adaptada de Hruban RH *et al* (51).

Neoplasia Pancreática Intra-epitelial 2 (NIPan 2): estruturalmente são lesões mucinosas que podem ser planas. Sua maioria, entretanto, é papilar. Na avaliação citológica, apresentam núcleos aumentados de tamanho e número. Os núcleos são hipercromáticos, com perda da polaridade e com pseudoestratificação. Mitoses são raras e quando estão presentes, são basais. O NIPan 2 pode ser visualizado no esquema da figura 19.

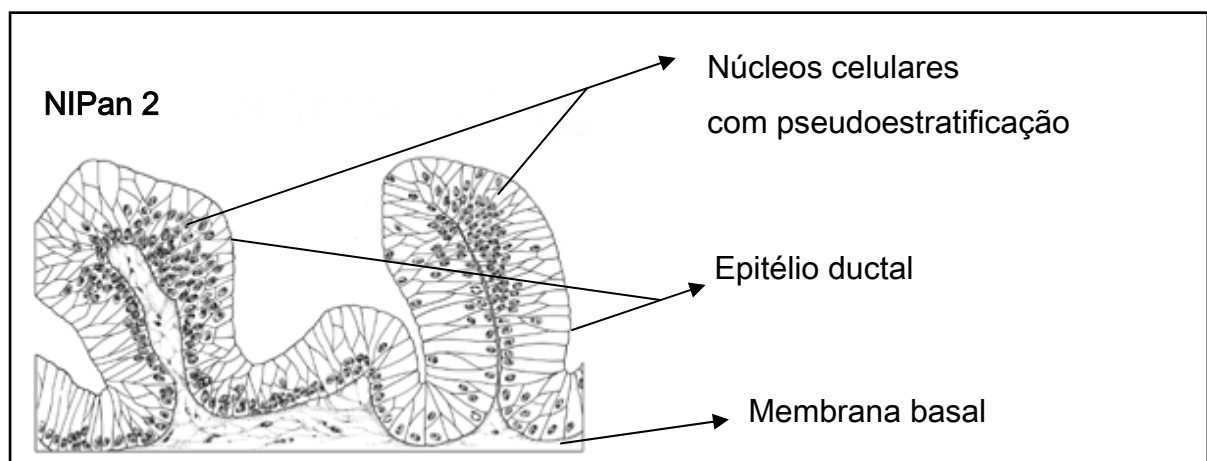


Figura 19. Desenho representativo do NIPan 2. Adaptada de Hruban RH *et al* (51).

Neoplasia Pancreática Intra-epitelial 3 (NIPan 3): na sua maioria, são lesões papilares, micropapilares ou cribiformes, mas raramente, planas. O desprendimento de grupos de células ou necrose intraluminal sugere o diagnóstico de NIPan 3 e é conhecida como “decapitação”. A citologia dessas lesões apresenta perda da polaridade dos núcleos, em células calciformes distróficas (células calciformes com

núcleos orientados para a porção apical, também dita luminal da célula, contendo mucina citoplasmática na parte mais basal), mitoses anormais, irregularidade nucleares e nucléolos proeminentes (macronúcléolos). A arquitetura citonuclear é semelhante ao carcinoma, sem invasão da membrana basal. O sinônimo para esta alteração é o Carcinoma *"in situ"*, como pode ser observado na figura 20.

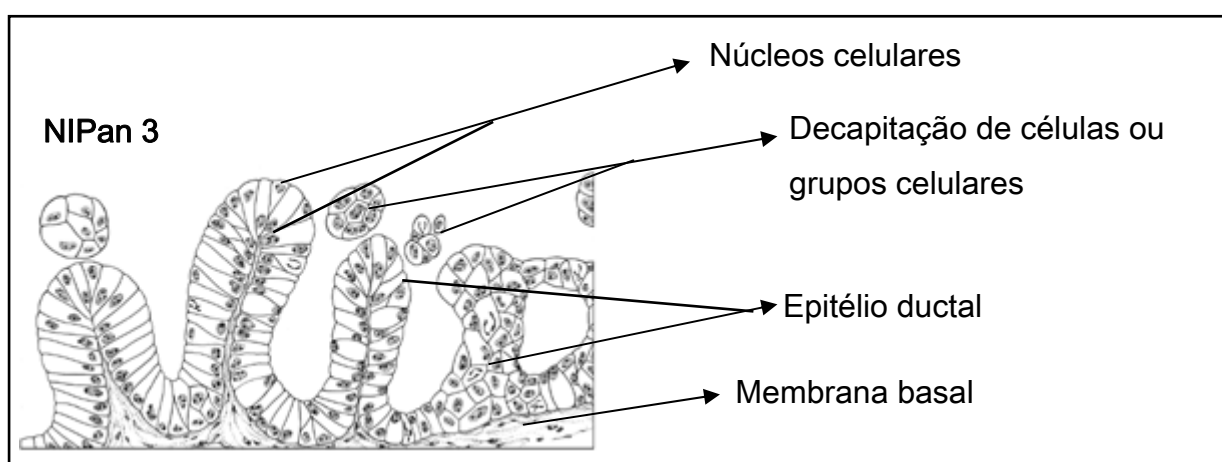


Figura 20. Desenho representativo do NIPan 3. Adaptada de Hruban RH *et al* (51).

Carcinoma Invasor: pequenas glândulas com irregularidade de contorno e uma camada de células com desmoplasia periductal (hialinização do estroma ductal). As características celulares são de pleomorfismo, nucléolos evidentes, diminuição da relação citoplasma/núcleo. Os núcleos são de volume aumentado, com esvaziamento da cromatina e pleomórficos. Glândulas com estas alterações, incluindo as características nucleares do NIPan 3, acrescidas de extensão irregular

ultrapassando a membrana basal e rodeadas por estroma desmoplásico, caracterizam carcinoma invasor. A figura 21 é representativa do carcinoma invasor.

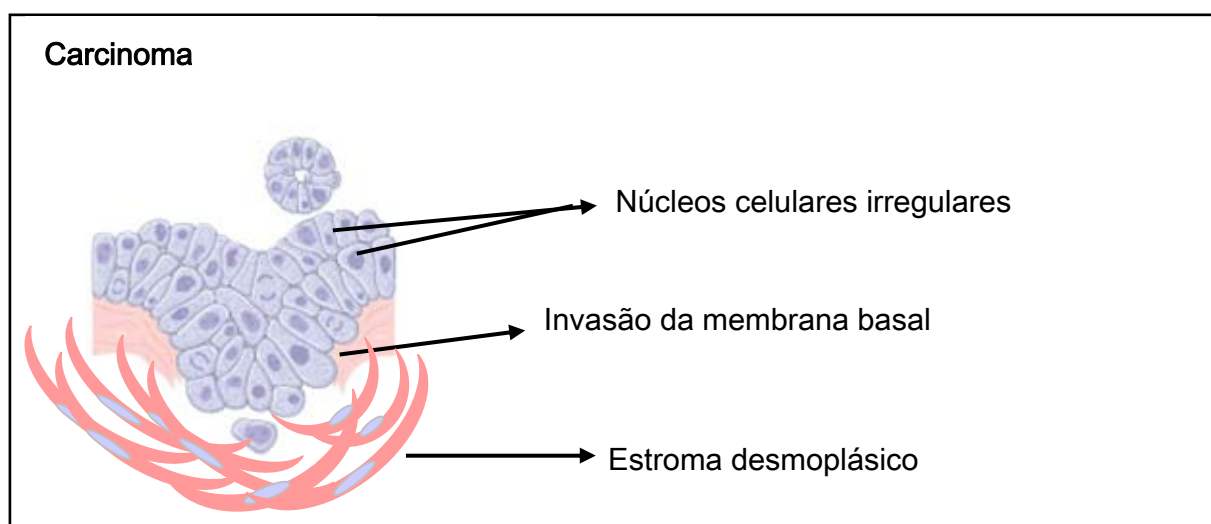


Figura 21. Desenho representativo do carcinoma pancreático invasor, modificado de Hruban RH *et al* (50).

Outras características histopatológicas encontradas nas lâminas examinadas como os complexos tubulares e as alterações inflamatórias também foram avaliadas, mas não submetidas à análise estatística, nem tampouco detalhadas neste estudo.

São considerados como complexos tubulares os arranjos de vários ductos com células epiteliais típicas em substituição às células acinares localizadas na região ao redor da bolsa onde foi implantado o DMBA.

Para as reações inflamatórias agudas os achados histopatológicos são o predomínio de leucócitos polimorfonucleares, o edema intersticial e os focos de hemorragia intersticial. As reações inflamatórias crônicas foram caracterizadas por fibrose irregular, ácinos reduzidos em número e em tamanho, obstrução com dilatação dos ductos pancreáticos e infiltrado intersticial com predomínio de linfócitos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram inicialmente descritos com freqüências e percentuais. Em seguida foram obtidas tabelas de contingência onde foram comparados os grupos pelo teste Exato de Fisher. A significância das comparações das medianas foi obtida pelo teste de Kruskal-Wallis equivalente à ANOVA sobre "*ranks*" (escores) com teste de Posthoc de Tukey/ Duncan, comprovando a homogeneidade das variâncias. Os escores utilizados estão dispostos na figura número 22. Tais escores também foram aplicados na confecção do gráfico número 1, conforme pode ser visto na seção "Resultados". O nível de significância adotado no trabalho foi de $\alpha=0,05$ ($P < 0,001$). Os dados foram analisados com o auxílio do Programa *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* versão 11.0.

DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO	CÓDIGO
PANCREAS NORMAL	10
HIPERPLASIA REACIONAL	20
NIPan Ia	31
NIPan Ib	32
NIPan II	33
NIPan III	34
ADENOCARCINOMA	40

Figura 22. Escores utilizados para codificação dos diagnósticos histológicos apresentados no gráfico número 1.

ÉTICA

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre cadastrado pelo número 5026.

ATIVIDADES DOS ALUNOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Cinco alunos da graduação em medicina com interesse em pesquisa foram selecionados para participar deste estudo. O grupo foi instruído e treinado pela autora a manusear corretamente os animais. Entre suas atribuições, os alunos auxiliavam na exposição dos animais à fumaça de cigarro, na aplicação da nicotina

subcutânea e na preparação pré-operatória que compreendia a indução anestésica e o preparo do campo operatório. Além disso, eram os responsáveis pela pesagem semanal dos animais. Durante tais atividades, utilizavam equipamento de proteção individual a acidentes biológicos como luvas e máscaras antifumaça.

RESULTADOS

RESULTADOS

DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO

Foram encontrados exemplos de todos os graus de lesão intra-epitelial e do adenocarcinoma de pâncreas no modelo de carcinogênese pancreática induzida pelo DMBA em camundongos, associando-se a injeção subcutânea de nicotina e expondo os animais à fumaça de cigarros no período de 30 dias.

As imagens (figuras do número 23 ao número 32) foram obtidas da avaliação histológica por microscopia óptica dos pâncreas dos animais do experimento. Estão exemplificados o epitélio pancreático normal, cada um dos graus das lesões intra-epiteliais e o adenocarcinoma, comparativamente entre os animais do grupo DMBA-f e DMBA-n, a partir da classificação proposta por Hruban e colaboradores (32). As fotos digitais do pâncreas normal, do epitélio ductal pancreático normal e da hiperplasia ductal derivam da avaliação histológica do grupo *Sham*, conforme pode ser conferido na figura 23 A e B. Além disso, estão demonstrados os achados histológicos referentes aos complexos tubulares, aos cristais de DMBA com a bolsa pancreática e às alterações inflamatórias, apenas com finalidade ilustrativa.

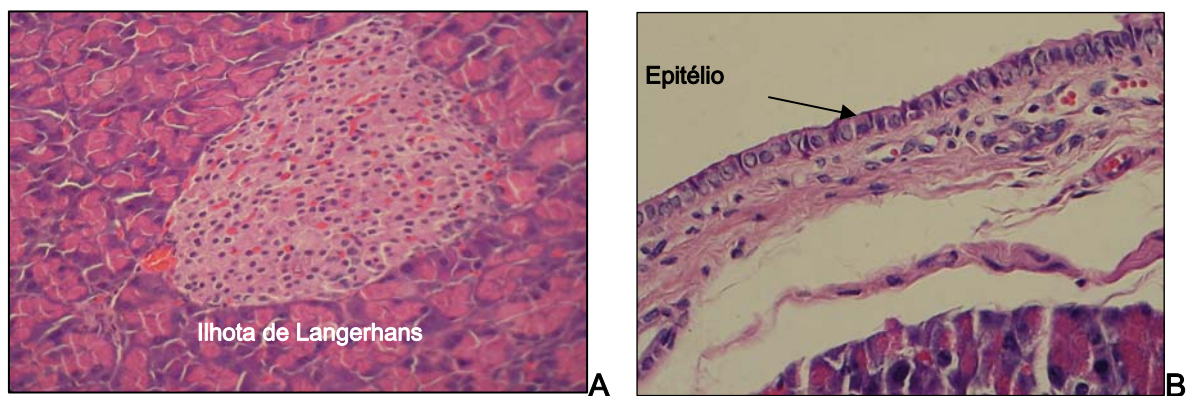


Figura 23. Pâncreas normal com ilhota de Langerhans (A) e ducto pancreático normal, ambos em camundongo (B). Fotos digitais da microscopia óptica. Animais do grupo *Sham* (HE. 100x)

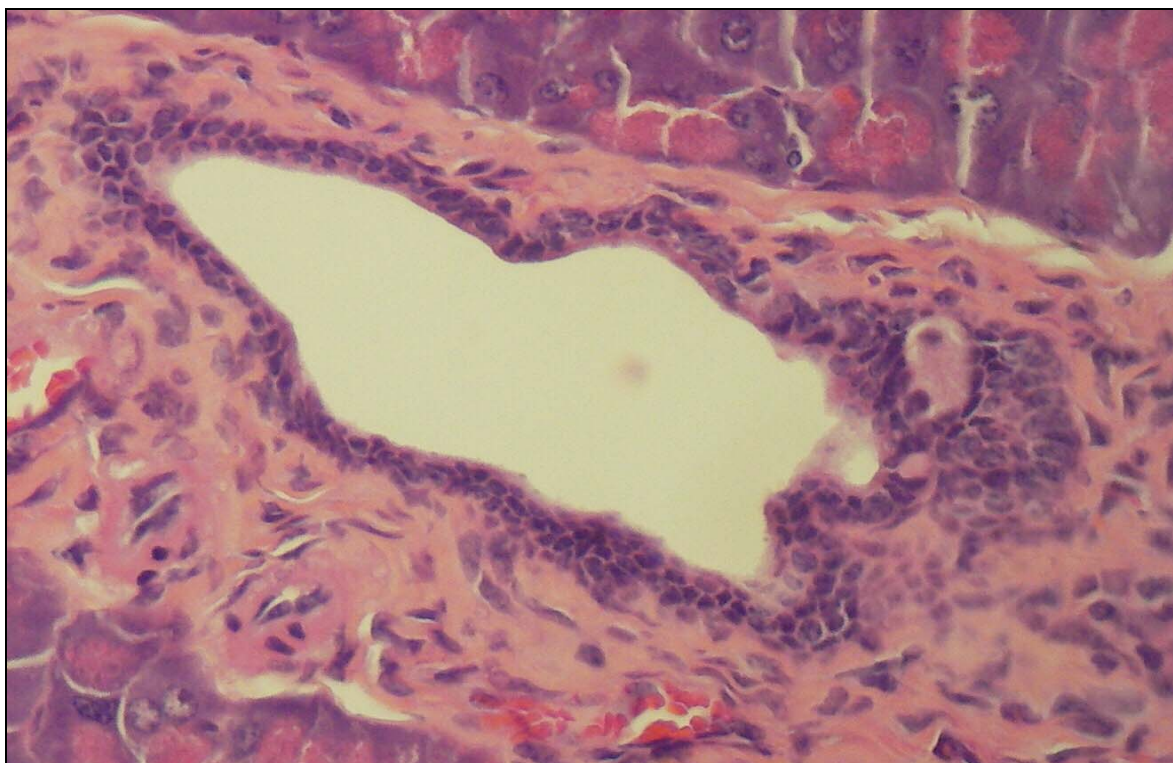


Figura 24. Hiperplasia ductal pancreática em camundongo. Foto digital da microscopia óptica. Animal do grupo *Sham* (HE. 200x)

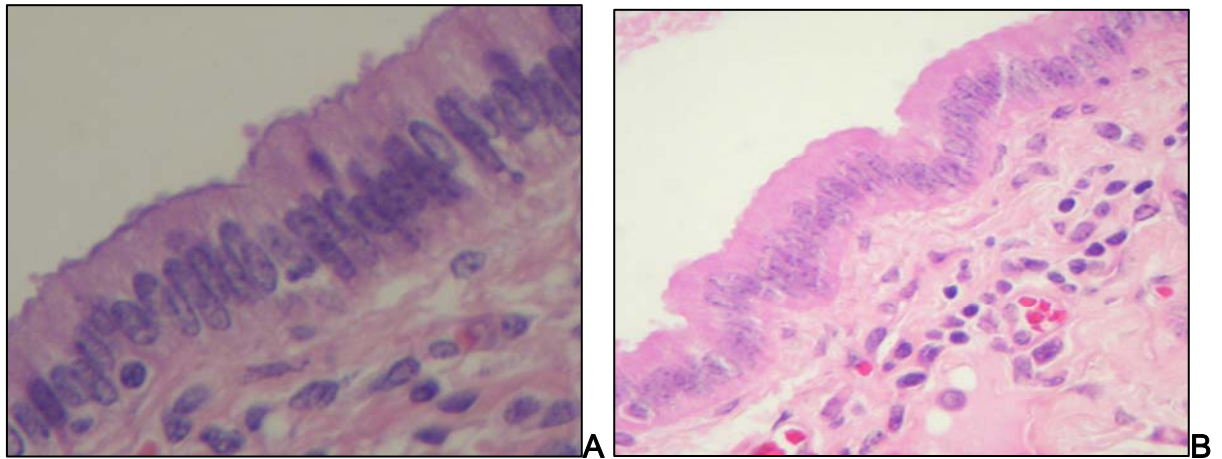


Figura 25. NIPan 1a em camundongo do grupo **DMBA-f** (A) e do **DMBA-n** (B). Fotos digitais da microscopia óptica (HE. 200-400x)

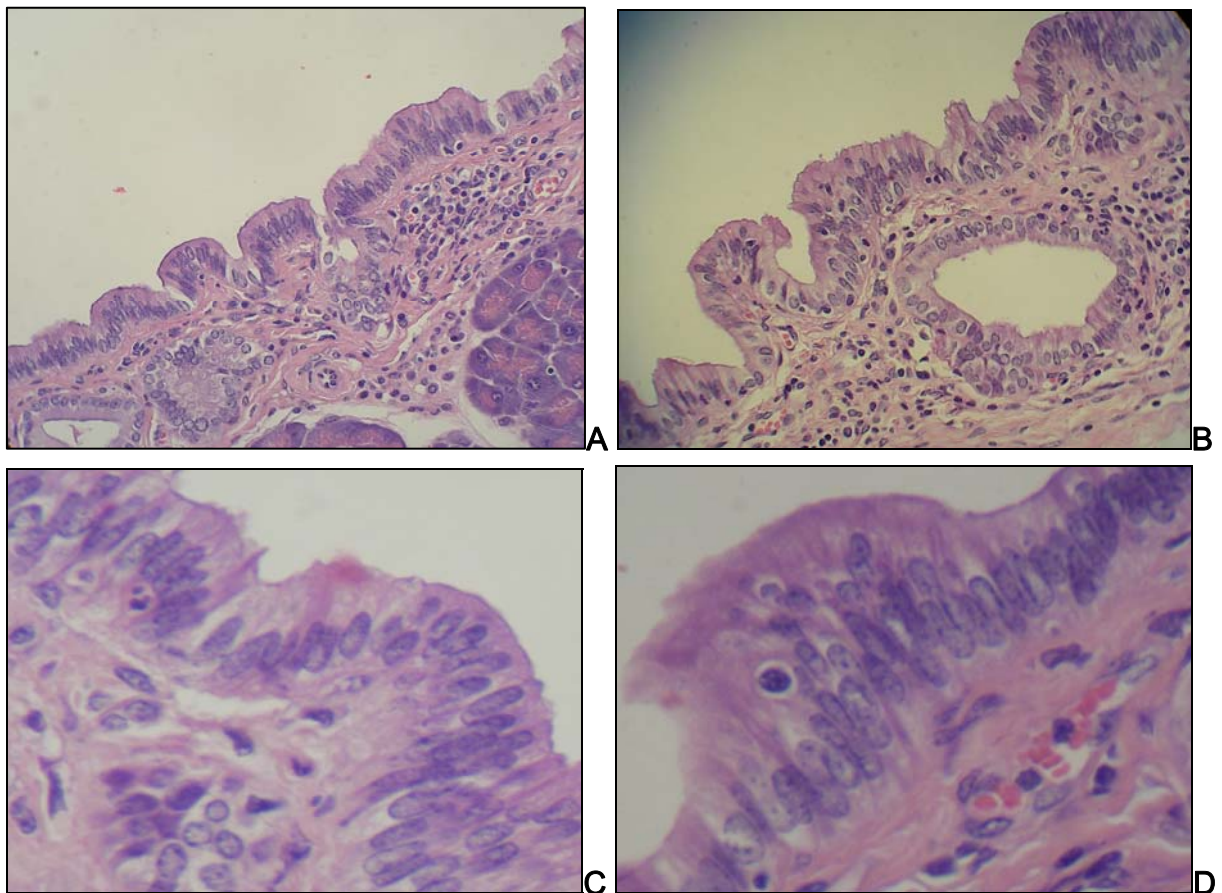


Figura 26. NIPan 1b em camundongo do grupo **DMBA-f** (A) e do **DMBA-n** (B). Detalhe da pseudoestratificação nuclear ductal (B,C) animais do grupo **DMBA-f**. Fotos digitais da microscopia óptica (HE. A e B: 200x. C e D:400x)

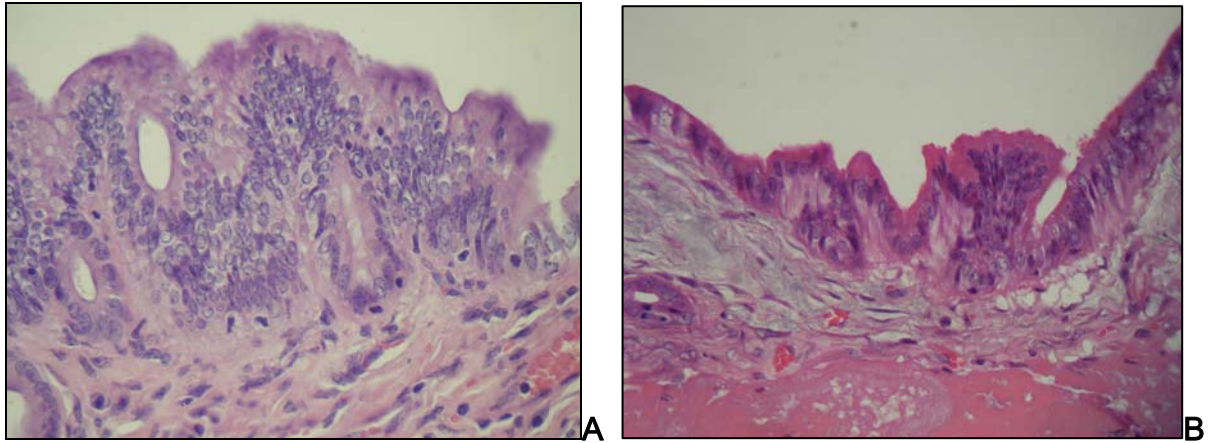


Figura 27. NIPan 2 em camundongo do grupo **DMBA-f** (A) e do **DMBA-n** (B). Fotos digitais da microscopia óptica (HE. 200x)

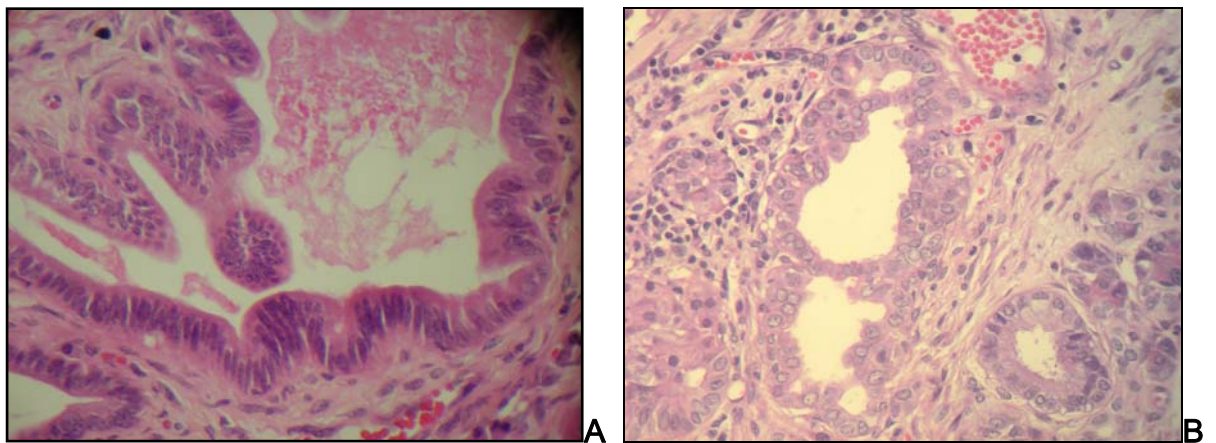


Figura 28. NIPan 3 em camundongo do grupo **DMBA-f** (A) e do **DMBA-n** (B). Fotos digitais da microscopia óptica (HE. 100x)

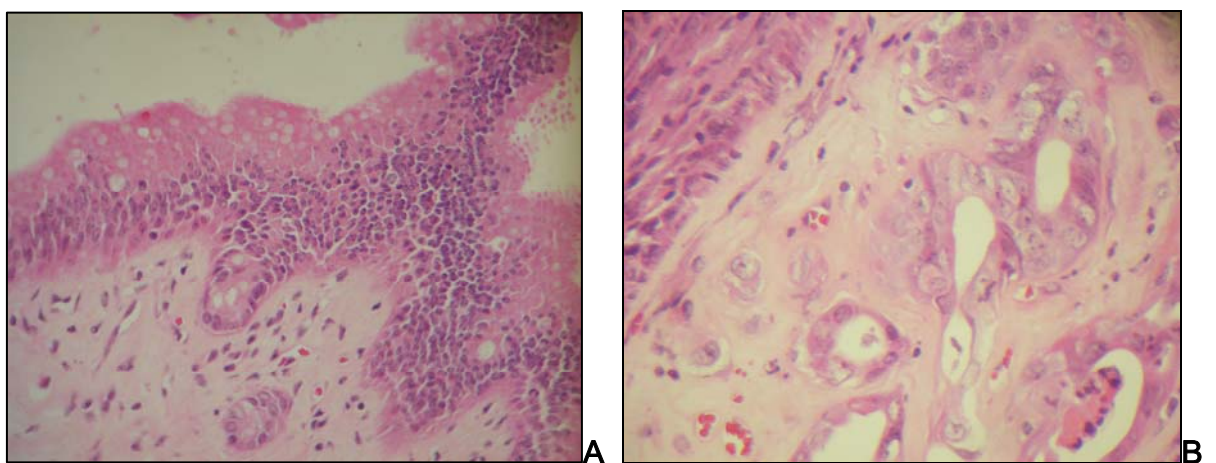


Figura 29. Adenocarcinoma pancreático em camundongo do grupo **DMBA-f** (A) e do **DMBA-n** (B). Fotos digitais da microscopia óptica (HE. 200x)

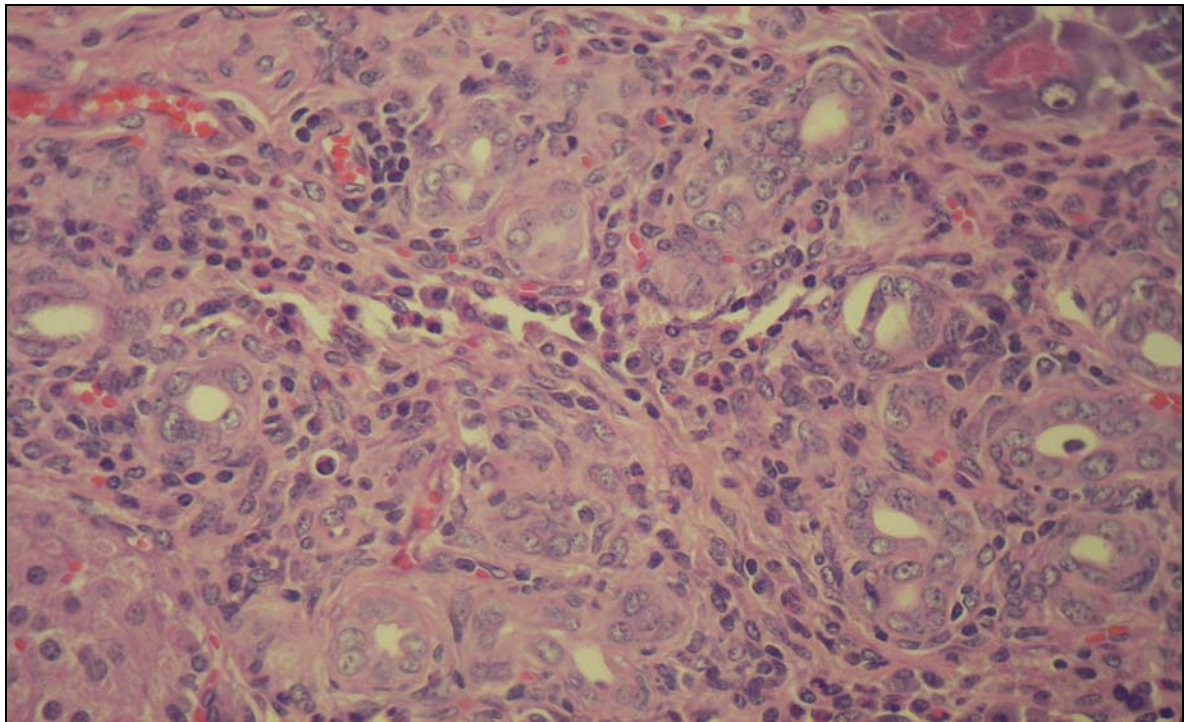


Figura 30. Histologia dos complexos tubulares no tecido pancreático em camundongos do grupo **DMBA-f** . Foto digital da microscopia óptica (HE. 400x)

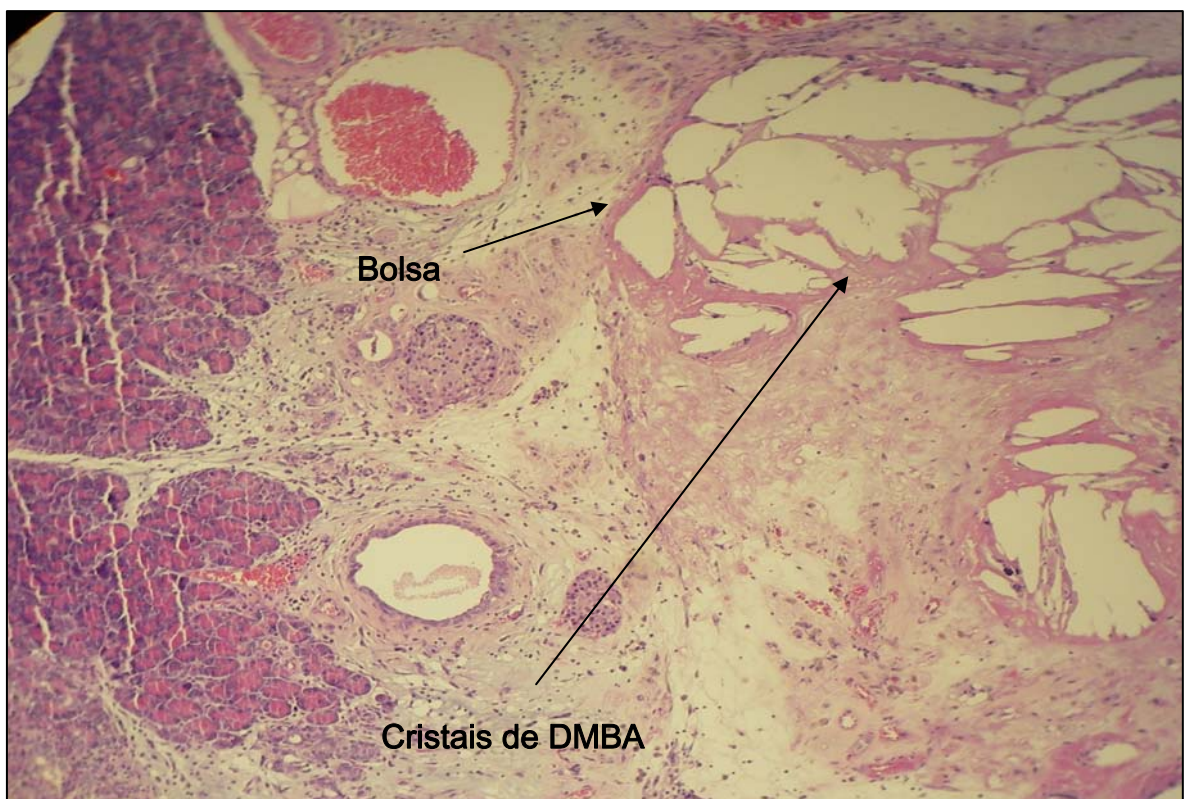


Figura 31. Histologia: Sutura em bolsa com cristais de DMBA no tecido pancreático em camundongos do grupo **DMBA-f**. Foto digital da microscopia óptica (HE. 100x)

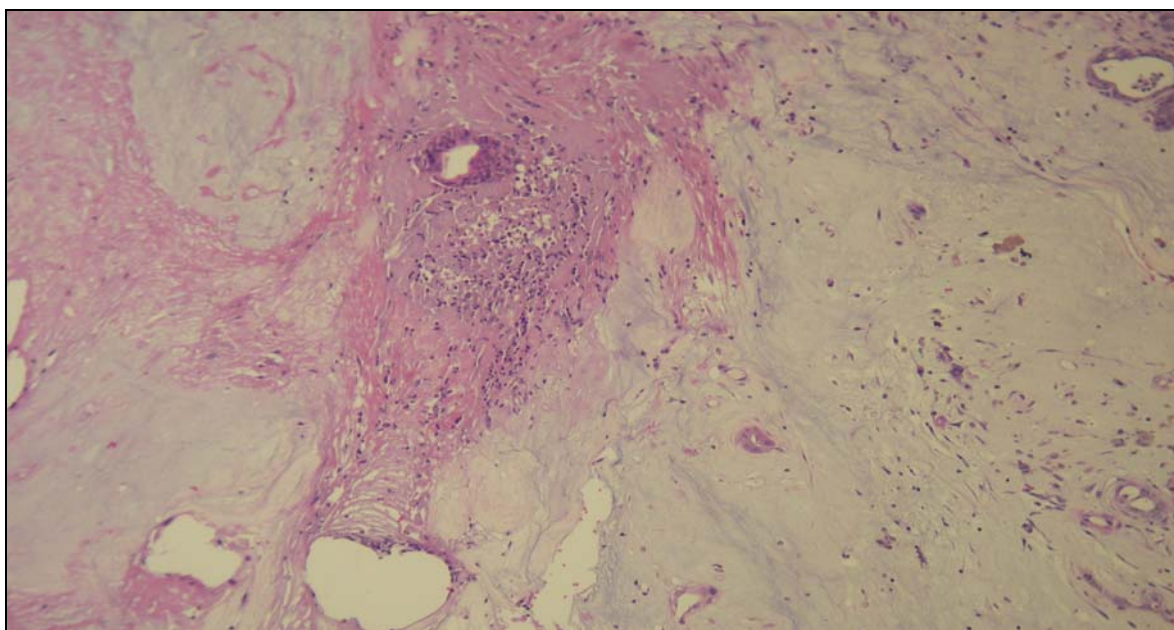


Figura 32. Histologia das alterações inflamatórias crônicas em camundongo do grupo **DMBA-f**. Foto digital da microscopia óptica. (HE. 100x)

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DIAGNÓSTICOS HISTOLÓGICOS

Na tabela 2, estão descritas as frequências dos diagnósticos de maior gravidade em cada grupo experimental, computados como uma ocorrência apenas. Foram considerados os seguintes diagnósticos: pâncreas normal, hiperplasia pancreática, neoplasia intra-epitelial e adenocarcinoma. As lesões intra-epiteliais, independente do seu grau, foram agrupadas de forma geral como NIPan para efeito de análise estatística. A ocorrência de NIPan nos animais agrupados como **DMBA-exclusivo** e como **DMBA-fumaça** foi a mesma (66,7%) e a maior entre todos os grupos. O grupo **DMBA-nicotina** apresentou a maior frequência de adenocarcinoma

(51,9%). Os grupos se mostraram diferentes entre si, com significância estatística pelo teste *Exato de Fisher* que foi de 41,033 com $p < 0,001$.

A tabela 3 é um desdobramento da tabela anterior, onde estão listadas apenas as lesões de maior grau de NIPan em cada grupo. Já a tabela 4 apresenta todos os graus das lesões intra-epiteliais encontradas em cada um dos casos, também separados por grupos.

O gráfico número 1 apresenta as medianas das variáveis avaliadas em cada grupo, indicando a concentração de lesão de maior grau segundo sua frequência. Da maneira como os grupos foram dispostos no gráfico, observa-se claramente uma ascendente tendência à gravidade dos mesmos. A diferença entre os quatro grupos em relação aos tipos histológicos pode ser comprovada na tabela 5. Apenas não foi significativa a comparação entre os grupos DMBA-exclusivo e DMBA-fumaça ($p=0,953$).

Tabela 2. Ocorrências dos diagnósticos histológicos de maior gravidade em cada grupo experimental*

HISTOLOGIA	GRUPOS				Total n=88
	Sham n=7	DMBA n=24	DMBA-f n=30	DMBA-n n=27	
Normal	6 85,7%	-	2 6,7%	-	8 9,1%
Hiperplasia	1 13,3%	4 16,7%	4 13,3	1 3,7%	10 11,4%
NIPan	-	16 66,7%	20 66,7%	12 44,4%	48 54,5%
Adenocarcinoma	-	4 16,7%	4 13,3%	14 51,9%	22 25,0%
TOTAL	7	24	30	27	88

*Teste Exato de Fisher = 41,03, p<0,001

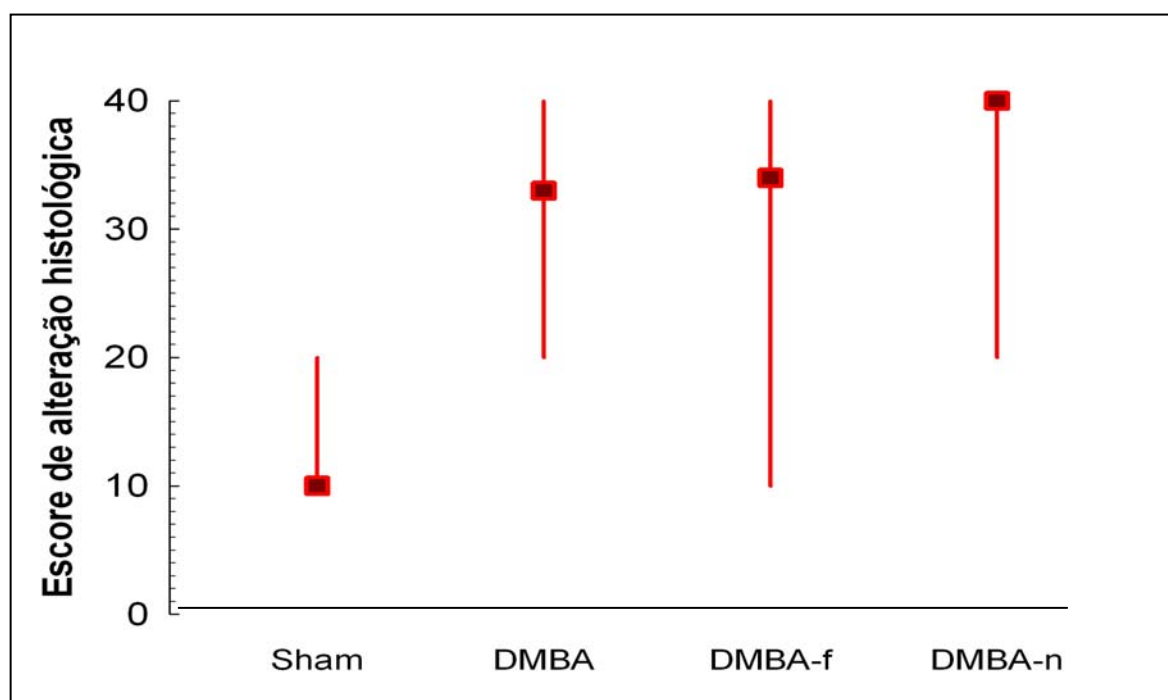
Tabela 3. Frequências das lesões de maior grau entre as neoplasias intra-epiteliais em cada grupo experimental

HISTOLOGIA	GRUPOS				TOTAL n=88
	Sham n=7	DMBA n=24	DMBA-f n=30	DMBA-n n=27	
NIPan 1a	-	1 4,2%	2 6,7%	-	3 3,40%
NIPan 1b	-	4 16,7%	2 6,7%	3 11,1%	9 10,22%
NIPan 2	-	8 33,3%	4 13,3%	5 18,5%	17 19,31%
NIPan 3	-	3 12,5%	12 40,0%	4 14,8%	19 21,59%
TOTAL	-	16 66,7%	20 66,7%	12 44,4%	48 54,5%

Tabela 4. Ocorrência absoluta de todos os graus da neoplasia intra-epitelial nos grupos experimentais

Histologia	GRUPOS				Total
	Sham n=7	DMBA n=24	DMBA-f n=30	DMBA-n n=27	
NIPan 1a	-	14	13	13	40
NIPan 1b	-	17	12	12	41
NIPan 2	-	14	18	18	50
NIPan 3	-	7	15	15	37
Total	-	52	58	58	168

Gráfico 1: Valores máximos e mínimos da Mediana dos diagnósticos histológicos em cada grupo experimental classificados por seqüência de escores



Escore 0: não corresponde a tecido pancreático. **Escore 10:** pâncreas normal.

Escore 20: hiperplasia reacional. **Escore 30:** neoplasia intra-epitelial, sendo **31** para NIPan 1a; **32** para NIPan 1b; **33** para NIPan 2 e **34** para NIPan 3. **Escore 40:** câncer pancreático. **Sham** refere-se ao grupo *Sham*. **DMBA**, ao grupo DMBA-exclusivo. **DMBA-f**, ao grupo com DMBA-fumaça e **DMBA-n**, ao DMBA-nicotina.

Tabela 5. Diferenças entre os escores das medianas das lesões de maior grau dos grupos estudados

GRUPO	GRUPO	ESCORES DAS MEDIANAS*	SIGNIFICÂNCIA
<i>Sham</i>	DMBA	±34,67	0,002
	DMBA-f	±37,71	0,000
	DMBA-n	±53,45	0,000
DMBA	DMBA-f	±3,04	0,953
	DMBA-n	±18,78	0,012
DMBA-f	DMBA-n	±15,74	0,032

* *Teste de Tukey, p<0,01*

MORTALIDADE

Cento e quatorze camundongos foram incluídos no estudo. Destes, 10 animais foram designados para o grupo *Sham*. O grupo do DMBA-fumaça foi formado por 53 animais e o grupo de DMBA-nicotina, por 51.

A mortalidade global do estudo foi 43,85%. As mortalidades pré e pós-operatórias de cada grupo de animais, com as respectivas causas estão listadas nas tabelas 6 e 7, respectivamente.

No grupo *Sham*, os 10 animais que iniciaram o estudo foram submetidos à cirurgia, sendo que 3 animais morreram no pós-operatório.

No grupo DMBA-fumaça, dos 53 animais designados, 5 morreram antes da cirurgia e 18 animais morreram após o ato cirúrgico.

Dos 51 animais do grupo DMBA-nicotina, 3 morreram no pré-operatório e 21 animais morreram no decorrer dos 30 dias após a cirurgia.

As perdas e a mortalidade do grupo DMBA-exclusivo não foram descritas nos Resultados. Tais informações fazem parte do conteúdo da Discussão deste trabalho.

Tabela 6: Causas de morte pré-operatória dos grupos experimentais

CAUSAS DE MORTE PRÉ-OPERATÓRIA	GRUPO Sham n=10	GRUPO DMBA-f n=53	GRUPO DMBA-n n=51	TOTAL n=114
Canibalismo	-	3(5,66)	-	3(2,63%)
Indeterminada	-	2(3,77)	-	2(1,75%)
Convulsão pela nicotina	-	-	3(5,88%)	3(2,63%)
Total morte pré-operatória	-	5(9,43%)	3(5,88%)	8 (7,01%)

Tabela 7: Causas de morte pós-operatória dos grupos experimentais

CAUSAS DE MORTE PÓS-OPERATÓRIA	GRUPO Sham n=10	GRUPO DMBA-f n=48	GRUPO DMBA-n n=48	TOTAL n=106
Convulsão pela nicotina	-	-	5(10,41%)	5(4,71%)
Isquemia intestinal	1(10%)	9(18,75%)	10(20,83%)	20(18,86%)
Lesão de via biliar	1(10%)	3(6,25%)	2(4,16%)	6(5,66%)
Pancreatite	1(10%)	4(8,33%)	2(4,16%)	7(6,60%)
Evisceração	-	1(2,08%)	-	1(0,94%)
Sangramento transoperatório	-	1(2,08%)	-	1(0,94%)
Indeterminada	-	-	2(4,16%)	2(1,88%)
Total morte pós-operatória	3(30%)	18(37,5%)	21(43,75)	42(39,62%)

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A CONFECÇÃO DOS GRUPOS

Os quatro grupos envolvidos no estudo tiveram a finalidade de determinar quais os efeitos da nicotina sobre a carcinogênese pancreática induzida nos animais de experimentação pelo DMBA, analisando-se suas lesões histopatológicas através dos novos critérios diagnósticos adotados na classificação de lesões precursoras descrita em 2001 por Hruban (36).

A forma inoculada da nicotina através de injeção subcutânea foi utilizada visando maior rapidez de obtenção dos resultados. A nicotina 3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl) pyridine], 98 -100%, isenta de base e líquida (Sigma, código brasileiro N3876), é a forma mais pura da nicotina, de onde derivam metabólitos também encontrados no cigarro (22,23).

A exposição do grupo DMBA-f à fumaça do cigarro procurou reproduzir os efeitos do fumo passivo sobre o pâncreas do animal submetido à indução tumoral pelo DMBA.

Grupos de animais somente expostos à nicotina ou ao fumo, não foram incluídos no estudo, pois já existem séries experimentais que utilizam as próprias nitrosaminas e os derivados da nicotina como indutores da neoplasia pancreática, inclusive em culturas de células (24,25).

O número de animais para cada grupo foi previamente estipulado através do cálculo da amostra: trinta animais em cada um dos grupos experimentais seria um número suficiente para comprovação ou não da hipótese de trabalho. Para o grupo *Sham*, 10 animais seriam suficientes, uma vez que não se esperava o desenvolvimento de lesões pancreáticas neoplásicas, pois este grupo objetivou ser o controle da cirurgia.

De forma semelhante a Rivera, que adicionou animais no decorrer de seu trabalho a partir de suas perdas para garantir um número representativo de sobreviventes ao final do estudo com achados significativos, esta autora fez o mesmo (42).

Como os animais já iniciavam o trabalho em tempos diferentes para possibilitar que todos fossem operados depois de transcorridos o mesmo número de dias de exposição, o acréscimo de novos animais para completar o número estipulado, não trouxe nenhum dano à pesquisa. A maior parte das mortes dos animais após a cirurgia ocorreu entre os cinco primeiros dias de pós-operatório.

Neste momento, foram introduzidos novos animais. Ao grupo *Sham* não foram adicionados novos integrantes.

A utilização dos dados do grupo **DMBA-exclusivo** que foram descritos no trabalho original deste modelo, diminuiu a necessidade de se acrescentar um número expressivo de mais animais, observando-se assim uma recomendação do código de ética em pesquisa animal. Os resultados deste grupo foram utilizados tendo em vista que foram obtidos através de uma mesma metodologia, aplicada pelo mesmo grupo de investigadores, seguindo uma mesma linha de pesquisa e parece não ter trazido nenhum prejuízo a conclusão dos resultados do trabalho em discussão.

A ESCOLHA DAS SUBSTÂNCIAS PROMOTORAS

Chen e colaboradores escolheram um cigarro com 1,2 mg de nicotina e expuseram seus animais de experimento à fumaça produzida por três cigarros, 3 vezes ao dia durante 4 dias para avaliar a perda de peso, apetite e a presença de um peptídeo cerebral. Seu modelo considerado de um período curto de exposição alcançou os objetivos propostos para a perda de apetite e de peso dos animais, mas

não comprovou a alteração no peptídeo, provavelmente devido à pequeníssima duração do mesmo (52).

Outros estudos também expuseram animais de experimentação à fumaça de cigarros com finalidade de detecção da carcinogênese em “órgãos-alvo” diversos (53-55). Os cigarros utilizados normalmente eram os mesmos: *Winefield Red*® ou *Kentucky 1R4F*®, além dos da marca *Marlboro*® (52-54). O primeiro apresenta uma concentração de 1,2 mg de nicotina, enquanto o segundo é utilizado em um sistema mecânico que pode produzir uma fumaça com total de partículas suspensas provenientes dos componentes deste cigarro, ajustável em sua concentração, conforme necessário. A maior parte dos estudos aplicam a concentração de 100 a 250 mg/m³ partículas. O tempo dos estudos é extremamente variável. Alguns expõem os animais por quase 1 ano, outros por apenas algumas semanas ou dias. Os animais devem permanecer individualmente dentro de um sistema de inalação com o corpo todo exposto ou somente as vias áreas expostas à fumaça gerada.

No presente estudo, a opção foi por uma concentração aproximada de 100mg/m³ de nicotina em uma suspensão de fumaça do cigarro produzida pela queima dos da marca *Derby*®, rótulo vermelho. A concentração da nicotina em cada um deles é de 0,8 mg, considerada a maior entre todos os cigarros à venda no mercado nacional. Esta marca foi escolhida porque apresenta a maior concentração

de nicotina disponível, a custos mais baixos que os de outras marcas. O tempo de exposição dos animais foi baseado no tempo preciso para queima completa do cigarro e no tempo necessário para saída de toda a fumaça de dentro da caixa. As três exposições diárias tentaram ocupar as três faixas do dia: manhã, tarde e noite. Nos finais de semana, entretanto, os animais eram expostos uma única vez ao dia à fumaça, assim como à nicotina. A duração de 45 dias foi estabelecida baseada no tempo em que os animais permaneceriam vivos após a cirurgia (30 dias), segundo o modelo original do DMBA, associando-se mais 15 dias de uma exposição prévia para acostumá-los ou ambientá-los à sua nova rotina.

A fumaça do cigarro pode ser considerada de três formas. A fumaça que o fumante recebe através do fumo (na língua inglesa referida como “*mainstream smoke*”), a fumaça exalada pelo próprio fumante e a produzida pela queima da guimba do cigarro. As duas últimas formas estão envolvidas com os fumantes passivos e possuem uma concentração maior de nicotina que a fumaça inalada pelo tabagista. Em inglês elas são conhecidas como “*sidestream smoke*”. (54,56,57).

Não foram encontradas na literatura referências a estudos que expusessem os animais de uma forma conjunta à fumaça de cigarros derivada do “*sidestream smoke*”, assim reproduzindo um ambiente de fumantes, onde o maior stress fosse apenas a presença da fumaça. Por este motivo, nosso modelo de exposição segue sendo singular, sem semelhantes na bibliografia consultada.

Em relação à nicotina, optou-se por não utilizar nenhum de seus metabólitos e obtê-la na concentração de quase 100%, ou seja, praticamente pura, na tentativa de igualá-la à forma existente nos cigarros. A nicotina é o componente de maior concentração nos cigarros (5,16,20,21). Ela é um alcalóide e sofre várias transformações dependentes do metabolismo do receptor onde está sendo aplicada, chegando a compostos com características moleculares e funcionais diferentes (17). São conhecidos alguns dos derivados da nicotina e seus respectivos efeitos nos organismos envolvidos, como um poder altamente carcinogênico sobre o pâncreas, conforme previamente referido na introdução (5,17,22)

Além disso, a nicotina apresenta um importante papel sobre a carcinogênese dos tumores sólidos. É conhecido o fato de que os tumores sólidos necessitam da neovascularização para o seu crescimento e que a nicotina parece acelerar este processo. Alguns receptores moleculares tem sido apontados como facilitadores ou até responsáveis pelo desencadeamento desta cascata de eventos que leva a reprodução e crescimento celular (58,59). Entre eles, aparece o VEGF-r (*Vascular endothelial growth factor receptor*), como importante mediador do desenvolvimento tumoral (56,57,59). Esta avaliação, no entanto, foge do foco deste estudo.

Finalmente, a dose da nicotina utilizada esteve de acordo com o “*Guideline on nicotine dose selection for in vivo reserach*”. Este guia foi publicado recentemente com uma extensa revisão sobre a dose da nicotina e a via de administração

recomendadas para cada tipo de animal de experimentação. No caso do camundongo, a dose recomendada é superior à para ratos porque estes animais tem se mostrado menos sensíveis ao efeito da nicotina do que os ratos. A dose tóxica da nicotina em rato, que pode ser observada a partir do momento em que o animal apresenta convulsões, é de 0,5 a 1 mg/kg , enquanto para o camundongo é de 2 a 6 mg/kg. Além disso, a meia vida da nicotina no camundongo é menor, o que justifica as duas aplicações diárias da droga. Por outro lado, mais de duas aplicações diárias estão implicadas com o aumento do *stress* ao que o animal seria submetido, o que pode ser detectado pela elevação das taxas dos corticosteróides circulantes (60).

CARACTERÍSTICAS GERAIS E HISTOLOGIA DOS GRUPOS

O DMBA produz mutações em oncogenes e genes supressores que acabam induzindo a carcinogênese. A presença do DMBA durante a proliferação celular dificulta a o reparo do DNA alterado (42,43). Neste modelo, o implante de DMBA na cabeça pancreática serviu como estímulo para estas mutações, propiciando o início do processo de transformação maligna. Como foi visto, o trauma cirúrgico isoladamente não foi capaz de produzir lesões malignas ou suas precursoras, já que no grupo *Sham*, além do tecido pancreático normal predominante, apenas foi encontrada uma alteração ductal classificada como hiperplasia, provavelmente em

resposta ao dano tecidual promovido pela confecção da sutura em bolsa e possivelmente servindo como reparo celular.

A reação inflamatória que acompanha os procedimentos cirúrgicos somente foi observada de forma intensa nos grupos expostos à nicotina ou à fumaça do cigarro, principalmente ao redor da sutura que continha os cristais de DMBA. No grupo *Sham*, estes achados foram inexpressivos.

Segundo a literatura, a pancreatite aguda em seres humanos não parece aumentar o risco da neoplasia pancreática (61). Por outro lado, as manifestações de inflamação crônica, como as que ocorrem na pancreatite crônica, devem ser um importante co-fator na transformação neoplásica, visto que pacientes com tal doença são considerados integrantes de um grupo de risco para o desenvolvimento do adenocarcinoma pancreático (62).

A avaliação histológica evidenciou a presença de polimorfonucleares e sinais de edema intersticial nos espécimes de pâncreas derivados do grupo **DMBA-n**, mas como uma manifestação branda, e principalmente localizada ao redor do aglomerado de cristais do DMBA. Os achados de pancreatite crônica no grupo **DMBA-f**, entretanto, foram extremamente intensos e freqüentemente presentes em quase todo o corte de tecido examinado, inclusive nos casos de adenocarcinoma invasor. Mesmo assim, tais lesões não prejudicaram a avaliação histológica.

A fumaça do cigarro produziu uma clara reação inflamatória do tipo crônica no tecido pancreático avaliado, com fibrose intensa, conforme tem sido descrita em estudos atuais que avaliam os efeitos da fumaça nos fumantes passivos. Recentemente, Wittel e seus colaboradores expuseram ratas a uma concentração de 100mg/m³ e 160mg/m³ de suspensão de partículas da fumaça de cigarros, consideradas baixa dose e alta dose, respectivamente. A exposição durou 12 semanas, sendo que, após este período, os autores promoveram uma cuidadosa análise dos achados histológicos, imunohistoquímicos e bioquímicos destes animais. A concentração sérica da cotinina e da nicotina foram avaliados em cada grupo. Entre os grupos, apenas a concentração da cotinina apresentou diferença significativa, sendo maior para aqueles animais expostos à alta dose de suspensão de partículas da fumaça. A alta dose também esteve associada com as alterações histológicas inflamatórias encontradas no pâncreas dos animais. Os animais expostos à baixa dose, entretanto, não apresentaram tais alterações. A conclusão do estudo foi que existem fortes evidências do dano tecidual causado no pâncreas de animais expostos à inalação de fumaça de cigarros devido à ação conjunta de outros carcinógenos próprios do cigarro e não somente da nicotina e cotinina (63).

As lesões intra-epiteliais e o adenocarcinoma pancreático induzidos em camundongos pelo DMBA são do tipo ductal, e podem seguir a mesma classificação para as lesões pancreáticas encontradas em seres humanos, proposta e

apresentada por Hruban e seu colaboradores em 2001 (36). Resta saber como estas lesões se comportaram na presença da nicotina e da fumaça do cigarro.

Aparentemente o grupo **DMBA-f** não acrescentou nenhum dado novo a respeito da promoção da neoplasia pancreática, porque seus achados foram muito próximos aos do grupo **DMBA-exclusivo**, conforme visto na tabela 2. Em ambos os grupos a frequência do diagnóstico NIPan foi de 66,7%. Entretanto, a gravidade das lesões intra-epiteliais no grupo da fumaça foi maior: 40% de NIPan 3 em relação a 12% no grupo **DMBA-exclusivo** (Tabela 3). Além disso, em números absolutos, a contagem total de ocorrências das NIPans foi discretamente maior, com uma concentração em NIPan 2 e 3 (Tabela 4). A ocorrência do adenocarcinoma, contudo foi a mesma em números totais, mas com percentuais diferentes. Apenas 4 casos em cada um destes dois grupos progrediram para o câncer invasivo, representando 13,3% e 16,7% dos casos para o **DMBA-f** e **DMBA-exclusivo**, respectivamente. Talvez exista uma barreira, “assim como a membrana basal”, de forma figurativa, que precisa ser ultrapassada para que a célula neoplásica atinja o interstício e se transforme em uma lesão invasiva. Talvez a maior parte destes animais, ou pelo menos, os 40% que atingiram o NIPan 3 cheguem até este ponto. Remetendo-nos à biologia molecular destas lesões, a análise do *K-ras* demonstra que em aproximadamente 90% dos carcinomas de pâncreas ele está mutado, mas em somente 30% das NIPans 1a. A mutação do p53 está presente em mais de 70% dos carcinomas, expressando-se apenas a partir do NIPan 3, já que é considerada

uma alteração tardia na carcinogênese, assim como ocorre com o BRCA2 e o DPC4 (3-35,37,39).

É de se especular que se o tempo do estudo fosse mais prolongado, os camundongos do **DMBA-f** se deparariam com novas lesões ou as já existentes evoluiriam para lesões mais graves como o adenocarcinoma. Foi exatamente o que aconteceu com o grupo **DMBA-exclusivo** com 60 dias de exposição, descrito no trabalho de Osvaldt e colaboradores (43). Tal grupo apresentou um aumento de 2,26 vezes no número de carcinomas em relação ao grupo de 30 dias, cujos dados estão sendo utilizados para as comparações atuais.

A menor frequência de lesões precursoras no grupo **DMBA-n** (44,4%), quando comparadas apenas as lesões de maior grau entre os grupos, deve-se ao aumento no número absoluto de diagnósticos de adenocarcinoma. O adenocarcinoma esteve presente em 51,9% dos casos de associação entre DMBA e nicotina, e foi o maior valor entre os grupos deste estudo. Tal associação também foi capaz promover uma indução geral de neoplasia do porte de 96,3 pontos percentuais, significando maior entre todos os trabalhos cujo modelo de carcinogênese utilizou o DMBA até o momento. O grupo **DMBA-exclusivo** e o **DMBA-f** apresentaram 83,4% e 80% de neoplasia, respectivamente. A comparação com estudos prévios torna este experimento muito satisfatório em relação aos resultados alcançados. Zehnder

obteve 72%, Z'graggen 77%, Osvaldt, 83,3% e Wendt, 88,23% de indução global de lesões neoplásicas intra-epiteliais e de adenocarcinoma (44-46,64).

Existe uma clara e substancial tendência de piora dos diagnósticos histológicos em relação aos grupos dispostos desta forma: *Sham*, **DMBA-exclusivo**, **DMBA-f** e **DMBA-n**. Os grupos **DMBA-exclusivo** e **DMBA-f**, entretanto apresentam características muito próximas em relação aos achados histológicos, visando somente as alterações neoplásicas referentes aos ductos, inclusive sem demonstrarem significância estatística em suas diferenças quando submetidos à análise (Tabela 5).

MORTALIDADE

O modelo experimental de carcinogênese pancreática em camundongos induzida pelo DMBA associado à exposição de fumaça de cigarro e a aplicações de nicotina subcutânea provou ser capaz de desenvolver a neoplasia invasora e suas lesões precursoras, inclusive com maior frequência destas lesões, com um menor tempo de indução e a custos mais baixo do que os modelos que utilizam ratos, a exemplo dos trabalhos prévios deste mesmo grupo de pesquisadores (45,46). Por outro lado, a mortalidade do experimento tende a ser maior do que nos estudos com ratos, mas mesmo assim, foi considerada aceitável (41-44).

Comparando-se a mortalidades deste trabalho com a descritas por Osvaldt e colaboradores (32,2%) e por Wendt e colaboradores (31,6%), a mortalidade pós-operatória não se afasta muito destes números (45,46). No estudo atual ela foi de 34,90%, eliminando-se os casos de intoxicação direta pela administração de nicotina, que serão comentados a seguir. A única diferença é que estes dois trabalhos acompanharam os animais por um tempo maior que o estudo atual. Os animais eram mortos em 30 e 60 dias após a cirurgia. Neste estudo, todos os animais eram sacrificados no 30° dia de pós-operatório. A causas de morte foram as mesma com exceção às causadas pela nicotina.

Nos trabalhos com modelo de experimentação semelhante, porém com o emprego de ratos ao invés de camundongos, a mortalidade apresentou valores bem distintos. Dissin e colaboradores relataram 18,5% de perdas, enquanto Rivera e seus colaboradores, chegaram a perder 67,3% dos animais (41,42). Em uma de suas pesquisas, o grupo liderado por Z'graggen constatou uma mortalidade em torno de 40% (64). O único estudo em camundongos de Zehnder apresentou mortalidade geral de 17%, porém os dados foram apresentados apenas como preliminares, sob forma de resumo (44). O tempo de duração destes estudos variou muito, entre 4 meses e um ano.

Muito provavelmente se os animais de nosso estudo tivessem sido observados por um tempo maior do que o estabelecido, a mortalidade atingiria valores inaceitáveis. Foi o que aconteceu no trabalho de Osvaldt (45). Os autores foram obrigados a abolir um grupo de animais com morte prevista para 90 dias após a cirurgia, pois transcorridos 60 dias, os animais começavam a falecer e não atingiam o tempo estipulado de 90 dias. Isso tornou inviável a permanência de tal grupo no estudo e fortaleceu a idéia de que neste trabalho os animais não deveriam ser sacrificados após um período superior a 30 dias.

Uma outra questão é a associação da nicotina e da fumaça de cigarro ao modelo original do **DMBA-exclusivo**. Além dos casos de morte instantânea à aplicação de nicotina subcutânea por neurotoxicidade e convulsão, é de se pensar que tais substâncias compartilham de outros efeitos nocivos ao organismo dos animais e por isso devem contribuir com o aumento da mortalidade dos grupos. Se considerado o grupo *Sham*, que não foi exposto a nenhuma das substâncias (**DMBA**, nicotina ou fumaça do cigarro) sua mortalidade também girou em torno de 30%, o que nos remete a uma mortalidade ligada única e exclusivamente ao ato cirúrgico. É certo que este grupo é muito pequeno para que essa afirmação seja aceita, mas, mais uma vez, nota-se uma tendência para estes valores. Já a comparação entre as perdas dos grupos **DMBA-f** e **DMBA-n** se equivalem, sendo de 37,5% e de 33,3%, respectivamente, excluindo-se o efeito imediato da nicotina, como pode ser visto na tabela número 7.

Esta taxa de mortalidade pode ser considerada alta por muitos pesquisadores e por isso limitadora do emprego deste modelo, tendo em vista aspectos éticos que envolvem estudos experimentais em animais (48). Por outro lado, tais valores podem ser justificados devido ao grande porte da cirurgia realizada em relação ao tamanho dos animais. Outra questão é o efeito de massa causado pela implantação do DMBA, que pode comprimir as estruturas vasculares, gerando isquemia dos tecidos adjacentes ou ocasionando obstrução mecânica direta sobre o intestino. A intensa reação inflamatória provocada pelo DMBA com as aderências intestinais conseqüentes é outra causa desta obstrução.

Uma alternativa ao efeito de massa sobre as estruturas vasculares da cabeça pancreática, principalmente sobre os vasos mesentéricos superiores, seria a implantação do DMBA na porção caudal do pâncreas do animal. Contudo, a proximidade com o baço, e o manuseio desta região, provavelmente acabaria ocasionando outras lesões vasculares, com conseqüente hipovolemia ou mesmo isquemia do próprio tecido pancreático.

No caso deste estudo, acrescento a curva de aprendizado para o procedimento cirúrgico, como uma das causas do aumento da mortalidade em decorrência do ato operatório. Como a técnica operatória já havia sido testada nos dois trabalhos anteriores do grupo, e com um número expressivo de animais em um

teste piloto, as perdas pela cirurgia acabaram sendo um pouco menores do que no presente estudo, cujo treinamento foi apenas em 3 animais, conforme julgamento inicial. Em se tratando de um procedimento delicado, com técnica de microcirurgia, faz-se obrigatoriamente necessária a adequação das habilidades existentes ou aquisição de novas para obtenção de êxito e conseqüente diminuição das complicações peri-operatórias. Estas considerações derivam da observação pessoal durante o decorrer do trabalho, pois à medida que novos animais ingressavam no estudo, suas cirurgias eram realizadas com mais sucesso e destreza, além do que os animais que foram introduzidos mais tarde no experimento morreram menos do que os que entraram no início do estudo. Tais dados, entretanto não foram submetidos à análise estatística.

A mortalidade pré-operatória foi considerada separada, em virtude de sua pouca importância na conclusão dos reais fatores que causaram as mortes dos animais decorrentes do modelo experimental em si. Mais uma vez, destaca-se o efeito neurotóxico da nicotina, associado a um erro de alojamento dos animais. Sabe-se que camundongos machos provenientes de ninhadas diferentes competem entre si, e podem levar seus companheiros de gaiola até a morte. Foi o que aconteceu. Por um erro e desconhecimento deste fato, juntaram-se duas ninhadas diferentes em uma mesma gaiola, o que ocasionou a perda de 3 animais.

Quanto à neurotoxicidade da nicotina, seu efeito avassalador foi controlado a partir do momento em que se modificou a diluição originalmente programada. Na primeira diluição, a margem de erro para um efeito tóxico era muito pequena. A solução estava mais concentrada com o intuito de diminuir o volume total a ser infundido no subcutâneo do animal, atenuando o desconforto sentido por estes no momento das injeções, em se tratando de 2 aplicações diárias por um período de 45 dias. Desta forma, por menor que fosse a alteração na dose a ser administrada (e neste caso está se falando de alterações do porte 0,01ml) a superdosagem era facilmente alcançada, ocasionando convulsão e morte do animal no mesmo instante. Mesmo após ter sido modificada a diluição, ocorreram outros casos isolados de convulsão e morte súbita, o que reflete o alto grau de toxicidade desta substância. Talvez a diluição empregada não devesse respeitar de forma tão rígida a constância de um volume tão pequeno, visando diminuir tais perdas. A associação de um anestésico local poderia suavizar a dor, mas suas implicações na absorção da nicotina ainda não foram determinadas.

A técnica anestésica empregada não contribuiu com nenhuma perda de animais. Nenhum acidente de punção de órgão intra-abdominal foi associado a este procedimento, nem foram evidenciados efeitos indesejáveis de sua aplicação. Esta técnica foi capaz de proporcionar um bloqueio anestésico geral durante toda a cirurgia, além de uma adequada analgesia no pós-operatório imediato. Em poucos

casos foi necessária uma dose complementar de anestésico no trans-operatório, o que não parece ter sido prejudicial ao animal.

OUTRAS REFLEXÕES

Prokopczyk e colaboradores acompanharam 22 pacientes do Departamento de Cirurgia da Universidade de Ulm na Alemanha que apresentavam doenças pancreáticas cirúrgicas e determinaram quais eram os fumantes, através da concentração das nitrosaminas específicas do tabaco no suco pancreático. O nível de NNK no suco pancreático de fumantes foi superior ao dos não fumantes. A NNAL esteve presente no suco pancreático em 57% dos casos de fumantes e em 33% do caso dos que não fumavam. Os autores concluíram que a exposição ao tabaco propicia o acúmulo de seus metabólitos no pâncreas e que isso pode estar associado com a carcinogênese deste órgão (65). Nosso estudo foi todo baseado nas alterações dos ductos pancreáticos, os responsáveis pela produção e excreção do suco pancreático. A questão é, se os derivados do cigarro ou da nicotina ao mesmo tempo em que produzem alterações capazes de modificar a estrutura destes ductos, inclusive gerando lesões malignas, são excretados pelo suco pancreático e detectáveis, por que então é relatado um tão baixo rendimento das coletas de células destes mesmos ductos pancreáticos obtidas através de exames

endoscópicos na busca de um diagnóstico citológico? Talvez a biologia molecular associada ao estudo da carcinogênese possa melhorar este cenário.

O conceito de que a carcinogênese envolve um fenômeno com várias etapas e que é acompanhado por múltiplas funções ou disfunções do organismo é mundialmente aceito e embasado por inúmeros estudos experimentais (57). Seria pretensão demasiada tentar formular novas teorias com os resultados apenas deste trabalho sobre o real valor da nicotina nas alterações pancreáticas. Nesse sentido, a discussão deste trabalho concentrou-se em apresentar os achados histológicos deste modelo, focando-se nas lesões intra-epiteliais e no adenocarcinoma pancreático, propondo algumas interpretações para tais achados. Ao mesmo tempo, provou que este modelo é reprodutível, capaz de acelerar os resultados e útil na busca de outras respostas sobre o adenocarcinoma pancreático, como o estudo da genética tumoral através da detecção das possíveis alterações genéticas e moleculares existentes, além de servir como modelo para avaliação de protetores ou inibidores da neoplasia, devido a alta incidência apresentada. A exemplo de Z'graggen cujas investigações resultaram uma incidência 50% de mutação no *K-ras* nas NIPans (que ele ainda chamava de displasia e carcinoma in situ) e de 91% nos carcinomas de ratos, o mesmo deve ser feito com os camundongos deste modelo (64).

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O modelo experimental de indução da carcinogênese pancreática pelo DMBA em camundongos com a associação da nicotina injetável e com a fumaça do cigarro é capaz de reproduzir as lesões neoplásicas intra-epiteliais e o adenocarcinoma pancreático. Proporciona o estudo das mesmas enquadrando-se na nova classificação das neoplasias ductais intra-epiteliais e invasoras do pâncreas.

A nicotina subcutânea demonstrou poder como agente promotor das lesões intra-epiteliais e do adenocarcinoma no modelo de carcinogênese pancreática induzido em camundongos pelo DMBA.

A inalação de fumaça de cigarro pelos animais neste modelo não está relacionada ao aumento da frequência do adenocarcinoma pancreático e de suas lesões precursoras, entretanto, estas últimas são de maior gravidade do que as encontradas no modelo de **DMBA-exclusivo**.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Este trabalho descreveu os achados histológicos do adenocarcinoma pancreático e de suas lesões precursoras em camundongos submetidos a indução pelo DMBA associado a duas formas diferentes de utilização da nicotina. Optou-se pela confecção de um modelo que reproduzisse os efeitos de um dos fatores de risco de maior importância para o adenocarcinoma: o cigarro e seus componentes. Ele foi capaz de desenvolver as lesões desejadas com resultados considerados excelentes pelos autores. Possivelmente sirva para o estudo de fatores protetores.

Além disso, a análise molecular das lesões desenvolvidas emerge como uma medida imperativa e deve ser buscada o mais breve possível. Tentativas neste sentido já foram iniciadas, mas ainda não se dispõe de resultados que possam ser apresentados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS (66)

1. Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL. Pancreatic cancer: state - of - the - art care. *Cancer J Clin.* 2000; 50: 241-68.
2. Kleef J, Friess H, Berberat PO, Martignoni ME, Z'graggen K, Büchler MW. Pancreatic cancer - new aspects of molecular biology research. *Swiss Surg.* 2000;6:231-4.
3. Thompson BN, Banting SW, Gibbs P. Pancreatic cancer - current management. *Aust Fam Physician.* 2006;35:212-7.
4. Wood HE, Gupta S, Kang JY, Quinn MJ, Maxwell JD, Mudan S, et al. Pancreatic cancer in England and Wales 1975-2000: patterns and trends in incidence, survival and mortality. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006; 23: 1205-14.
5. Chowdhury P, MacLeod S, Udupa KB, Rayford PL. Pathophysiological effects of nicotine on the pancreas: an update. *Exp Biol Med (Maywood).* 2002;227:445-54.
6. Informações de Saúde: Mortalidade Brasil. MS/SVS/DASIS - Sistema de informações sobre mortalidade – SIM; atualizada em 2003. Último acesso em 30 de março de 2006. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obtuf.def>.
7. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet.* 2004; 27:1049-57.

8. Yeo CJ. Pancreatic cancer: 1998 update. *J Am Coll Surg.* 1998;187:429-442.
9. Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Koniaris L, Causal S, Abrams RA, et al. Resected adenocarcinoma of the pancreas- 616 patients: results, outcomes and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg.* 2000; 4: 567-79.
10. Farnell MB, Nagorney DM, Sarr MG. The Mayo Clinic approach to the surgical treatment of adenocarcinoma of the pancreas. *Surg Clin North Am.* 2001; 81: 611-23.
11. Raraty MGT, Magee CJ, Ghaneh P, Neoptolemos JP. New Techniques and agents in adjuvant therapy of pancreatic cancer. *Acta Oncol.* 2002; 41:582-95.
12. Laheru D, Yeo CJ. Role of adjuvant therapy in the management of pancreatic cancer. *Adv Surg.* 2005;39:223-44.
13. Xie DR, Liang HL, Wang Y, Guo SS. Meta-analysis of inoperable pancreatic cancer: gemcitabine combined with cisplatin versus gemcitabine alone. *Chin J Dig Dis.* 2006;7:49-54
14. Lowenfels AB, Maisonneuve P. Environmental factors and risk of pancreatic cancer. *Pancreatol.* 2003;3:1-7.
15. Heuch I, Kvale G, Jacobsen BK, Bjelke E. Use of alcohol, tobacco and coffee, and risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 1983; 48:637-43

16. Fuchs CS, Colditz GA, Stampfer MJ, Giovannucci EL, Hunter DJ, Rimm EB, et al. A Prospective Study of Cigarette Smoking and the risk of pancreatic cancer. *Arch Inter Med.* 1996;156:2255-60.
17. Chowdhury P, Rayford PL. Smoking and pancreatic disorders. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2000;12:869-87.
18. Boyle P, Maisonneuve P, Bueno DM, Ghadirian P, Howe GR, Zatonski W, et al. Cigarette smoking and pancreas cancer: a case control study of the search programme of the IARC. *Int J Cancer.* 1996;67:63-71.
19. Chiu BC, Lynch CF, Cerhan JR, Cantor KP. Cigarette smoking and risk of bladder, pancreas, kidney and colorectal cancer in Iowa. *Ann Epidemiol.* 2001;11:28-37
20. Gallicchio L, Kouzis A, Genkinger JM, Burke AE, Hofman SC, Diener-West M, et al. Active cigarette smoking, household passive smoke exposure and the risk of developing pancreatic cancer. *Prev Med.* 2006;42: 200-5
21. Rayford PL. Alcohol, tobacco (nicotine) and pancreatic pathophysiology. *J Assoc Acad Minor Phys.* 2001;12:91-4.
22. Hecht SS, Peterson LA, Spratt TE. Tobacco-specific nitrosamines. *IARC Sci Publ.* 1994;125:91-106.
23. Hecht SS. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem Res Toxicol.* 1998;11:559-603.

24. Askari MDF, Tsao MS, Schuller HM. The tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone stimulates proliferation of immortalized human pancreatic duct epithelia through β -adrenergic transactivation of EGF receptors. *J cancer Res Clin Oncol*. 2005;131:639-48.
25. Askari MDF, Tsao MS, Cekanova M, Schuller HM. Ethanol and the tobacco-specific carcinogen, NNK, contribute to signaling in immortalized human pancreatic duct epithelial cells. *Pancreas*. 2006;33:53-62.
26. Simon B, Printz H. Epidemiologic trends in pancreatic neoplasias. *Dig dis*. 2001;19:6-14.
27. Yeo TP, Hruban RH, Leach SD, Wilentz RE, Sohn TA, Kern SE, et al. Pancreatic cancer. *Curr Probl Cancer* 2002;26:176-275.
28. Jimeno A, Hidalgo M. Molecular biomarkers: their increasing role in diagnosis, characterization and therapy guide in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:787-96.
29. Gold JS, Dematteo RP. Combined surgical and molecular therapy: the gastrointestinal stromal tumor model. *Ann Surg*. 2006;244:176-84.
30. Morabito A, De Maio E, Di Maio M, Normanno N, Perrone F. Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions. *Oncologist*. 2006;11:753-64.

31. Xin W, Yun KJ, Ricci F, Zahurak M, Qiu W, Su GH, et al. MAP2K4/MKK4 Expression in Pancreatic Cancer: Genetic Validation in Immunohistochemistry and Relationship to Disease Course. *Clin Can Research* 2004;10:8516-20.
32. Manu M, Buckels J, Bramhall S. Molecular technology and pancreatic cancer. *Br J Surg*. 2000;87: 840-53.
33. Mangray S, King TC. Molecular pathobiology of pancreatic adenocarcinoma. *Front Biosci*. 1998;15:1148-60.
34. Hruban RH, Wilentz RE, Kern SE. Genetic progression in pancreatic ducts. *Am J Pathol*. 2000;156:1821-25
35. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2000;6:2969-72
36. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol*. 2001;25:579-86.
37. Hruban RH. An illustrated consensus of the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol*. 2004;28:977-87

38. Andea A, Sarkar F, Adsay VN. Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2003;16:996-1006.
39. Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, et al. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol.* 2003;16:902-12.
40. Rao, MS. Animal models of exocrine pancreatic carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1987;6(4):665-76.
41. Dissin J, Mills LR, Mains DL, Black OJr, Webster PD 3rd. Experimental induction of pancreatic adenocarcinoma in rats. *J Natl Cancer Inst.* 1975;55:857-64.
42. Rivera JA, Graeme-Cook F, Werner J, Z'graggen K, Rustgi AK, Rattner DW, et al. A rat model of pancreatic ductal adenocarcinoma: targeting chemical carcinogens. *Surgery.* 1997;122:82-90.
43. Jimenez RE, Z'graggen K, Hartwing W, Graeme-Cook F, Warshaw AL, Fernandez del-Castilho C. Immunohistochemical characterization of pancreatic tumors induced by dimethylbenzanthracene in rats. *Am J Pathol.* 1999;154:1223-9.

44. Zehnder P, Z'graggen K, Ozawa F, Mazzucchelli L, Büchler MW. First description of a carcinogen induced mouse model of ductal pancreatic adenocarcinoma: dimethylbenzanthraceno induces ductal adenocarcinoma of the pancreas in a dysplasia-carcinoma type sequence. *HPB Surg.* 2000;2:124.
45. Osvaldt AB, Rohde L, Edelweiss MI. Modelo experimental de lesões intra-epiteliais de adenocarcinoma pancreático induzidos por 7,12-dimetilbenzantraceno em camundongos. Tese de doutorado. Porto Alegre (RS). Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004. *Surgery 2006. In Press.*
46. Wendt LR, Rohde L, Edelweiss MI. Avaliação do efeito do álcool etílico e da cafeína na carcinogênese pancreática induzida por 7,12-dimetilbenzantraceno em camundongos. Tese de doutorado. Porto Alegre (RS). Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.
47. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Intitute of Health, 1985 Commission on Life Sciences National Research Council, 1996:322.
48. Raymundo MM, Goldim JR. Pesquisa em modelos animais 2003. Último acesso em 28 de agosto 2006. Disponível em: <http://www.bioetica.ufrgs.br>
49. Wagner JE, Harkness JE. Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores. 3 ed. São Paulo: Rocca; 1993.

50. Hruban RH, Wilentz RE. Pancreas em Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Kumar: Robbins and Cotran: pathologic basis of disease, 7th ed., 2005 Saunders, an imprint of Elsevier. Último acesso em 28 de agosto de 2006. Disponível em: <http://home.mdconsult.com/das/book/body/0/1249/I752.fig?printing=true>
51. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Klimstra D, Klöppel G, et al. New nomenclature for classification of duct lesions in the pancreas. Último acesso em 3 de agosto de 2006. Disponível em: http://pathology.jhu.edu/n.web?EP=N&FL=PANCREAS_PANIN
52. Chen H, Vlahos R, Bozinovski S, Jones J, Anderson GP, Morris M. Effect of short-term cigarette smoke exposure on body weight, appetite and brain neuropeptide Y in mice. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30:713-9.
53. Witschi H, Espiritu I, Dance ST, Miller MS. A mouse lung tumor model of tobacco smoke carcinogenesis. *Toxicol sci*. 2002;68:322-30.
54. Mauderly JL, Gigliotti AP, Barr EB, Bechtold WE, Belinsky SA, Hahn FF, et al. Chronic inhalation exposure to mainstream cigarette smoke increases lung and nasal tumor incidence in rats. *Toxicol sci*. 2004;81:280-92.
55. Hecht SS. Carcinogenicity studies of inhaled cigarette smoke in laboratory animal: old and new. *Carcinogenesis*. 2005;26:1488-92.
56. Zhu B, Heeschen C, Sievers RE, Karliner JS, Parmley WW, Glantz SA, et al. Second hand smoke stimulates tumor angiogenesis and growth. *Cancer Cell*. 2003; 4:191-5.

57. Gazdar AF. Environmental tobacco smoke, carcinogenesis and angiogenesis. A double Whammy? *Cancer Cell*. 2003;4:159-60
58. Shin VY, Wu WKK, Ye YN, So WHL, Koo MWL, Liu ESL, et al. Nicotine promotes gastric tumor growth and neovascularization by activating extracellular signal-regulated kinase and cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis*. 2004;25:2487-95
59. Ye YN, Liu ESL, Shin VY, Wu WK, Cho CH. The modulating role of nuclear factor-kappaB in the action of alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and cross-talk between 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in colon cancer growth induced by 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;311:123-30.
60. Matta SG, Balfour DJ, Benowitz NL, Boyd RT, Buccafusco JJ, Caggiula AR, et al. Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology*. 2006;9. *In press*.
61. Balthazar EJ. Pancreatitis associated with pancreatic carcinoma. *Pancreatology*. 2005;5:330-44.
62. Malfertheiner P, Schutte K. Smoking-a trigger for chronic inflammation and cancer development in the pancreas. *AM J Gastroenterol* 2006;101:160-2

63. Wittel UA, Pandey KK, Adrianifahanana M, Johansson SL, Cullen DM, Akhter MP, Brand RE, Prokopczyk B, Batra SK. Chronic pancreatic inflammation induced by environmental tobacco smoke inhalation in rats. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:148-59.
64. Z'graggen K, Warshaw AL, Werner J, Graeme-Cook F, Jimenez RE, Fernandez-Del Castillo C. Promoting effect of a high-fat/high-protein diet in DMBA-induced ductal pancreatic cancer in rats. *Ann Surg.* 2001;233:688-95.
65. Prokopczyk B, Hoffmann D, Bologna M, Cunningham AJ, Trushin N, Shobha A, et al. Identification of tobacco-derived compounds in human pancreatic juice. *Chem Res Toxicol.* 2002;15:677-85.
66. International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication. Updated February 2006. Disponível em www.icmje.org. Último acesso em março de 2006.