

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ALTERAÇÕES CELULARES EM FÍGADO E PULMÃO DE CAMUNDONGOS
TRATADOS COM DIMETILNITROSAMINA

MARIO GRACCHO JUNIOR

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do grau de Mestre

Orientador: Prof. Dr. BENEDICTO DE CAMPOS VIDAL

CAMPINAS - 1980

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais,

ã minha mulher Elizete

e ao meu irmão Ricardo,

companheiros de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal. Sua orientação segura, estímulo constante e entusiasmo pela atividade científica permitiram a realização deste trabalho.

À Profa. Maria Helena Lambert, por todo apoio recebido desde o meu ingresso no magistério superior.

Ao profissional Ronaldo Bastos Francini, pelo competente serviço de processamento das fotos.

À minha mulher Elizete por ter dactilografado todo o manuscrito.

Aos professores, colegas, técnicos e funcionários do Depto. de Biologia Celular da UNICAMP, pelo auxílio, amizade e apoio a mim dedicados.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para que esta contribuição científica se tornasse realidade.

ÍNDICE GERAL

	Página
I - INTRODUÇÃO.....	6
II -MATERIAL E MÉTODOS.....	14
1. Administração do agente carcinogênico.....	14
2. Preparados histológicos.....	15
3. Preparação para estudos nucleares.....	15
3.1. Decalques.....	16
3.2. Reação de Feulgen.....	16
3.3. Coloração com azul de toluidina.....	17
4. Citofotometria.....	18
III-RESULTADOS.....	23
1. Considerações gerais.....	23
2. Aspectos clínicos.....	23
3. Histopatologia e citopatologia do fígado.....	24
3.1. Análise macroscópica.....	24
3.2. Análise histológica.....	25
3.3. Análise dos núcleos de hepatócitos em decalques corados com Feulgen.....	29
3.4. Análise dos núcleos de hepatócitos em decalques corados com azul de toluidina.....	34
4. Citofotometria dos núcleos de hepatócitos.....	35
5. Histopatologia e citopatologia pulmonares.....	41
6. Citofotometria dos núcleos dos tumores pulmonares.....	47
IV- DISCUSSÃO.....	51

	Página
1. Citopatologia do fígado.....	51
1.1. Alterações no citoplasma dos hepatócitos.....	51
1.2. Aumento no volume de núcleos e nucléolos dos hepatócitos.....	52
1.3. Descompactação dos cromocentros.....	53
2. Alterações na constituição das classes de ploidia do fígado.....	57
3. Resumo das alterações hepáticas encontradas.....	59
4. Tumores pulmonares.....	60
4.1. Origem e morfologia dos tumores pulmonares.....	60
4.2. Aspectos etiológicos e bioquímicos da produ- ção de tumores pulmonares.....	61
4.3. Análise citofotométrica dos tumores pulmonares Conceito de " stem line cells "	64
V - CONCLUSÃO.....	67
VI - SUMÁRIO.....	68
VII- SUMMARY.....	70
VIII-BIBLIOGRAFIA.....	71

I - INTRODUÇÃO

Um dos problemas centrais da biologia do câncer é detectar as primeiras alterações que levam uma célula normal a transformar-se em célula cancerosa.

Sob este aspecto, o estudo da carcinogênese química experimental pode oferecer consideráveis contribuições para o esclarecimento da questão. Trabalhando sob condições experimentais rigidamente controladas pode-se, no caso da indução de câncer por substâncias químicas, acompanhar as alterações precoces provocadas pelo agente carcinogênico tanto a nível molecular, como a nível celular ou tecidual.

Dentre as substâncias químicas causadoras de câncer, as nitrosaminas aparecem com destaque. Entre elas encontram-se os mais diversos tipos de agentes carcinogênicos capazes de produzir tumores malignos (Lijinsky et al, 1974).

A ação carcinogênica da dimetilnitrosamina (fig. 1), um solvente de uso industrial, foi demonstrada pela primeira vez por Magee e Barnes em 1956 (Burdette, 1970).

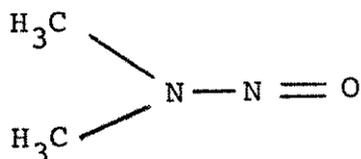


Figura 1. Dimetilnitrosamina (DMN)

Neste experimento pioneiro, vinte ratos (dez machos e dez fêmeas) receberam DMN misturada à ração, numa quantidade equivalente a 50 partes por milhão (50 ppm). Entre a 26ª e a 40ª semana desse tratamento, dezenove animais desenvolveram tumores hepá-

ticos primários, com metástases em sete casos, sendo quatro pulmonares e as restantes intra-abdominais (Magee e Barnes, 1965).

Uma vez comprovado o alto poder de indução de tumores pela DMN, surgiram inúmeras pesquisas de caráter bioquímico, com o escopo de se chegar ao mecanismo molecular último, pelo qual essa droga provoca a oncogênese.

Parece estar bem estabelecido que a ação carcinogênica da DMN se faz por meio de sua conversão em intermediários metabólicos que provocam a alquilação do DNA (Pegg e Hui, 1978).

As metilações em bases nitrogenadas são importantes, especialmente quando ocorrem em regiões de pareamento pois, neste caso, tais metilações podem levar a erros de pareamento durante a replicação do DNA.

De fato, pois desses produtos, 3- metilcitosina e 0-6-metilguanina mostraram-se capazes de produzir erros de pareamento " in vitro " (O'Connor et al, 1975).

Pesquisas recentes indicam que a formação de 0-6-metilguanina deve ser um dos passos fundamentais na indução de câncer por agentes metilantes (Pegg e Hui, 1978).

A metilação na posição 0-6 da guanina pode bloquear o pareamento com a citosina e causar em seu lugar, a incorporação de timina. Esse potencial mutagênico foi demonstrado em experimentos " in vitro " usando-se RNA polimerase RNA - dependente e um molde contendo 0-6-metilguanina. Houve a incorporação de uracila, uma base análoga da timina, ao produto (Margison et al, 1976).

Assim sendo, imagina-se que as mutações sucessivas provocadas por agentes alquilantes, a nível de DNA, levam uma célula normal a transformar-se em uma célula cancerosa.

Tal hipótese acha-se em sintonia com a teoria da mutação somática de origem do câncer. Os proponentes dessa teoria acredi

tam que, em geral, são necessárias várias mutações somáticas para se chegar a uma célula cancerosa. Tais mutações devem afetar principalmente os mecanismos de diferenciação e de controle da divisão celular.

Isto explicaria por que pequenas doses do agente carcinogênico, administradas durante um longo período de tempo, terminam por produzir o câncer.

Por outro lado, temos que levar em conta também, a formação de metilfosfotriésteres. Eles representam 10% dos produtos de metilação isolados do DNA hepático, após tratamento com DMN (O' Connor et al, 1975).

Embora a esterificação dos resíduos de fosfato não interfira diretamente com a formação das pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, há, no caso, outras implicações importantes.

A formação de metilfosfotriésteres no DNA neutraliza a carga negativa dos resíduos de fosfato ao longo da dupla hélice. Dessa maneira, é possível que a formação de inúmeros fosfotriésteres interfira com a ligação das nucleoproteínas à hélice de DNA. Como consequência, a expressão gênica nessas regiões pode ser afetada. Da mesma forma podem ser afetados processos enzimáticos que se movam sequencialmente ao longo da dupla hélice (O'Connor et al, 1975).

Schoental (1973) desenvolveu uma hipótese alternativa para tentar explicar a produção de câncer pelas dialquilnitrosaminas, sem recorrer aos mecanismos de alquilação do DNA.

Ele sugere que certos produtos metabólicos, resultantes da oxidação das alquilnitrosaminas, seriam capazes de estabelecer ligações irreversíveis entre o DNA e as proteínas a ele associadas. Tais ligações, irreparáveis e duradouras, afetariam a expressão gênica, com consequências danosas para a célula.

A presença dessas ligações explicaria, de certa forma, porque certos agentes carcinogênicos são capazes de produzir tumores com a aplicação de uma única dose, e após um longo período de latência.

Por outro lado passou-se à procura dessa droga no meio ambiente do homem, já que, a sua presença, mesmo em pequenas proporções, pode ser considerada de alto risco. Tal procura é salientada, por exemplo, por trabalhos revelando a presença de DMN em bebidas fermentadas (Bassir e Maduagwu, 1978), no " bacon " frito (Gray et al, 1978 e Wasserman et al, 1978), na farinha de areneque (Hurst 1976), no solo (Mills e Alexander, 1976 e Pancholy, 1978), na atmosfera (Dushutin e Sopach, 1976) e na saliva humana (Tannenbaum, 1978). Mais recentemente, inclusive, Fagen e Carson detectaram a presença de nitrosomorfolina e dimetilnitrosamina no ar de indústrias de borracha, correlacionando tal fato com o aumento da incidência de cânceres pulmonares e gastrointestinais nos operários procedentes das áreas contaminadas (Fagen e Carson, 1979).

Existe pois, não só interesse e atualidade nessas pesquisas mas, principalmente, uma grande soma de conhecimentos já publicados que poderão dar apoio consistente, aos objetivos do presente trabalho.

O hepatócito torna-se uma célula adequada como modelo para determinados estudos de oncogênese, particularmente o hepatócito de camundongo, sobre o qual tem-se grande acervo de informações. Entre tais informações, queremos destacar as referentes à composição e estrutura de sua cromatina, e aquelas que dizem respeito ao processo de poliploidização.

Os núcleos de hepatócitos de camundongo mostram, quando corados com a reação de Feulgen, a presença de pequenos blocos hete-

rocromáticos, intensamente corados, denominados cromocentros. Os mesmos se destacam da cromatina restante, menos corada, relativamente homogênea e uniforme. Eles se distribuem uniformemente pelo núcleo, isto é, sem uma concentração predominante numa única região nuclear. Quanto maior o núcleo, maior é o número de cromocentros no seu interior.

Hoje sabemos que os cromocentros são, na realidade, massas de heterocromatina constitutiva. Heterocromatina constitutiva é aquela que se localiza em regiões correspondentes de ambos os cromossomos homólogos. Admite-se ainda que as heterocromatinas constitutivas sejam, com predominância, inertes geneticamente; isto é, não codifiquem para RNAs mensageiros (Mello, 1978).

Experimentos de hibridização " in situ " mostram que a heterocromatina que forma os cromocentros, corresponde à heterocromatina centromérica detectada nos cromossomos metafásicos do camundongo. Ou, em outras palavras, no núcleo interfásico as regiões centroméricas dos cromossomos estão, na sua maioria, formando os cromocentros (Pardue e Gall, 1970).

O DNA que constitui essa heterocromatina é, basicamente, um DNA satélite que representa acima de 70% do DNA satélite total do genoma do camundongo. Esse DNA satélite por sua vez, é rico em pares A-T (razão A+T/G+C igual a 2,03), e acredita-se que ele seja constituído por sequências altamente repetitivas de polinucleotídeos (Yasmineh e Yunis, 1970).

Atribui-se atualmente às heterocromatinas constitutivas funções tais como: manutenção da organização nuclear, proteção de regiões vitais do genoma, participação em mecanismos de pareamento na meiose e favorecimento da especiação no transcurso de processos evolutivos (Yunis e Yasmineh, 1971).

Muller (1966) descreve, a partir de experimentos onde ca

mundongos foram tratados com tioacetamida e nitrosomorfolina, a descompactação da heterocromatina dos hepatócitos e modificações' no conteúdo de DNA dos mesmos. Torna-se importante obter-se a repetição de tais eventos experimentais, utilizando-se no presente trabalho, a dimetilnitrosamina e, por outro lado, detectar-se as modificações iniciais da morfologia nuclear, especialmente no que se refere às particularidades da estrutura cromatínica, tal como é vista pela reação de Feulgen.

Como sabemos, as modificações do fenótipo nuclear são de grande valia para o diagnóstico citológico da célula tumoral. Termos como hiperchromismo, hipochromismo, atipia e polimorfismo nucleares são comumente usados na descrição da célula tumoral.

Atualmente, com o advento da citofotometria de varredura acoplada a sistemas de computação, novas perspectivas se abrem para o diagnóstico citopatológico. A partir de imagens digitalizadas de núcleos e com auxílio de descritores matemáticos, podemos detectar alterações nucleares muito mais discretas do que as percebidas pelo olho humano junto à lente do microscópio (Vidal et al, 1973).

Além do mais, técnicas modernas microfluorométricas de determinação de DNA vêm permitindo a detecção de variações desse ácido nucleico, não só dentro do ciclo celular (Vidal e Pimentel 1979); mas principalmente em populações de células suspeitas de serem pré-neoplásicas, o que é de importância para o diagnóstico precoce (Andreeff, 1975 e Kiefer e Sandritter, 1976).

Há que se considerar ainda, o fato da microespectrofotometria ser uma excelente ferramenta de trabalho em investigações citogenéticas de tumores. Neste particular, dados referentes ao aparecimento de " stem line cells " num tumor podem ser obtidos a partir de medições em núcleos interfásicos. A distribuição do con

teúdo de DNA de amostras de células tumorais mostram, usualmente, uma moda proeminente cuja posição pode variar, dependendo das modificações cromossômicas ocorridas nas células malignas (Atkin , 1969).

O parênquima hepático de muitos mamíferos adultos, entre eles o camundongo, é constituído por células que diferem no seu conteúdo de DNA. No animal recém-nascido temos basicamente uma população de células diplóides ($2n$) que são precursoras de todas as séries seguintes ($4n$, $8n$, $16n$ etc). Assim, em cada período de vida do animal temos uma certa porcentagem de células diplóides, tetraplóides etc, que é característica para aquela idade (Brodsky e Uryvaeva, 1977).

Valendo-se da citofotometria pode-se determinar o conteúdo de DNA dos núcleos hepáticos nos vários estágios do processo de poliploidização. A distribuição dos valores de DNA num histograma permite que se visualize as diversas classes de ploidia presentes naquele período de desenvolvimento do animal. Comparando - se histogramas de animais tratados com histogramas de animais não tratados (grupo controle), obteremos informações a respeito de como a DMN pode afetar a constituição das classes de ploidia no fígado de camundongo. É importante frizar que tal comparação só tem sentido entre animais da mesma idade.

Embora o nosso alvo seja a cancerogênese hepática não devemos descartar a possibilidade da formação de tumores primários em outros órgãos que não o fígado. As nitrosaminas são capazes de provocar cânceres nos mais diversos órgãos e tecidos de várias espécies animais, como indica a extensa revisão sobre o assunto feita por Magee e Shoental (1964).

As respostas para um mesmo agente carcinogênico podem ser variadas dependendo do animal utilizado, da dose, do período de

tratamento e do estado fisiológico do órgão (Lijinsky et al, 1974). Assim sendo, deveremos estar atentos à formação de tumores em outros órgãos além do fígado. A esse respeito vale a pena lembrar que as nitrosaminas vêm se mostrando capazes de induzir cânceres nas vias respiratórias, independentemente do modo como são administradas (Nettesheim e Schreiber, 1975).

Com base no que foi dito até agora, estabelecemos como objetivos fundamentais de nosso trabalho, os seguintes:

1. Estudar as alterações provocadas pela DMN na cromatina dos hepatócitos, principalmente no que se refere à estrutura e organização dos cromocentros. Nesse sentido, estamos particularmente interessados em detectar modificações precoces do fenótipo nuclear, modificações que possam ser relacionadas com um estado de pré-cancerização do tecido.

2. Verificar se a DMN altera os padrões de distribuição dos valores Feulgen-DNA dos núcleos hepáticos.

3. Atentar para a formação de tumores malignos primários em outros órgãos e tecidos que não o fígado, principalmente no pulmão. Em casos positivos passar à análise de tais neoplasias, inclusive a nível de citofotometria, se tal procedimento for viável.

II - MATERIAL E MÉTODOS

1. Administração do agente carcinogênico

Foram utilizados, no total, 126 camundongos, assim divididos:

a) Machos: 15 animais no grupo controle e 42 animais para tratamento.

b) Fêmeas: 20 animais no grupo controle e 49 animais para tratamento.

Todos os camundongos tinham entre cinco e seis semanas de idade, por ocasião do início do tratamento. Portanto, a defasagem de idade entre o mais novo e o mais velho, era de apenas uma semana. Para os nossos propósitos, podemos considerá-los como sendo todos da mesma idade.

Eles foram mantidos em gaiolas plásticas, num número de cinco em cada gaiola; com separação de sexos para evitar acasalamento.

Dimetilnitrosamina de fabricação Merk foi oferecida " ad libitum ", na água de beber, com a seguinte concentração:

a) 17 ppm (partes por milhão) - durante o primeiro mês de tratamento.

b) 10,6 ppm (partes por milhão) - durante os cinco meses restantes de tratamento.

Preparou-se inicialmente uma solução-mãe de DMN a 1% (1,0 ml de DMN para 99,0 ml de água destilada). Tal solução foi mantida em frasco escuro, no refrigerador, a 5º C: A partir da diluição

da mesma, obtinha-se a concentração adequada para fornecimento aos animais. Não houve por parte desses, em nenhum momento do tratamento, rejeição à droga.

2. Preparados histológicos.

Após uma morte rápida por inalação de éter, os animais eram sangrados na altura do pescoço, passando-se a seguir para a necrópsia e fixação dos órgãos que nos interessavam.

A fixação das peças (de no máximo 2,0 mm de espessura) se fez em formol fisiológico 10% a pH 7,4 durante 24 horas no refrigerador.

Solução fixadora:

Formaldeído a 40%..... 10 ml

Água destilada..... 90 ml

Cloreto de Sódio..... 0,9 g

Acertar o pH para 7,4 com NaOH

Os pulmões, em particular, foram fixados sob vácuo para uma melhor penetração do fixador.

Após fixação, desidratação e diafanização, as peças foram incluídas em parafina e cortadas numa espessura de 7 um. Os cortes assim obtidos foram corados com hematoxilina (de Ehrlich) - eosina e montados em bálsamo do Canadá.

3. Preparação para estudos nucleares.

3.1. Decalques .

Esta técnica permite a obtenção de núcleos isolados ao longo de uma lâmina de vidro. Os seus passos fundamentais são os seguintes:

a) Com uma gilete nova obtém-se superfícies de corte planas e uniformes do fígado (ou de outro órgão se for o caso).

b) Segurando-se o fragmento com uma pinça, a superfície a ser encostada na lâmina é rapidamente secada em papel de filtro , eliminando-se assim o excesso de sangue.

c) Ainda com o auxílio de uma pinça, encostamos a superfície do fragmento junto à lâmina de vidro, em toques delicados e sucessivos ao longo da mesma.

d) As lâminas são imediatamente fixadas em etanol-acético' 3:1 por 5 minutos, lavadas em álcool 70%, coradas ou então estocadas em refrigerador.

e) Especial cuidado é exigido ao se encostar o fragmento' junto à lâmina. Nesse passo as células se desgarram do tecido, acollando-se à lâmina de vidro. O plasmalema se rompe e obtém-se dessa forma, núcleos praticamente isolados. Qualquer pressão do fragmento contra a lâmina pode provocar a ruptura do envólucro nuclear e extravasamento da cromatina, o que deve ser evitado.

As lâminas assim obtidas foram coradas com a reação de Feulgen e com azul de toluidina a pH 4,0.

3.2. Reação de Feulgen.

A reação de Feulgen, específica para o DNA, foi empregada com fim tanto a estudos morfológicos da cromatina, quanto a deter

minações citofotométricas do conteúdo desse ácido nucleico das células (hepatócitos e células tumorais do pulmão). A sequência para sua realização foi a seguinte:

- a) Hidrólise ácida com HCl 4N durante 1 hora e 10 minutos à temperatura ambiente.
- b) Lavagem em água destilada.
- c) Coloração com reativo de Schiff por 40 minutos.
- d) Três banhos de 5 minutos cada um em água sulfurosa.

Água sulfurosa:

Metabissulfito de sódio a 10%.....	1 parte
HCl 1N.....	1 parte
H ₂ O	18 partes

- e) Desidratação progressiva até álcool 100%.
- f) Álcool-xilol 1:1.
- g) Xilol por 10 minutos.
- h) Montagem em bálsamo do Canadá.

Especial atenção foi dada às lâminas destinadas a estudos citofotométricos. As lâminas com os núcleos a serem comparados entre si foram todas processadas numa mesma cuba, portanto sob exatamente as mesmas condições de hidrólise, coloração etc. Evitamos assim, qualquer erro na determinação dos valores Feulgen- DNA que pudessem advir desta etapa do trabalho.

3.3. Coloração com azul de toluidina

Com o propósito de detectar a presença de estruturas com e levado conteúdo de RNA nos núcleos de hepatócitos, efetuou-se a coloração dos decalques com azul de toluidina 0,025% a pH 4,0, com ou sem extração prévia desse ácido nucleico.

A extração do RNA foi feita submetendo-se as lâminas a uma

hidrólise ácida com HCl 1N a 60° C durante 5 minutos. Em seguida, essas lâminas, juntamente com aquelas onde não foi feita a extração (testemunho), foram coradas com azul de toluidina obedecendo-se aos passos abaixo:

- a) Coloração com azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine a pH 4,0 durante 15 minutos.
- b) Lavagem rápida em água destilada.
- c) Secagem ao ar.
- d) Xilol por 5 minutos.
- e) Montagem em bálsamo do Canadá.

4. Citofotometria

As medidas citofotométricas foram efetuadas num fotomicroscópio Zeiss equipado com um fotômetro 01 e com um fotomultiplicador EMI 6256.

O método escolhido para determinação dos valores Feulgen-DNA, foi o do duplo comprimento de onda. Para utilização desse método, baseamo-nos na excelente descrição do mesmo, feita por Mello (1976). Nas palavras da autora acima citada, "o método de duplo comprimento de onda, descrito simultânea e independentemente por Ornstein e Patau, em 1952, apresenta como principais vantagens a compensação dos erros distribucionais devidos à não homogeneidade em compactação e distribuição do material corado, a possibilidade de se medir objetos com forma irregular e a não necessidade de um foco preciso de todos os pontos a serem mantidos em conjunto".

Por este método, os valores Feulgen-DNA de cada núcleo, calculados em unidades arbitrárias, são obtidos pela aplicação das

fórmulas abaixo:

$$m_t = \frac{B \cdot L_a \cdot C}{K_a \cdot \ln 10} \quad (1)$$

$$C = \frac{1}{2 - Q} \ln \frac{1}{Q - 1} \quad (2)$$

$$Q = \frac{L_b}{L_a} = \frac{1 - T_b}{1 - T_a} \quad (3)$$

sendo:

B = área do campo de medida,

m_t = quantidade total de cromóforo,

T = transmitância,

K = absortividade (constante, utilizada nos cálculos para obtenção de quantidades absolutas),

\underline{a} e \underline{b} = comprimentos de onda, tais que $K_b = 2 K_a$

Em nosso caso específico, m_t representa os valores Feulgen - DNA.

O primeiro passo, portanto, é a escolha dos dois comprimentos de onda \underline{a} e \underline{b} , de tal sorte que, o valor de extinção (ou absorbância) encontrado em \underline{b} seja o dobro do que \underline{a} . Isto para uma mesma área de medida. Uma vez escolhido os dois λ , determinamos para cada núcleo, os valores de transmitância (T_a e T_b) nesses respectivos comprimentos de onda. Aplicando os valores

de T_a e T_b em (3) obtemos Q , o qual aplicado em (2) nos fornece C . Este último aplicado em (1) nos dá o valor de m_t . Como estamos interessados em determinações relativas dos valores Feulgen-DNA, podemos desprezar o denominador em (1) ficando:

$$m_t = B \cdot L_a \cdot C \quad (4)$$

Ainda segundo Mello (1976), "no caso específico da reação de Feulgen, a escolha dos dois comprimentos de onda deve ser tal que o comprimento de onda a esteja no lado verde do espectro (Garcia e Iorio, 1966). Além disso, na escolha dos dois λ costuma-se levar em consideração o critério de Garcia e Iorio (1966), segundo o qual sendo E_a a extinção no λ mais curto e E_b a extinção no λ mais longo, a razão E_a/E_b deve ser levemente superior a 0,50, ou seja, ao redor de 0,51-0,53. Este pequeno excesso compensará, segundo os autores mencionados, o efeito promovido pela presença de espaços não absorventes em meio ao material corado ".

Para escolha dos dois comprimentos de onda a serem empregados a fim de se obter o valor das transmitâncias, foram construídas curvas espectrais de absorção nas regiões cromocêntricas de 12 núcleos (6 núcleos controle e 6 núcleos de animal tratado). Usou-se objetiva Plan. 40 X/ 0,65, optovar 2 X, diafragma de medida com diâmetro de 0,25 mm e diafragma de campo com diâmetro igual a 0,2mm. A área de mensuração correspondeu portanto a $3,12 \text{ um}^2$. Os diferentes comprimentos de onda foram obtidos com o uso de uma régua monocromadora de fabricação Schott.

Em cada curva de absorção, temos um comprimento de onda onde a extinção é máxima (pico da curva). Atribuindo-se o valor 100% a este máximo, podemos calcular a partir daí, os valores relativos de extinção para os outros comprimentos de onda. Determinou-se a seguir, a média aritmética desses novos valores, para cada comprimento de onda. Obtivemos assim duas curvas espectrais b̄

sicas. Uma correspondente aos núcleos controle e a outra correspondente aos núcleos tratados com DMN (fig. 2). Como essas duas curvas praticamente se sobrepuseram, um mesmo par de comprimentos de onda (490 e 550 nm), foi escolhido para as medidas de transmitância, tanto para núcleos controle, como para núcleos tratados.

Para as medidas de transmitância, utilizamos objetiva Plan. 40 X / 0,65, optovar 2 X , diafragma de campo com 0,2, 0,3 ou 0,4 mm de diâmetro e diafragmas de medida com diâmetros de 1,0, 1,6 e 2,5 mm (áreas de medida equivalentes a 122,7, 314,0 e 766,6 μm^2 , respectivamente). O uso de diferentes diafragmas de medida se fez necessário face à diversidade de tamanhos dos núcleos hepáticos e dos núcleos tumorais em geral. É importante ressaltar que a relação área de medida/área do núcleo não deve ultrapassar a 3,41, pois se tal ocorrer, a área não absorvente será muito grande, introduzindo erros consideráveis nas medidas (Mello, 1976).

Para os cálculos matemáticos utilizou-se uma mini-calculadora Texas SR-40. Uma vez obtidos os valores de m_t , estes foram distribuídos em histogramas, segundo uma escala em progressão geométrica (Ferreira et al, 1967).

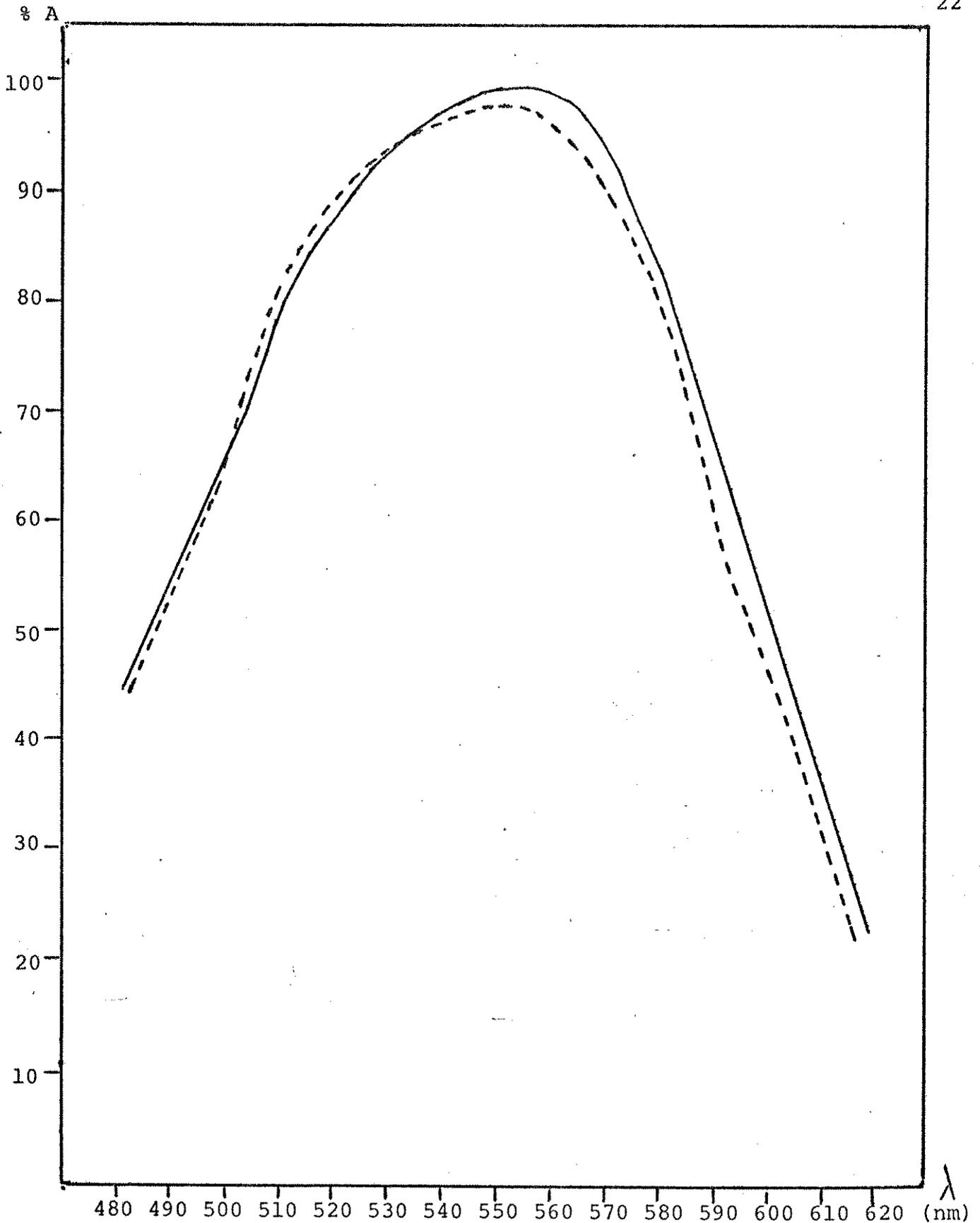


Figura 2. Curvas espectrais de absorção para escolha dos dois comprimentos de onda a serem utilizados na citofotometria de núcleos de hepatócitos. Em linha contínua, curva construída com a média de 6 curvas obtidas a partir de núcleos controle. Em linha tracejada, curva construída com a média de 6 curvas obtidas a partir de núcleos tratados com DMN. As duas curvas praticamente se sobrepuseram; por isso, um mesmo par de comprimentos de onda (490 e 550 nm) pode ser usado para as medidas de transmitância, tanto de núcleos controle, como de núcleos tratados.

III - RESULTADOS

1. Considerações gerais.

Um dos objetivos de nosso trabalho era identificar e descrever alterações precoces em núcleos de hepatócitos provocadas pela DMN. Para tanto, os animais foram sacrificados em três períodos de tratamento - três semanas, três meses e seis meses. O estudo do material recolhido nestas três etapas, viria assim, a permitir uma análise da evolução das alterações provocadas pela droga.

Além disso, muitos animais morreram (12 machos e 20 fêmeas no total) ao longo do tratamento, desde a primeira até a última semana. Com algumas poucas exceções, todo este material foi também analisado. No entanto, as descrições feitas em nosso trabalho se baseiam, única e exclusivamente, em material fixado de imediato após o sacrifício do animal. Evitamos dessa forma, ao máximo, o aparecimento de alterações " post mortem " que pudessem ser confundidas com aquelas produzidas pela DMN.

2. Aspectos clínicos

Os principais distúrbios e sintomas de adoecimento detectados, durante o longo período de administração da droga, foram os seguintes:

a) Ascite : o acúmulo de líquido ascítico revelou-se logo na primeira semana de tratamento. Aproximadamente 30% dos machos e fêmeas em tratamento, apresentaram esse distúrbio durante o primeiro mês de administração da droga, quando a mes -

ma era fornecida na dose de 5,0 mg / Kg de peso corporal / dia . O mesmo se manifestava por um aumento volumétrico progressivo da região abdominal do camundongo. Para superar essa dificuldade e impedir a morte precoce dos animais, foram adotadas as seguintes providências:

1º Redução da dose de DMN para 2,5 mg / Kg de peso corporal / dia.

2º Suspensão do tratamento durante um mês para os animais afetados.

3º Extração do líquido por meio de punções nos casos mais graves. Chegou-se a retirar cerca de 15 ml de líquido de um só animal. Após estas medidas, este distúrbio não voltou a se manifestar (a não ser em alguns poucos casos), nos animais que continuaram em tratamento.

b) Emagrecimento: alguns poucos animais apresentaram, a partir do terceiro mês de tratamento, um emagrecimento lento, gradual e irreversível, sempre culminando com a morte.

c) Dispneia: dificuldades respiratórias reveladas por um número excessivo de inspirações ritimadas, foram detectadas durante o sexto mês de tratamento, nos animais que resistiram até esta data. A necrópsia posterior, mostrando a presença de tumores pulmonares, muitos deles chegando a ocupar todo um lobo, deixou clara a razão desta insuficiência respiratória.

3. Histopatologia e citopatologia do fígado.

3.1. Análise macroscópica.

A análise macroscópica do fígado revelou alterações na forma, no tamanho, na cor e na textura do órgão, notadamente a partir do terceiro mês de tratamento.

Os lobos hepáticos, no fígado normal, têm seus bordos em forma de V mostrando nessa região, uma rica trama de vasos sanguíneos, que podem ser percebidos por transparência. No fígado dos animais tratados, os bordos dos lobos assumem uma forma abaulada, e não se percebe mais a trama vascular terminal.

Em certos casos podemos observar a fusão de dois ou mais lobos, numa só massa disforme. O tamanho dos mesmos é em geral reduzido, quando comparados com o controle.

A cor do fígado também se modifica sensivelmente. Na maioria das vezes, um vermelho arroxeado revela o estado de congestão passiva crônica em que se encontra o órgão. Em outros casos, uma cor pardo amarelada toma conta dos lobos hepáticos, na evidência de processos degenerativos.

Em casos mais graves, notava-se a presença de regiões necrosadas, mais ou menos extensas, associadas a coágulos sanguíneos.

Não notamos em nenhum dos órgãos analisados, a presença de protuberâncias ou nódulos, que pudessem sugerir a formação de tumores.

3.2. Análise histológica.

A ação tóxica da DMN sobre o fígado dos camundongos manifestou-se desde o início da administração da mesma. O exame dos cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina revela uma série de alterações patológicas, já com três semanas de tratamento. Tais alterações se agravaram progressivamente, como pudemos

observar pelo estudo das lâminas preparadas a partir de animais sacrificados com três e seis meses de tratamento. Daremos a seguir uma descrição geral dos principais fenômenos observados no fígado dos animais tratados, assim como, a cronologia dos mesmos.

a) Degeneração e necrose: em várias regiões do parênquima hepático, particularmente junto as veias centrolobulares, podemos observar, já com três semanas de tratamento, células em degeneração (fig. 4). Associam-se a estas células, elementos figurados do sangue formando quadros que logo se destacam, numa observação panorâmica. Esse processo degenerativo prossegue, formando focos de necrose que se alastram por toda extensão do lobo hepático.

Com seis meses de tratamento há, em muitos lobos hepáticos analisados, um colapso total, com perdas de massas teciduais necrosadas, hemorragia e desorganização geral do parênquima do órgão (fig. 5).

b) Desorganização tecidual: há uma progressiva perda da arquitetura normal do fígado. No caso, o que se manifesta de forma mais evidente, é um desarranjo na organização trabecular dos cordões de hepatócitos. Como consequência desse fenômeno, muitos capilares sinusóides têm a sua luz reduzida, ou totalmente obstruída (fig. 4).

c) Transtornos circulatórios locais: são patentes desde o começo do tratamento. A análise dos cortes histológicos à olho nú e contra a luz, já mostra uma notável dilatação dos espaços venosos que sulcam o parênquima dos lobos hepáticos. Um quadro de hiperemia passiva é revelado pelo acúmulo de sangue, particularmente junto às veias centrolobulares.

Como podemos perceber, as modificações patológicas parecem se iniciar nos centros dos lóbulos hepáticos, para poste -

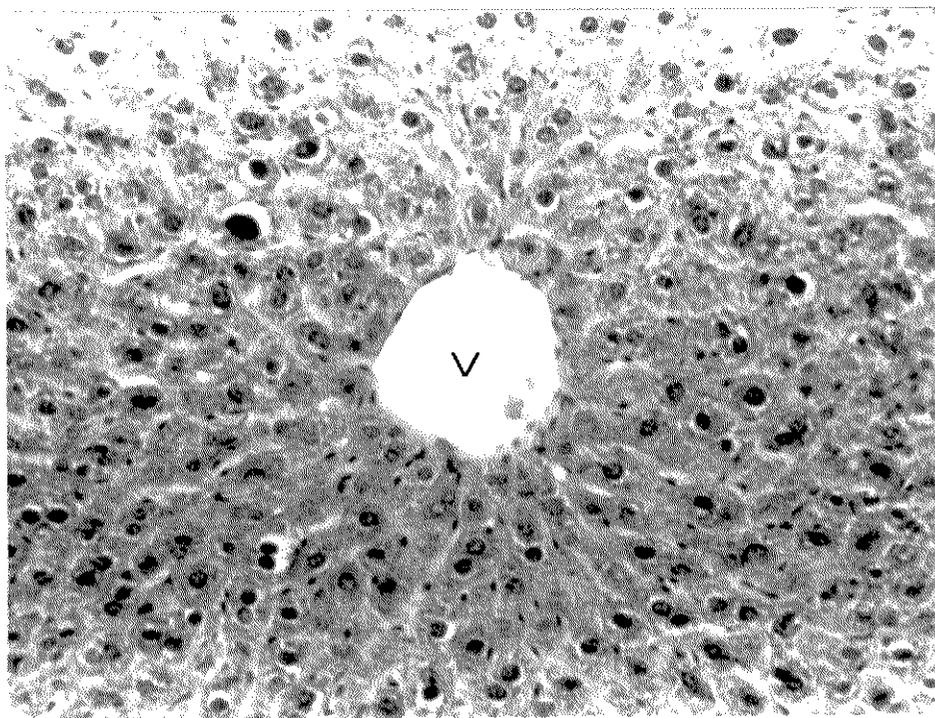


Figura 3. Fígado normal (controle). As traves hepáticas, em corte, assumem o aspecto de cordões que se anastomosam livremente; (V), veia centrolobular. Coloração pela hematoxilina e eosina . Ampliação total 750X.

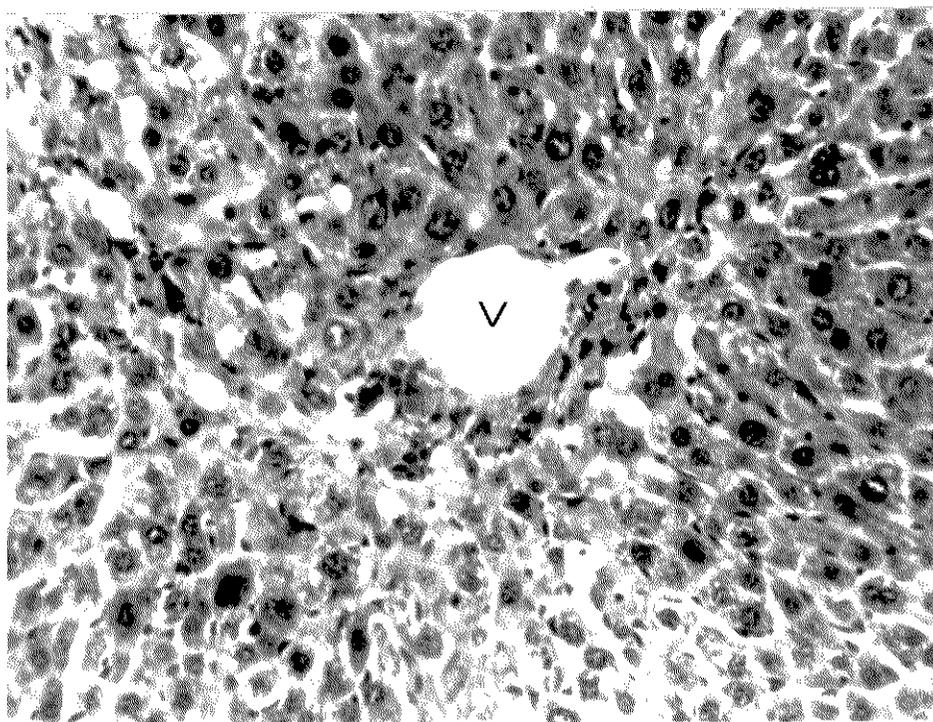


Figura 4. Fígado afetado pela DMN (3 semanas de tratamento). Área de necrose com infiltração de granulócitos neutrófilos junto a uma veia centrolobular (V) - necrose centrolobular - .Coloração pela hematoxilina e eosina. Ampliação total 750X.

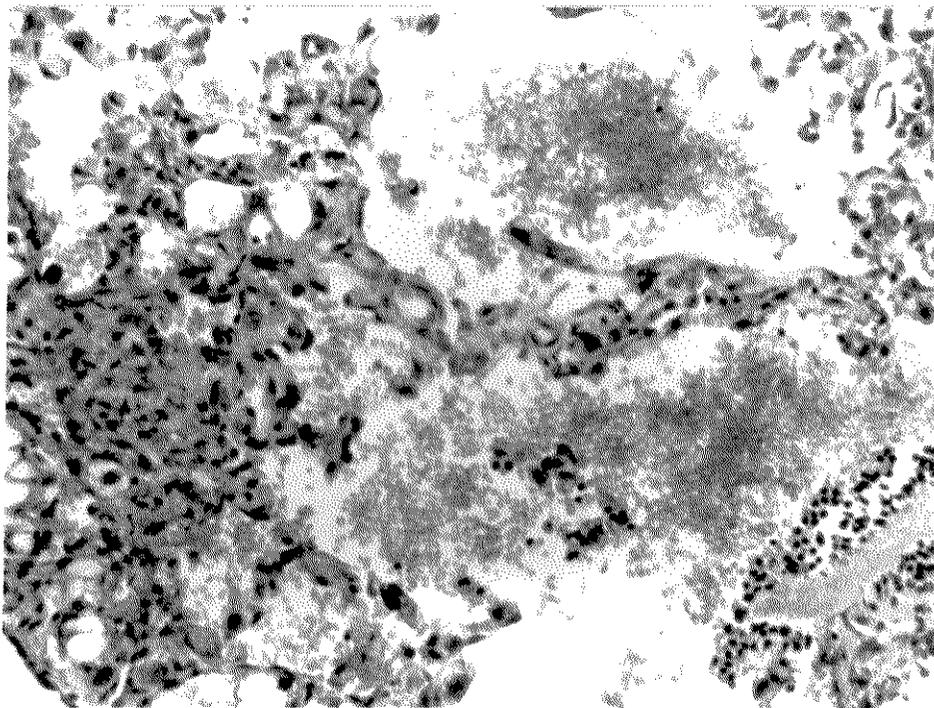


Figura 5. Fígado afetado pela DMN (6 meses de tratamento). Ca - so mais grave onde extensas zonas de necrose e hemorragia tomam ' conta do órgão. Coloração pela hematoxilina e eosina. Ampliação total 750X.

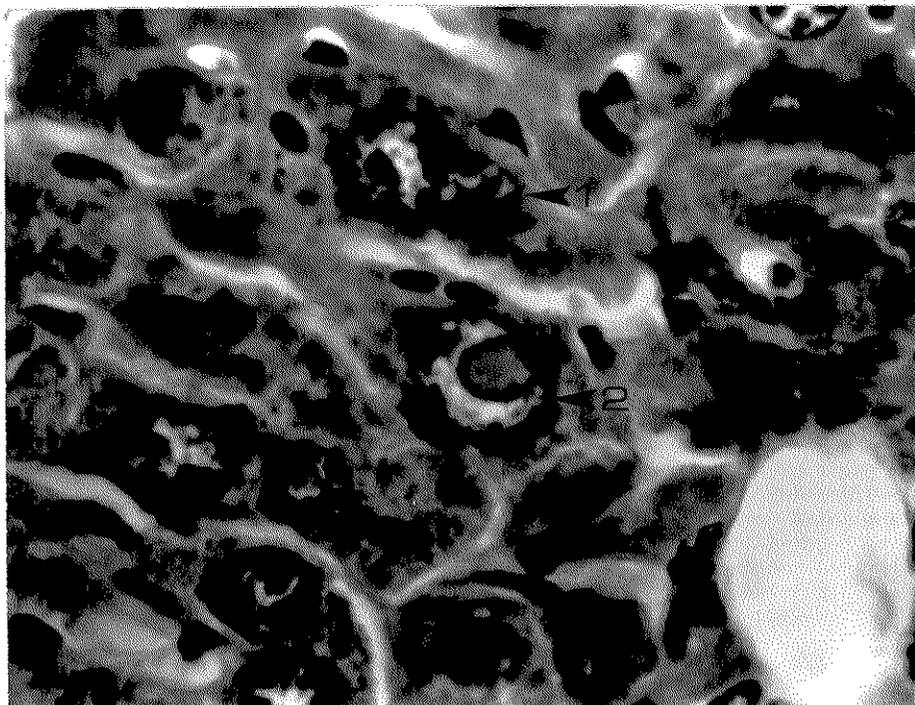


Figura 6. Detalhes de núcleos de hepatócitos após 6 meses de tra - tamento com DMN. Acima (seta 1), um núcleo elíptico de propor - ções gigantescas. Abaixo (seta 2), outro núcleo mostrando uma vesícula eosinófila em seu interior. Coloração pela hematoxilina e eosina. Ampliação total 3000X.

riormente se estenderem à periferia dos mesmos.

d) Infiltração linfocitária: encontramos normalmente no fígado dos animais tratados quer durante três semanas, três meses ou seis meses, abundantes quantidades de linfócitos. São massas de células de núcleo pequeno, escuro e de citoplasma escasso, localizadas principalmente ao redor dos vasos sanguíneos.

e) Citopatologia: de uma maneira geral, podemos dizer, com base em observações de natureza qualitativa, que há um incremento no volume dos núcleos de hepatócitos. A forma de muito deles também se modifica. Alguns se tornam multilobulados, outros se alongam tomando uma forma elíptica, outros ainda assumem contornos irregulares e variados (fig. 6).

Com relação ao citoplasma, há uma vacuolização do mesmo, observada principalmente em três semanas e três meses de tratamento. Já com seis meses de tratamento, esse fenômeno não se mostra tão evidente.

As alterações intranucleares, particularmente aquelas que se referem à estrutura da cromatina, serão descritas com detalhes quando analisarmos os núcleos em decalques corados com a reação de Feulgen e com azul de toluidina.

3.3. Análise dos núcleos de hepatócitos em decalques corados com Feulgen.

Os núcleos de hepatócitos de camundongo tem um aspecto característico, por causa dos seus cromocentros heterocromáticos, que se destacam contra a cromatina restante, distribuída quase que homogêneamente pelo núcleo, na forma de uma rede filamentar muito fina (fig. 7).

Os cromocentros se mostram como pequenas massas compactas,

individualizadas e intensamente coradas. A reação de Feulgen permite uma nítida identificação dessas estruturas.

Os nucléolos por sua vez, não se coram pela reação de Feulgen, e suas imagens negativas podem ser percebidas com um aspecto vacuolizado, normalmente associadas a um ou mais cromocentros (fig. 7).

A análise dos núcleos de animais tratados revelou uma série de alterações deste padrão de núcleo descrito. Como as mesmas alterações básicas foram encontradas em todos os animais analisados, e nos três períodos de tratamento (três semanas, três meses e seis meses), daremos aqui uma descrição geral das mesmas. É preciso apenas salientar, que tais alterações se intensificaram com o transcorrer do tratamento.

a) Descompactação ou " dissolução " dos cromocentros.

Na maioria dos núcleos de animais tratados, notamos que os cromocentros já não são tão nítidos e visíveis como no controle (figs. 8,9,10). Em outras palavras, eles já não se destacam tão facilmente do restante da cromatina. À primeira vista tem-se a impressão que o material está mal focalizado ao microscópio.

Em alguns núcleos muitos cromocentros mal podem ser percebidos, e a cromatina assume um aspecto quase homogêneo.

Em resumo, pode-se dizer que a demarcação ou limite entre heterocromatina (cromocentros) e eucromatina, torna-se cada vez menos nítida à medida que o tratamento se prolonga.

Tais fatos sugerem um processo de descompactação ou dissolução dos cromocentros.

b) Presença de nucléolos anormalmente maiores.

Como já foi dito, os nucléolos não se coram pela reação de Feulgen e suas imagens negativas podem ser vistas como pequenas formações vesiculares (fig. 7). Nos animais tratados, tais formações aparecem, em grande parte dos núcleos, mostrando um volume maior que nos núcleos controle (fig. 8). Em muitos núcleos, chegam, seguramente, a preencher a maior parte de seus volumes. Um halo de cromatina mais corada circunda cada um desses nucléolos, o que facilita a sua visualização.

c) Presença de " vesículas gigantes " .

Em muitos núcleos de animais tratados podemos observar a presença de uma, duas ou até três vesículas de proporções verdadeiramente gigantescas. Muitas vezes, uma única dessas estruturas chega a ocupar a maior parte do núcleo. Um halo de material cromatínico pode ser visto circundando cada uma delas, delimitando-as claramente (fig. 9).

Em alguns núcleos, a presença de uma dessas formações junto ao envólucro nuclear deforma-o, quase a ponto de rompê-lo

Maiores esclarecimentos a respeito da natureza de tais es-

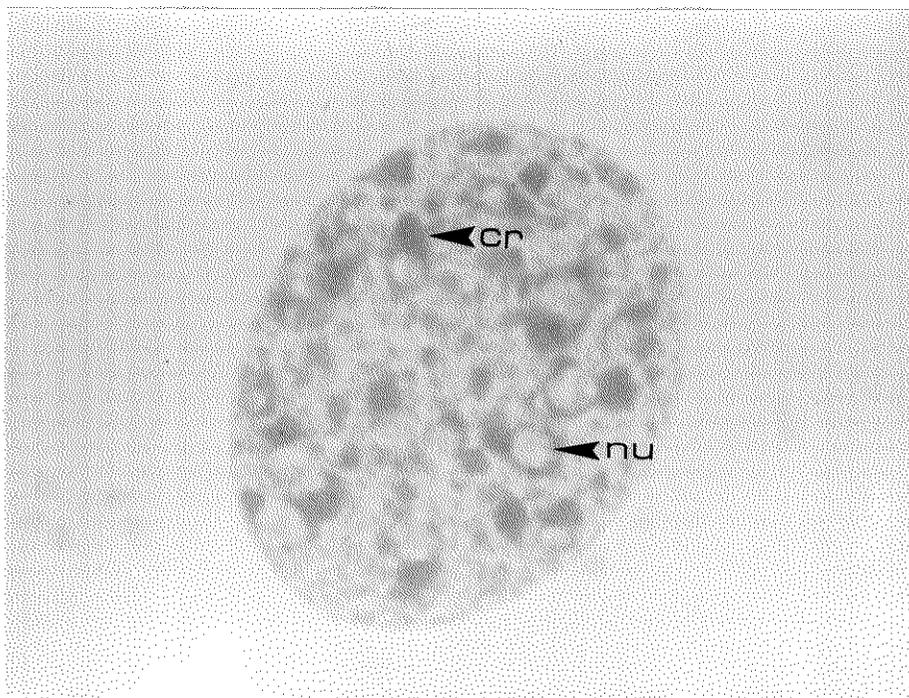


Figura 7. Núcleo de hepatócito normal (controle) em decalque corado com Feulgen. Os cromocentros (cr) aparecem como massas heterocromáticas intensamente coradas. As imagens negativas dos nucléolos (nu) podem ser percebidas como regiões mais claras , menos coradas. Ampliação total 4800X.

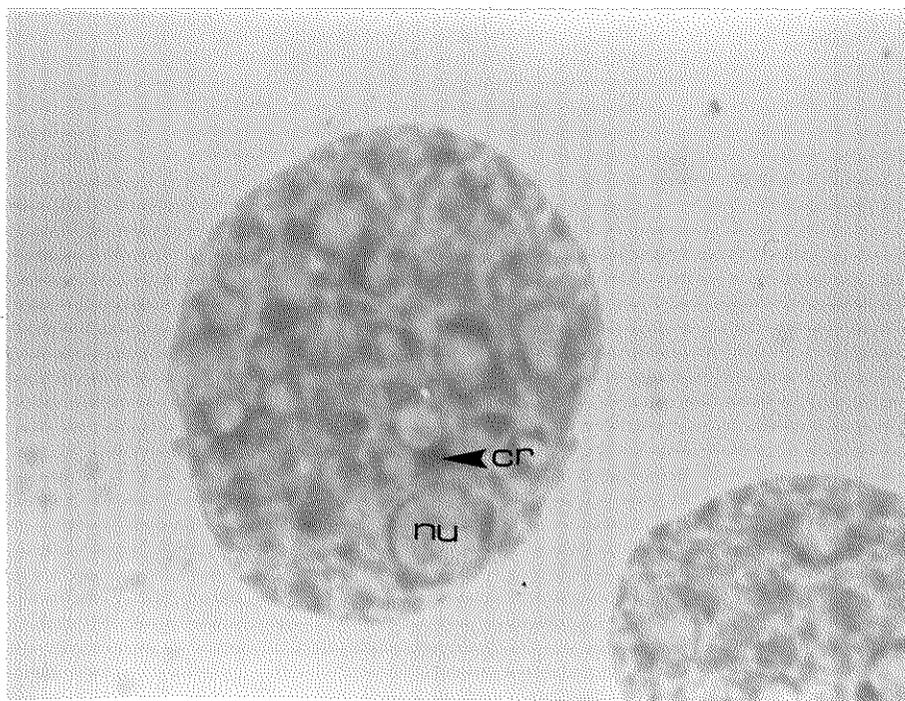


Figura 8. Núcleo de hepatócito afetado pela DMN (seis meses de tratamento). Decalque corado com Feulgen. A descompactação dos cromocentros (cr) faz com que a demarcação entre heterocromatina e eucromatina se torne cada vez menos nítida. Os nucléolos (nu), em geral, são maiores que no controle, e suas imagens negativas destacam-se claramente. Ampliação total 4800X.

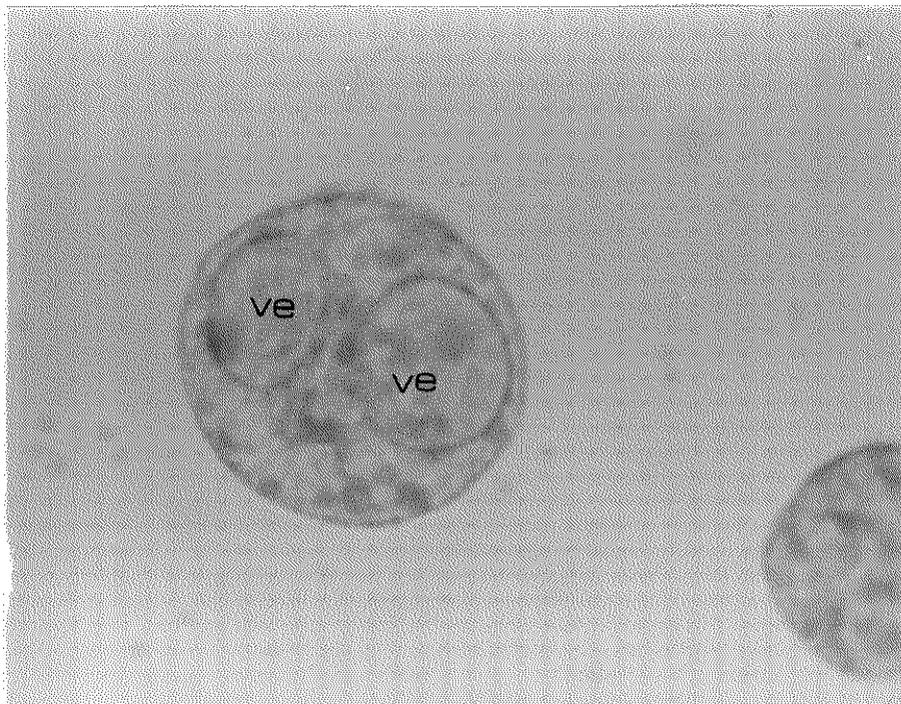


Figura 9. Núcleo de hepatócito afetado pela DMN (6 meses de tratamento. Decalque corado com Feulgen. Nota-se a presença de formações vesiculares (ve) de grande volume. Um halo de material cromatínico delimita cada uma dessas estruturas. Neste núcleo, os cromocentros mal podem ser percebidos. Ampliação total 4800X.

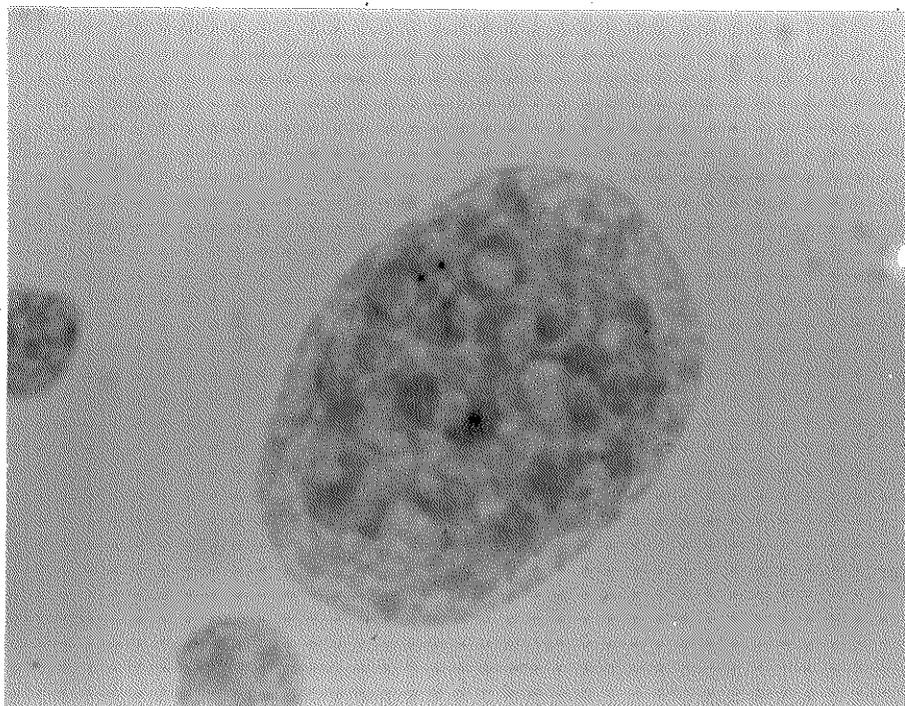


Figura 10. Núcleo de hepatócito afetado pela DMN (6 meses de tratamento) Decalque corado com Feulgen. Aspecto semelhante ao da figura 8. Os cromocentros, na sua maioria, são poucos nítidos quando comparados com os de um núcleo controle típico. Ampliação total 3200X.

estruturas serão fornecidas mais adiante, por outros métodos de estudo.

d) Desorganização nuclear.

Além das alterações já descritas, podemos notar nos preparados dos animais que receberam DMN, uma grande quantidade de núcleos em destruição. Este fenômeno evidencia-se, principalmente por um processo de cromatólise, onde o material cromatínico é progressivamente destruído, até que, no final nada mais resta do núcleo a não ser uma tênue imagem fracamente corada.

Há que se relatar também a grande fragilidade ou labilidade dos núcleos dos animais tratados, quando comparados com o controle. Como se sabe, o processo de decalque envolve certa força quando a célula se desgarra do tecido para se colar à lâmina de vidro. Mesmo quando nos valem de toda delicadeza, alguns núcleos sempre se rompem, em cada grupo que se fixa à lâmina. A proporção desses núcleos rompidos é maior nos decalques feitos a partir do fígado de animais que receberam a droga.

3.4. Análise dos núcleos de hepatócitos em decalques corados com azul de toluidina.

À fim de melhor caracterizar a natureza das "vesículas" anteriormente descritas quando da reação de Feulgen, utilizamos a coloração com azul de toluidina a pH 4,0.

Foram coradas as lâminas com núcleos de animais tratados durante seis meses. Nestas lâminas podemos verificar que, na realidade, tais estruturas não estão vazias, mas acham-se preenchidas

por um material que se cora metacromaticamente pelo azul de toluidina (fig. 11).

Por outro lado, se realizarmos um tratamento prévio com HCl 1 N a 60° C por 5 minutos (extraído dessa forma o RNA), os núcleos corados com azul de toluidina assumem exatamente o aspecto daqueles corados com Feulgen. Em outras palavras, novamente constatamos a presença de formações vesiculares, agora praticamente vazias (fig. 12).

Estes dados nos levam a crer que pelo menos parte do material que constitui estas estruturas seja RNA.

Acrescente-se ao que foi dito, o fato de que, nos cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina, essas mesmas formações também aparecem, mostrando neste caso uma considerável afinidade pela eosina (fig. 6).

Como podemos verificar, as propriedades de coloração acima descritas, se assemelham bastante àquelas dos nucléolos.

Finalmente é preciso dizer, que essas mesmas formações podem ser ocasionalmente encontradas em alguns raros núcleos dos animais controle, assim mesmo apresentando volume menor.

4. Citofotometria dos núcleos de hepatócitos.

A citofotometria dos núcleos de hepatócitos colocou em evidência várias anomalias na formação das classes de ploidia, nos fígados afetados pela DMN.

Pudemos acompanhar a evolução dessas discrepâncias com relação ao normal, efetuando medidas em três semanas, três meses e seis meses de tratamento.

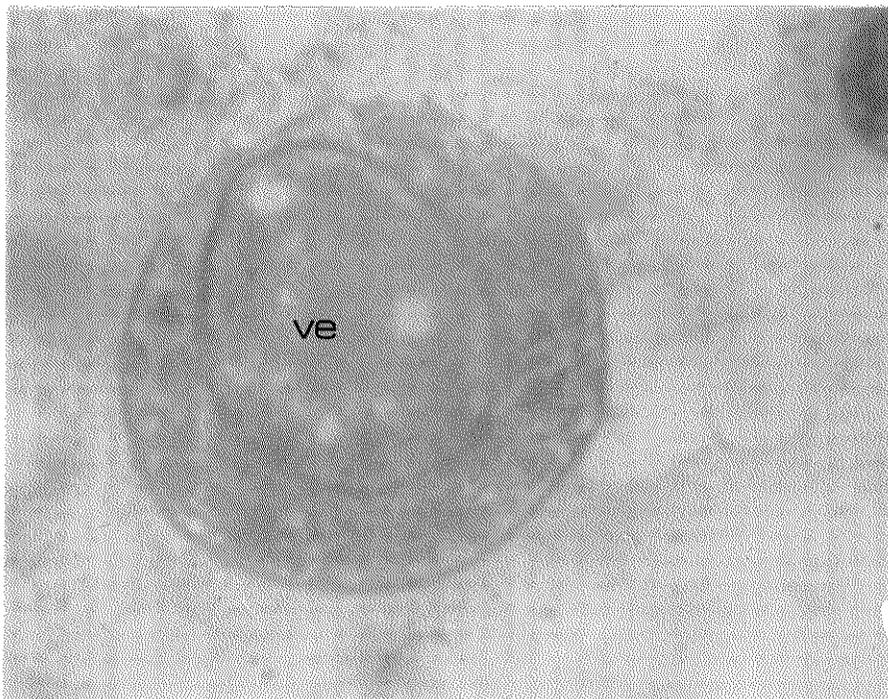


Figura 11. Núcleo de hepatócito afetado pela DMN (6 meses de tratamento). Decalque corado com azul de toluidina a pH 4,0. Ao centro, a presença de uma vesícula (ve) de grande volume. O material no interior da mesma acha-se corado pelo azul de toluidina. Ao redor do núcleo, restos de citoplasma aparecem corados. Ampliação total 4800X.

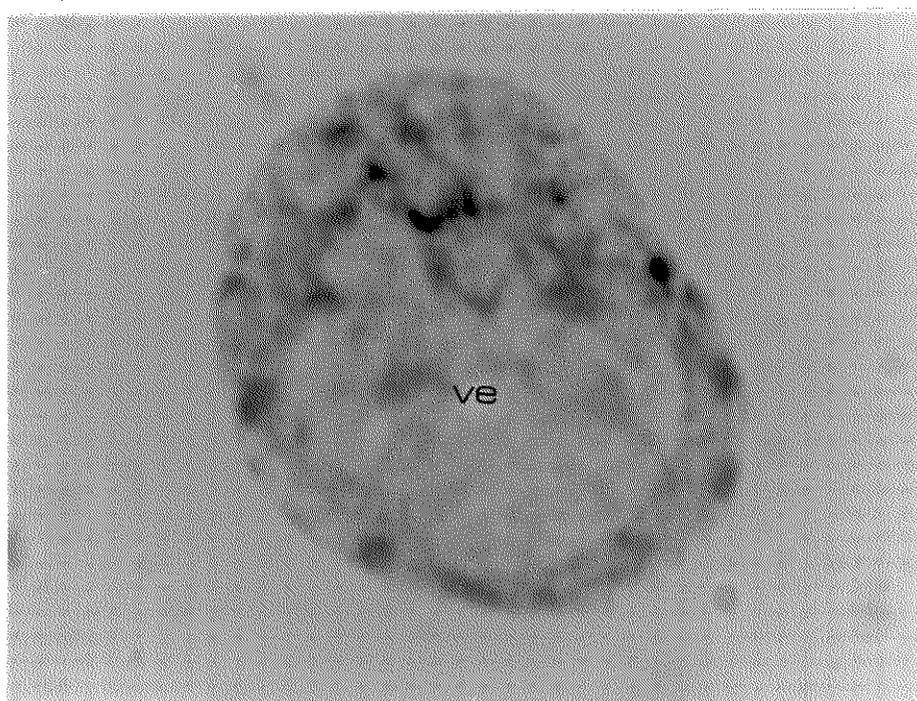


Figura 12. Núcleo de hepatócito afetado pela DMN (6 meses de tratamento). Coloração com azul de toluidina a pH 4,0, após extração do RNA. Com a extração do RNA, a formação vesicular (ve) que ocupa este núcleo não se cora, destacando-se claramente contra a cromatina restante. Ampliação total 4800X.

Com três semanas de tratamento não há, ainda, modificações consideráveis (fig. 13, tab. 1). Já com três meses, várias alterações podem ser notadas. Há o aparecimento precoce de núcleos da classe 32 C (no controle, a classe de ploidia mais elevada nesta fase é 16C). Por outro lado, notamos também a presença de alguns núcleos (3%) com quantidades de DNA que os colocam na classe " C ". A classe 4C encontra-se bastante reduzida, sendo composta por apenas 8% dos núcleos medidos (fig. 14, tab. 1). No respectivo controle, a classe 4C perfaz 15% do total de núcleos medidos. Com seis meses de tratamento, a população desta mesma classe sofre um pronunciado deslocamento para a direita (fig. 15).

À medida que o tratamento com DMN se prolonga, nota-se que há um visível achatamento dos picos das diversas classes de ploidia. Em outras palavras, nos animais que receberam o agente carcinogênico os núcleos que constituem cada classe de ploidia se dispersam por intervalos mais amplos, dentro da escala de valores utilizada (figs. 14 e 15).

Tabela 1. Porcentagem de núcleos de hepatócitos em cada classe de ploidia nos animais tratados com DMN e, nos respectivos controles.

Classe de Ploidia	Tratado 3 semanas		Tratado 3 meses		Tratado 6 meses	
	Controle		Controle		Controle	
C			3%		1%	
2C	46%	48%	47%	43%	29%	27%
4C	22%	30%	8%	15%	17%	24%
8C	26%	18%	29%	26%	34%	23%
16C	6%	4%	10%	16%	14%	21%
32C			3%		5%	3%
64C						2%

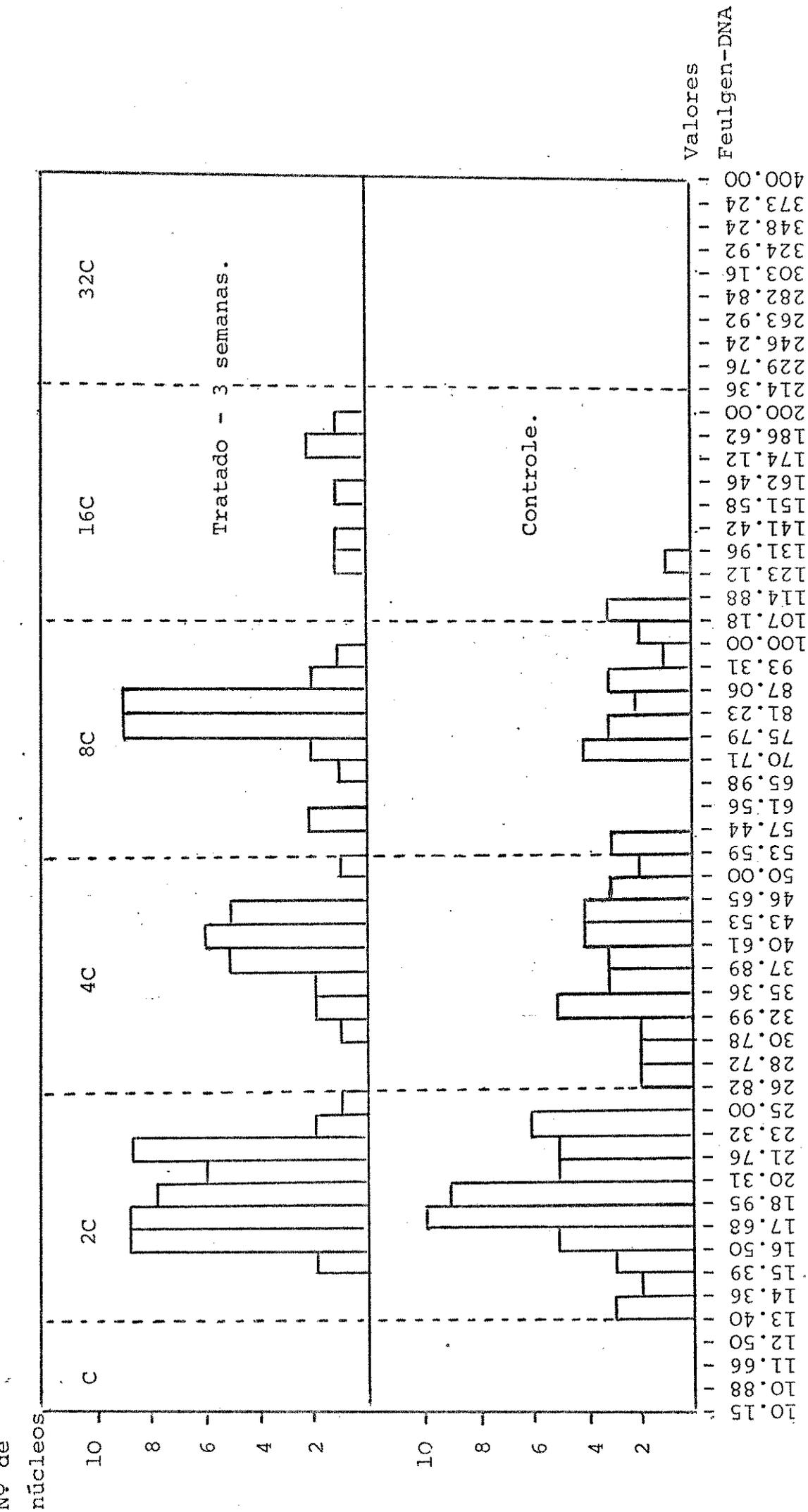


Figura 13. Acima, distribuição de 100 núcleos de hepatócitos de um animal tratado durante 3 semanas. Abaixo, o controle com idade semelhante (2 meses).

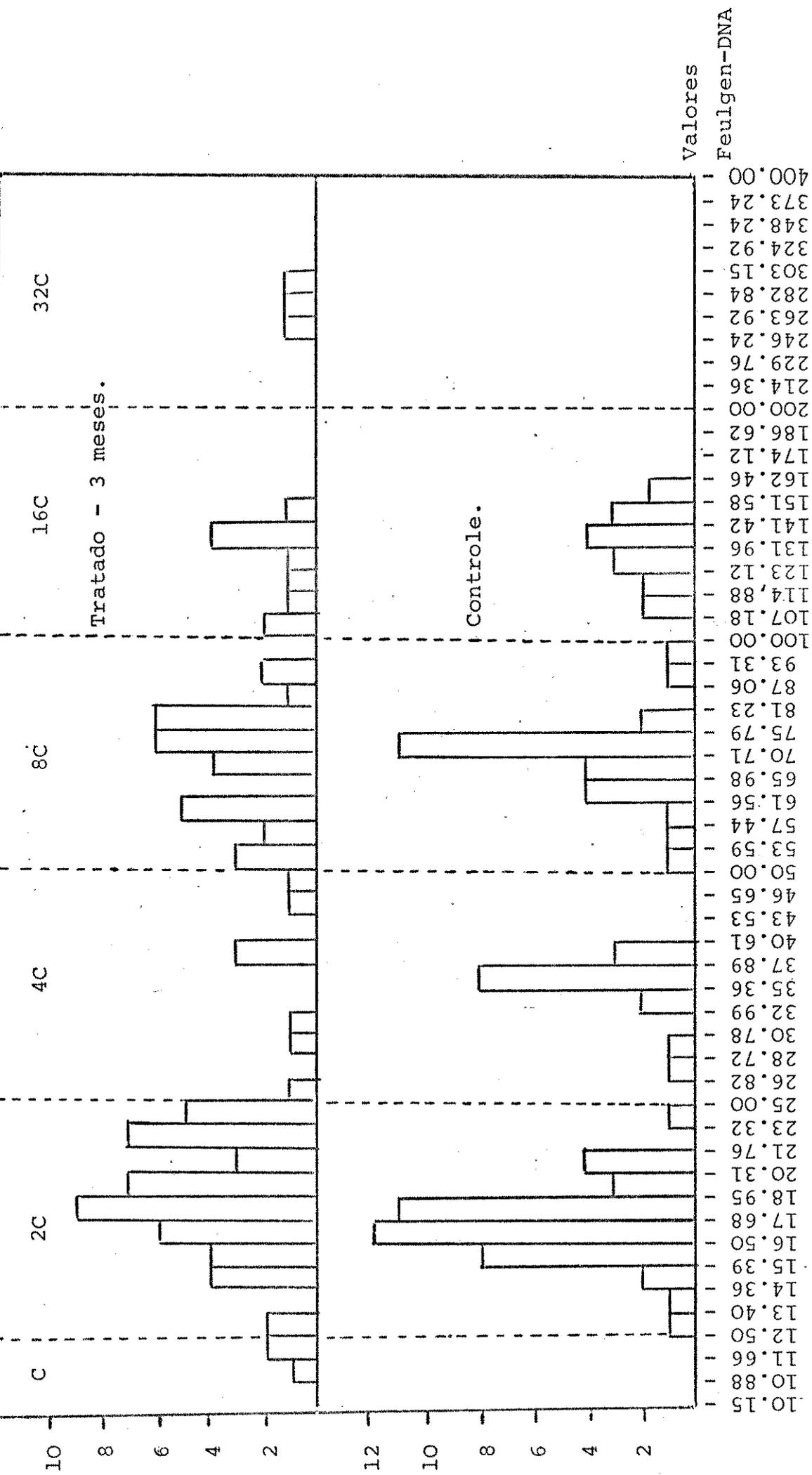


Figura 14. Acima, distribuição de 100 núcleos de hepatócitos de um animal tratado durante 3 meses. Abaixo, o controle com idade semelhante (4 meses e meio). As principais alterações se resumem em: 1) aparecimento precoce de núcleos da classe 32C; 2) achatamento dos picos das diversas classes; 3) redução da classe 4C.

úcleos

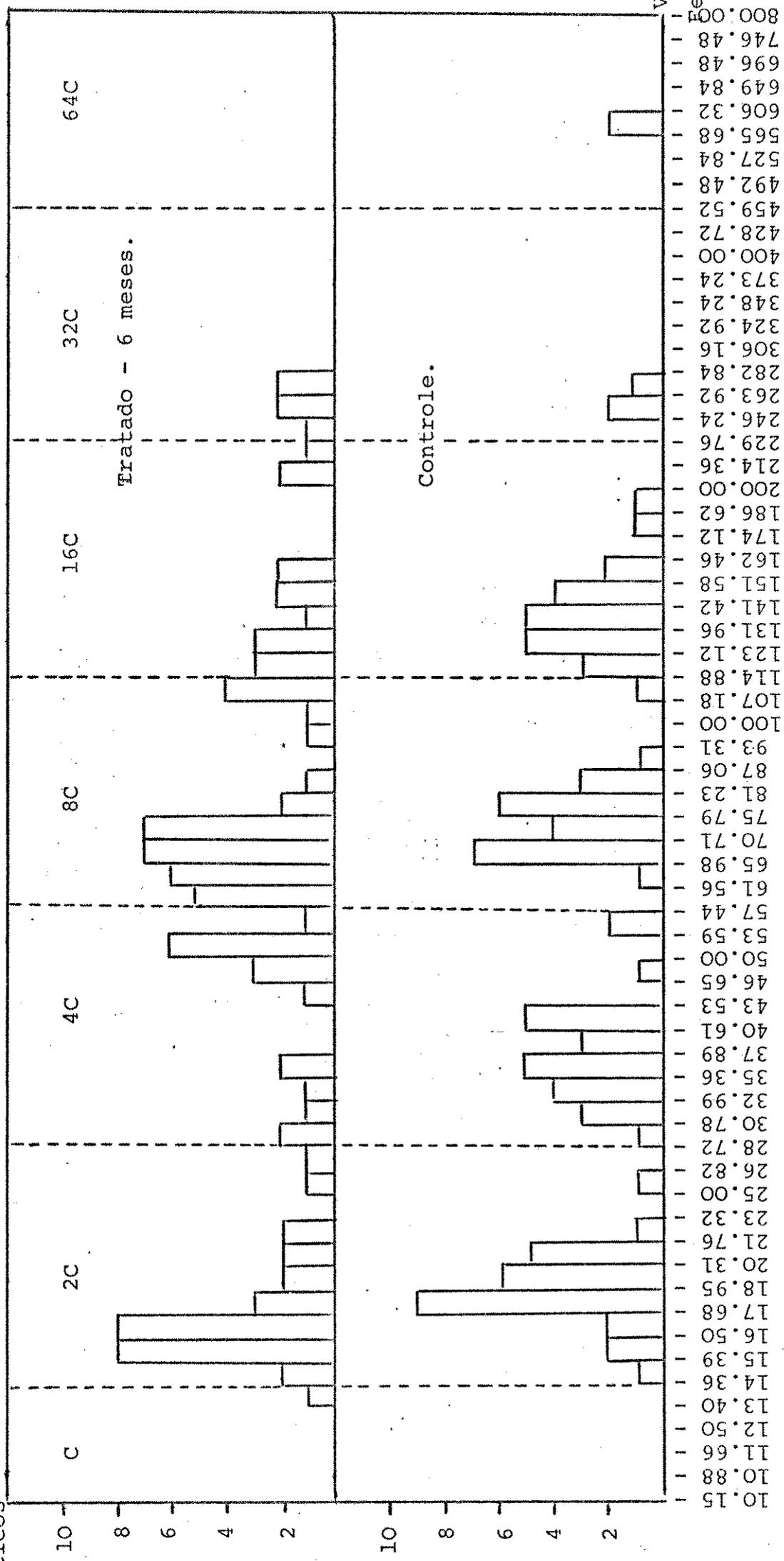


Figura 15. Acima, distribuição de 100 núcleos de hepatócitos de um animal tratado durante 6 meses. Abaixo, o controle com idade semelhante (7 meses e meio). A classe 4C tem sua população deslocada para a direita. As classes 2C e 16C tem seus picos achatados.

5. Histopatologia e citopatologia pulmonares.

A necrópsia dos animais mortos a partir do quinto mês de tratamento, revelou, em todos eles, a presença de tumores pulmonares.

Macroscopicamente, esses tumores podiam ser percebidos como nódulos, ora salientes na superfície do órgão, ora imersos ou encravados na espessura do mesmo.

O tamanho dessas massas nodulares e sua distribuição nos pulmões variavam bastante. Muitas vezes tomavam o aspecto de pequenas protuberâncias espalhadas por toda superfície do órgão. Outras vezes, um único nódulo gigantesco ocupava todo um lobo pulmonar, existindo entre estes dois extremos, toda uma gama de variações (fig. 16).

Tais nódulos eram sempre esbranquiçados, de consistência dura e compacta. Graças à esta última característica, podiam ser facilmente seccionados ao meio. Isto permitiu a execução de decalques dos tumores.

Todos os animais sacrificados após seis meses de tratamento (4 machos e 4 fêmeas), mostraram tumores pulmonares. Esse material foi fixado, incluído em parafina, cortado e corado com hematoxilina-eosina para exame histológico. Uma pequena parte do mesmo foi utilizada para a realização de decalques, que se prestariam à determinação citofotométrica do conteúdo de DNA das células tumorais.

Nos preparados histológicos, podemos observar as proliferações celulares que formavam os nódulos acima descritos. Tais proliferações, compostas por células epiteliais, aparecem, quase sempre, junto a um bronquíolo terminal ou respiratório (figs.17, 18,

'19 , e 20). São tumores formados por células intimamente agrupadas em cordões, os quais se anastomosam livremente. O aspecto destes tumores evidencia, por parte dos elementos que os constituem, uma " tentativa de imitação " de túbulos ou ductos condutores (fig. 21).

Os cordões de células neoplásicas chegam, muitas vezes, a constituir estruturas que lembram ácinos glandulares de luz reduzida, sem secreção no seu interior.

Todos esses dados parecem nos colocar diante de carcinomas oriundos do epitélio bronquiolar - adenocarcinomas bronquiolares - por excelência.

A maioria dos desvios ou aberrações morfológicas características de células neoplásicas estão presentes dentre as células que constituem os carcinomas produzidos pela DMN nos pulmões dos camundongos. De uma maneira geral, há um incremento no volume dos núcleos. Encontramos porém, desde núcleos pequenos até núcleos de proporções gigantescas. A atipia de forma também se faz presente, com muitos núcleos mostrando contornos irregulares, formas variadas e aspecto bizarro (fig. 23). Alguns núcleos são claros (hipocromasia), mas na sua grande maioria são escuros, corando-se intensamente pela hematoxilina (hiperchromasia). Outros ainda mostram-se quase que " vazios ", evidenciando neste caso um processo de cromatólise. Algumas células são bi ou trinucleares, isto é, contêm dois ou três núcleos, que podem ser de dimensões mais ou menos homogêneas, ou irregulares e de formas variadas, dentro de uma mesma célula.

Por outro lado, o número de figuras de mitoses, quer normais, quer patológicas, não é grande como seria de se esperar. Principalmente se considerarmos o crescimento rápido e a alta densidade celular desses tumores.



Figura 16. Tumores pulmonares produzidos em camundongo, após cinco meses de tratamento com dimetilnitrosamina. Os nódulos tumorais, de tamanho variado e cor esbranquiçada, fazem saliência na superfície do órgão. A seta indica um tumor de grandes proporções; a presença de formações como esta permitiu a realização de decalques, para obtenção de núcleos tumorais isolados. Aproximadamente 2X o tamanho natural.

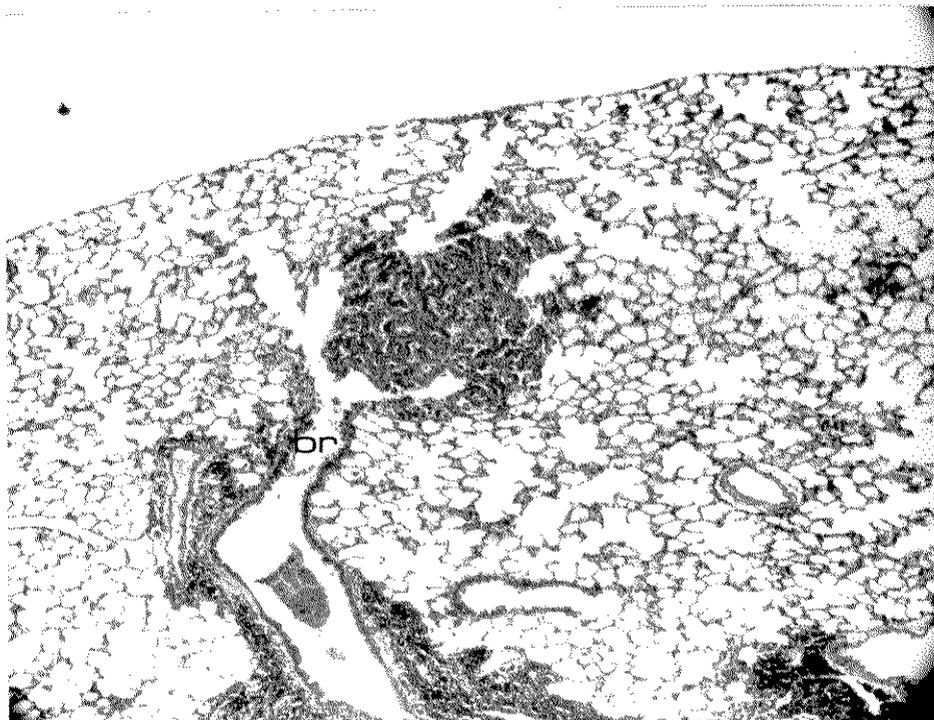


Figura 17. Em vista panorâmica, uma formação tumoral pulmonar, junto à região de bifurcação de um bronquíolo (br). O tumor parece se " arborificar " a partir do bronquíolo. Coloração pela hematoxilina e eosina. Ampliação total 187X.

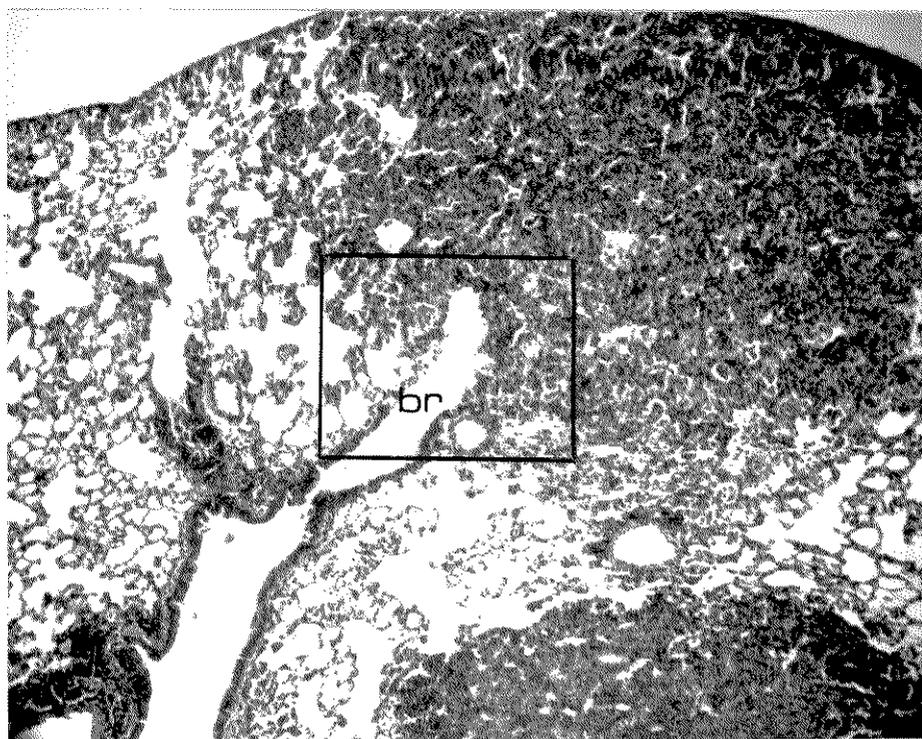


Figura 18. Em destaque, tumor de grandes proporções junto à região terminal de um bronquíolo pulmonar (br). Abaixo, parte de outra formação tumoral, também volumosa. Coloração pela hematoxilina e eosina. Ampliação total 187X.

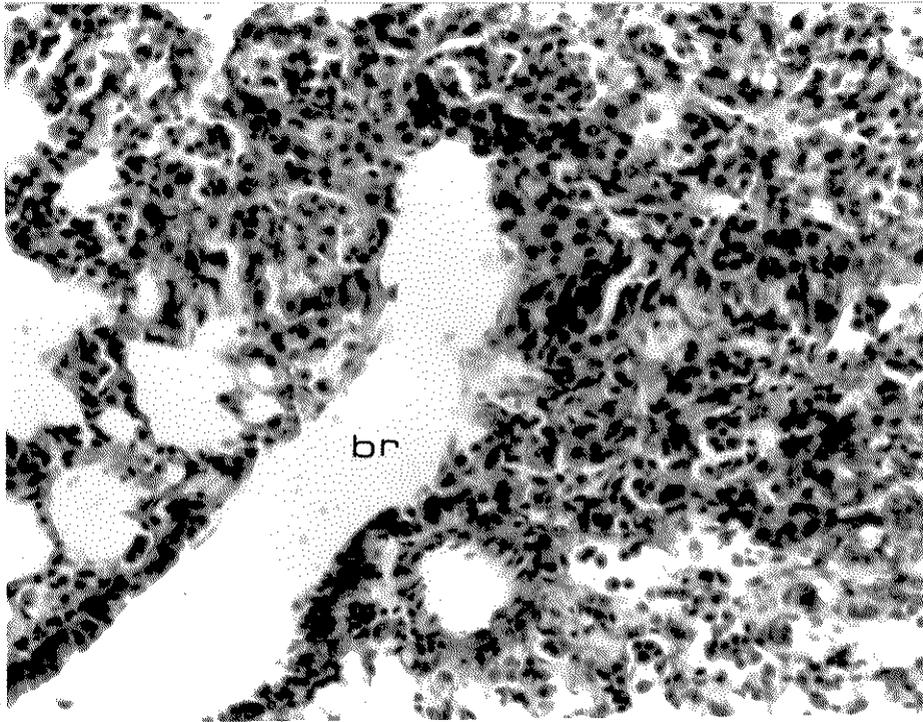


Figura 19. Detalhe em maior aumento da parte enquadrada na figura 18. Notar a íntima relação entre o tumor e o epitélio bronquial; (br), bronquíolo. Coloração pela hematoxilina e eosina. Ampliação total 750X.

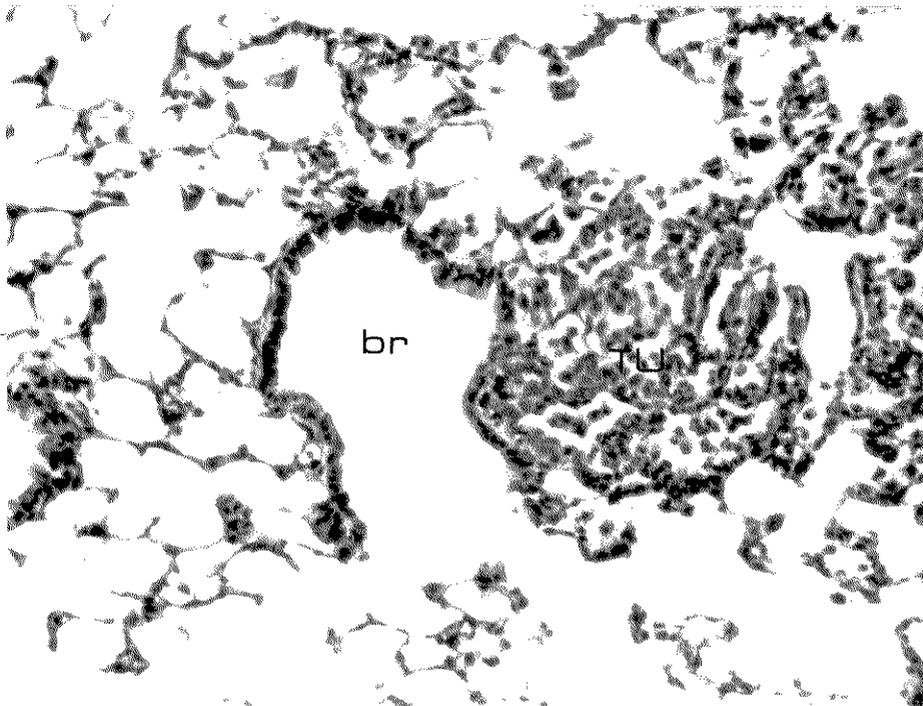


Figura 20. Tumor pulmonar (tu), em início de formação, junto a um bronquíolo terminal (br). Coloração pela hematoxilina e eosina. Ampliação total 750X.

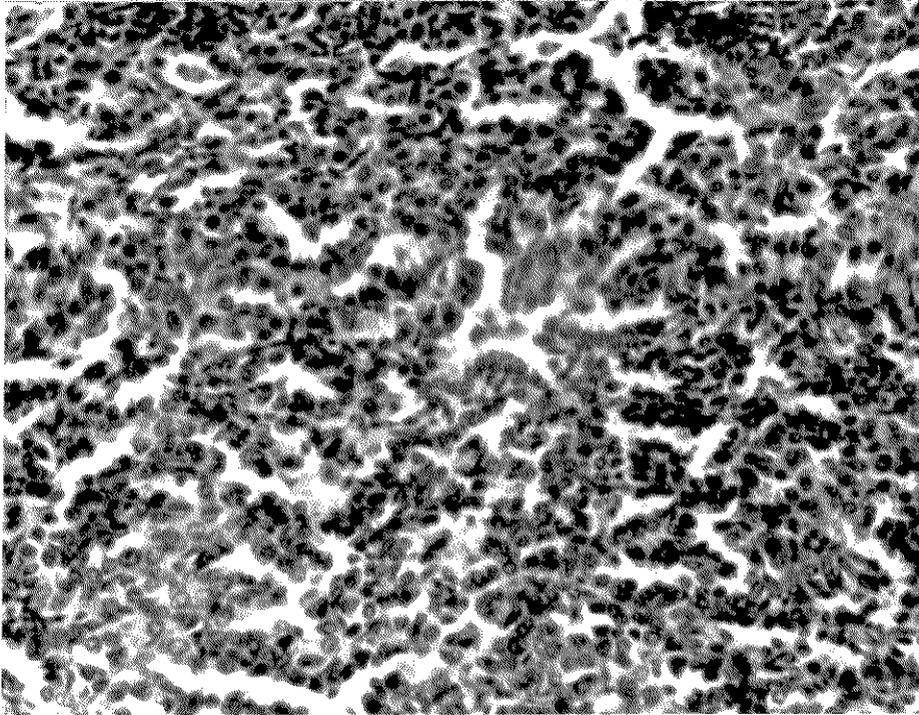


Figura 21. Nos tumores pulmonares produzidos pela DMN, as células tumorais se organizam em cordões, os quais se anastomosam livremente, formando estruturas que lembram túbulos ou ductos condutores. Coloração pela hematoxilina e eosina. Ampliação total 750X .

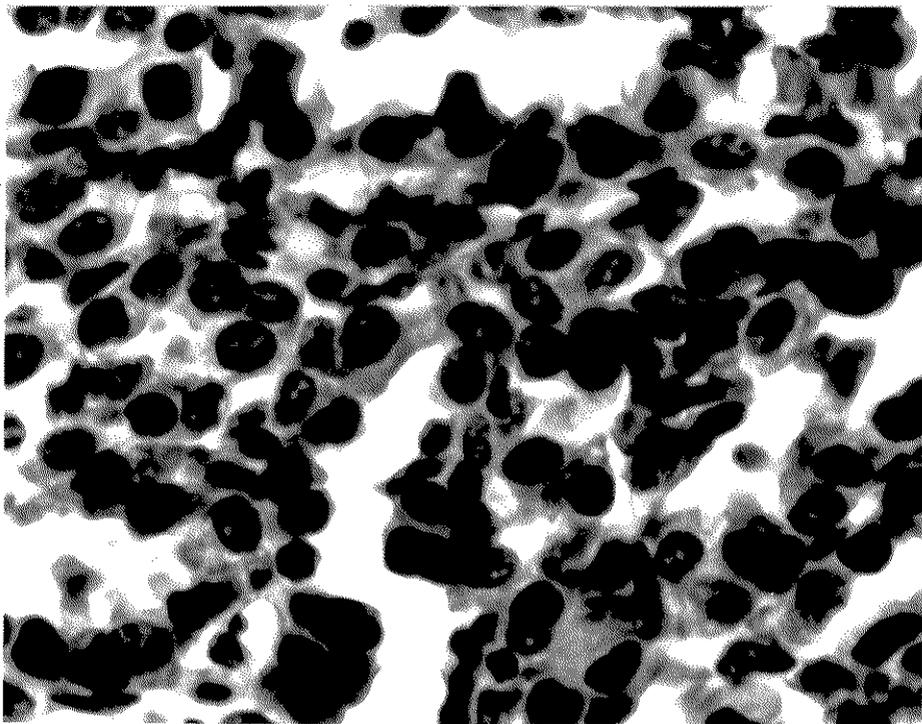


Figura 22. Aspectos da celularidade dos tumores pulmonares produzidos pela DMN. As células tumorais, intimamente agrupadas, mostram núcleos polimórficos e atípicos. A maioria deles cora-se fortemente pela hematoxilina (hiperchromismo). Coloração pela hematoxilina e eosina. Ampliação total 3000X.

Certas regiões dos pulmões analisados (quando não, todo um lobo pulmonar) mostram uma grande retenção de sangue. As observações nos levam a caracterizar um quadro de estase sanguínea.

Essa retenção local do fluxo sanguíneo deve-se à desorganização do parênquima pulmonar, ocasionada pelo crescimento exacerbado dos nódulos tumorais. Esse crescimento comprime e pressiona veias e capilares, estrangulando-os, provocando dessa forma, sérios transtornos na pequena circulação.

O território hiperêmico é revelado pela presença de zonas hemorrágicas, onde os alvéolos se acham repletos de elementos figurados do sangue, particularmente hemácias.

6. Citofotometria dos núcleos dos tumores pulmonares.

Como já foi dito, a natureza dos nódulos pulmonares tornou possível a realização de decalques desses tumores, à semelhança do que fizemos com o fígado. Obtivemos assim, isoladamente, núcleos de células cancerosas, os quais foram corados com a reação de Feulgen. O passo seguinte, foi utilizar o método do duplo comprimento de onda para quantificar o DNA desses núcleos.

Para controle, efetuamos decalques de pulmões normais. Os lobos eram seccionados transversalmente, obtendo-se uma superfície de corte o mais uniforme possível. Essa superfície era então encostada junto a uma lâmina de vidro, em toques sucessivos e delicados ao longo da mesma. Obteve-se assim, populações de núcleos representativas do órgão normal.

A determinação dos valores de m_t para esses núcleos revelou, como era de se esperar, que o parênquima pulmonar normal é

constituído, basicamente, por uma população de células diplóides.

Os tumores analisados mostram a presença de núcleos que se distribuem formando classes de ploidia diferentes. Essas classes mantêm, entre si, uma relação de múltiplo exato; isto é, os núcleos de cada uma possuem o dobro da quantidade de DNA da anterior (fig. 23).

Em ambos os tumores, a maioria dos núcleos situa-se na classe 2C. A classe 4C é, também, bastante numerosa, enquanto que núcleos 8C só ocorrem, praticamente, no tumor 70 (fig. 23, tab.2). Por outro lado, no tumor 63, há uma grande quantidade de núcleos na classe " C ", provavelmente, núcleos hipodiplóides (fig. 23 tab. 2).

A moda, em cada distribuição de núcleos tumorais, acha-se deslocada para a esquerda (valores Feulgen-DNA inferiores) quando se compara com a moda da distribuição de núcleos controle (fig.23). Especialmente no tumor 63, onde ela se encontra junto à linha divisória entre as classes C e 2C.

Tabela 2. Porcentagem de núcleos em cada classe de ploidia nos tumores pulmonares.

Classe de ploidia.	Controle	Tumor 63	Tumor 70
C		27%	3%
2C	49%	46%	63%
4C	1%	26%	24%
8C		1%	9%
16 c			1%

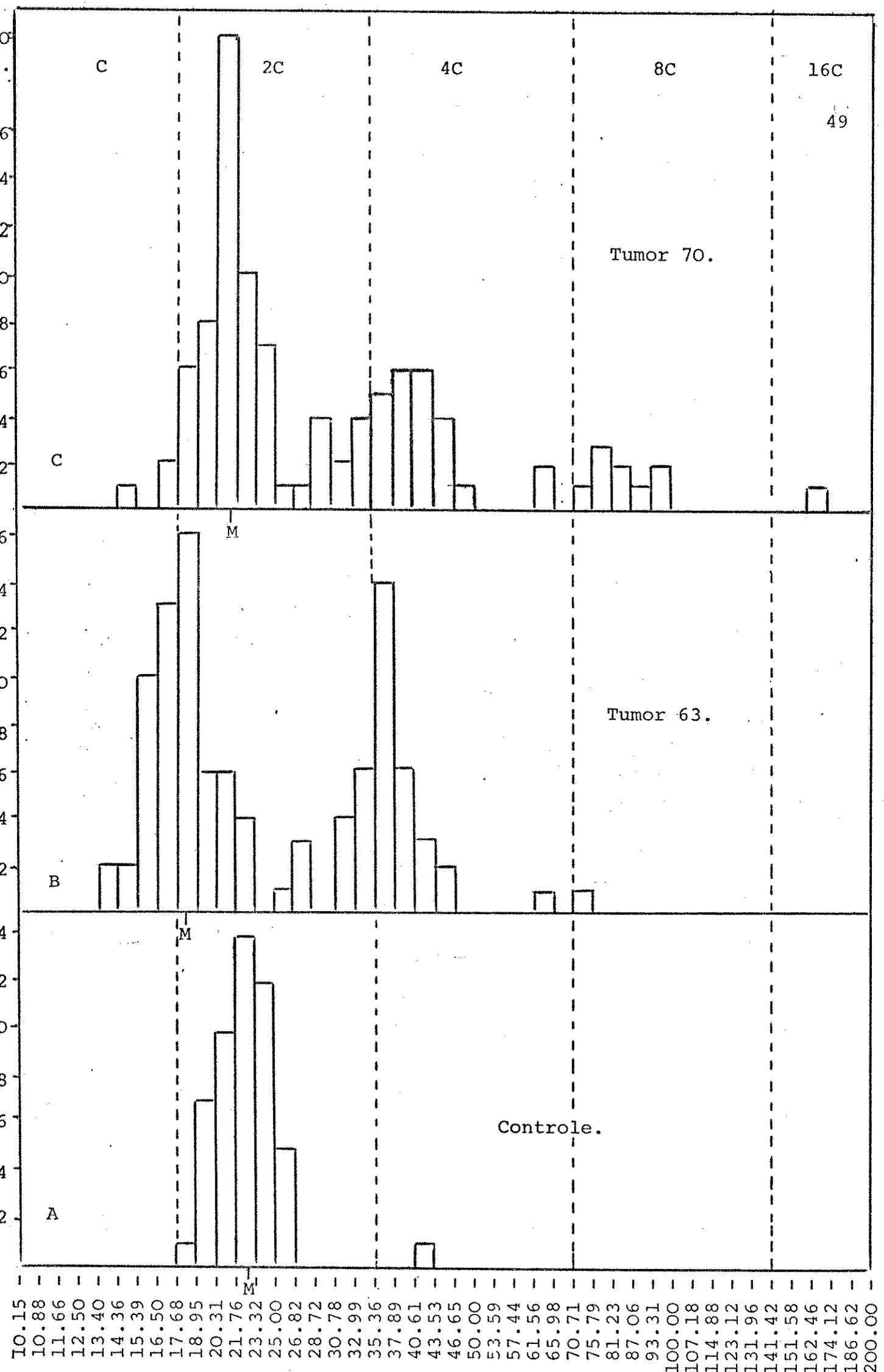


Figura 23. Citofotometria dos tumores pulmonares. Em A, distribuição de

50 núcleos controle (pulmão normal). Em B, 100 núcleos do tumor 63. Em C, 100 núcleos do tumor 70. Os núcleos tumorais se distribuem em classes de ploidia distintas; cada classe mostrando o dobro da quantidade de DNA da anterior. Ambos os tumores exibem uma moda, que se acha deslocada para a esquerda (valores Feulgen-DNA inferiores), quando se compara com a moda da distribuição de núcleos controle.

IV - DISCUSSÃO

1. Citopatologia do fígado

1.1. Alterações no citoplasma dos hepatócitos

Vacúolos de diferentes tamanhos aparecem no citoplasma de hepatócitos de ratos durante a administração de dietilnitrosamina, uma outra nitrosamina de ação carcinogênica (Grundmann, 1963) e, de acordo com Burdette (1970), desarranjo dos ribossomos e vacuolização de membranas do retículo endoplasmático de hepatócitos, são fenômenos comuns, quando da administração de alquilnitrosaminas em ratos.

Análises ultraestruturais mostraram que uma dose de 50 mg de DMN por Kg de peso corporal provoca, nas células do fígado, após 3 horas de sua administração, dilatação e vacuolização do retículo endoplasmático, além do desligamento das partículas ribossômicas a ele aderidas. Sob estas condições não se observou alterações na morfologia nuclear e mitocondrial, indicando que o efeito primário da DMN deve se fazer sobre o retículo endoplasmático (Magee e Schoental, 1964). De sorte que, pode-se propor que, a vacuolização do citoplasma dos hepatócitos, observada logo no início do tratamento com DMN deve-se, provavelmente, a distúrbios ocasionados pela droga, no sistema de membranas que constitui o retículo endoplasmático da célula.

1.2. Aumento no volume de núcleos e nucléolos dos hepatócitos.

Como relatamos em resultados, a DMN provoca um sensível aumento no volume dos núcleos e nucléolos dos hepatócitos.

Mudanças similares a essas são descritas por diversos autores, utilizando outros agentes químicos, também com ação cancerígena.

Dentre as alterações citomorfológicas detectadas por Grundmann (1963) e Grundmann e Fechner (1965), durante a hepatocancerização por dietilnitrosamina, está o aumento no volume dos núcleos e, em particular, dos nucléolos.

Dimetilaminoazobenzeno, um outro hepatocarcinogênico, também provoca marcantes aumentos nos volumes de núcleo e nucléolos (Koulisch e Lessler, 1962 e Kasten, 1970).

Sabe-se que mudanças no volume nuclear ocorrem prontamente sob certas condições fisiológicas ou patológicas.

O fator ou os fatores que determinam tais mudanças variam - aneuploidia, poliploidia, politenia, aumento na quantidade de proteínas nucleares, retenção de água etc - podem estar envolvidos.

A contribuição exata de cada uma dessas causas, em se tratando do aumento de volume nuclear, no caso de tecido tumorais ou em fase pré-tumoral, precisa ser melhor esclarecida (Koulisch e Lessler, 1962).

Se o aumento das dimensões nucleares é evidente durante a cancerização do fígado pelos agentes químicos anteriormente citados, muito mais notável é o incremento no volume dos nucléolos.

Aliás, segundo Amorim (1964), já em 1934, Houmeder pretendia estabelecer o diagnóstico de malignidade com base nessa al

teração, dada sua constância em células tumorais.

Grundmann e Fechner (1965) detectaram, durante a fase de pré-cancerização com dietilnitrosamina, aumentos superiores a três vezes nos volumes nucleolares. Paralelamente, a concentração de RNA por nucléolo caiu, indicando que o aumento de volume não se fez acompanhar por um aumento proporcional na quantidade desse ácido nucleico. Por outro lado, encontrou-se uma concentração de RNA muito alta nos nucléolos dos primeiros nódulos tumorais.

Esses dados parecem indicar que há durante o processo de cancerização, um incremento no metabolismo proteico e do RNA.

Como se sabe, os nucléolos são os locais de produção do RNA ribossômico (RNAr 45S). Admite-se que um aumento na síntese de RNAr implica numa maior produção de ribossomos e proteínas.

Porém, o significado exato dessas alterações e sua relação com o câncer é discutível.

Grundmann (1963) sugere que a destruição de proteínas citoplasmáticas, por agentes alquilantes como DMN e DEN, estimularia a síntese proteica (para reposição das perdas), através de mecanismos reguladores intracelulares.

A ativação desses mecanismos levaria a um aumento na produção de RNA, inclusive de RNAr.

Com a administração constante do agente alquilante, formar-se-ia um círculo vicioso de destruição e síntese de proteínas, o que explicaria, de certa forma, o incremento no volume dos nucléolos.

1.3. Descompactação dos cromocentros

As heterocromatinas podem ser classificadas em constitutivas e facultativas.

Heterocromatina constitutiva é aquela que ocorre em regiões correspondentes de ambos os cromossomos homólogos, sendo considerada como não codificadora.

A facultativa está presente em apenas um dos cromossomos do par, sendo catalogada como inativa, ou seja, não responde a estímulos de transcrição, devido, provavelmente, a modificações na sua estrutura quaternária. Os seus genes podem, no entanto, voltar à atividade, ou terem sido ativos, em algum período de desenvolvimento do organismo (Mello, 1978).

Os cromocentros dos núcleos de hepatócitos de camundongo são formados por uma heterocromatina do tipo constitutivo.

Nos cromossomos metafásicos do animal, essa mesma heterocromatina, aparece junto à região dos centrômeros (heterocromatina centromérica), como ficou demonstrado por experimentos de hibridização " in situ " (Pardue e Gall, 1970).

O seu DNA é, basicamente, um DNA satélite, que representa acima de 70% do DNA satélite total nuclear.

Esse DNA satélite, por sua vez, é rico em pares A-T (razão A+T / G+C igual a 2,03) e, acredita-se que ele seja constituído por sequências altamente repetitivas de polinucleotídeos (Yasmineh e Yunis, 1970).

Diante do que foi dito até agora, a descompactação dos cromocentros provocada pela DMN, uma substância cancerígena, assume aspectos importantes.

Atribui-se atualmente às heterocromatinas constitutivas funções de natureza estrutural, tais como: manutenção da organização nuclear, proteção de regiões vitais do genoma, participação em mecanismos de pareamento na meiose etc (Yunis e Yasmineh, 1971).

Acredita-se que a heterocromatina centromérica confira resistência e força a essa região vital dos cromossomos, garantindo a separação adequada dos mesmos, durante os processos de divisão celular (Yunis e Yasmineh, 1971).

Quais seriam, portanto, os efeitos ou consequências de modificações na estrutura íntima dessa heterocromatina, para a célula como um todo?

Yunis e Yasmineh (1971), sugerem que as aberrações estruturais e numéricas, comumente observadas em cromossomos de células tumorais, podem estar relacionadas com danos na heterocromatina constitutiva. Isto, graças a sua suscetibilidade a quebras por agentes mutagênicos, sua natureza repetitiva, e sua tendência a formar agregados durante o ciclo celular.

Lilly et al (1975) descreveram aberrações cromossômicas produzidas pela dimetilnitrosamina em linfócitos de rato.

Neste experimento, DMN foi injetada intraperitonealmente, numa dose de 30 mg / Kg de peso corporal, nos ratos. Depois de 6 horas da administração da droga, o sangue foi coletado e mantido em cultura por 48 horas, após o que, fez-se a análise das metáfases.

As principais aberrações são descritas como do tipo em que há quebra nas cromátides.

Por outro lado, se a DMN é adicionada " in vitro ", isto é, diretamente no meio de cultura e não no animal, o número de aberrações não difere significativamente do controle.

Isto mostra, como já foi dito antes, que a DMN deve ser ativada no organismo, presumivelmente no fígado, antes de produzir seus efeitos deletérios.

Estes resultados mostram também, que os intermediários metabólicos ativos da DMN, devem possuir estabilidade suficiente,

para passar de seus sítios de formação no fígado (ou em outros órgãos) e alcançar os núcleos dos linfócitos circulantes.

Voltaremos a este aspecto do problema, quando tratarmos da formação dos tumores pulmonares.

Aberrações cromossômicas nos hepatócitos, poderiam explicar, pelo menos em parte, o aparecimento de núcleos com quantidades anômalas de DNA, como ficou determinado pela citofotometria .

Contudo, a descompactação da heterocromatina que forma os cromocentros, pode ter implicações outras, que não as de natureza exclusivamente estrutural.

Segundo Yasmineh e Yunis (1970), Harel e colaboradores' relataram em 1968, a formação de híbridos estáveis entre RNA de marcação rápida e DNA satélite extraído de tecidos de camundongo.

Se confirmados, esses resultados estabeleceriam evidência em favor da atividade genética do DNA satélite e, possivelmente, da heterocromatina constitutiva.

Neste caso, a descompactação dos cromocentros poderia estar relacionada com a ativação de genes aí localizados.

Sandritter et al (1974) efetuaram a análise de carcinomas de mama, por meio de citofotometria de varredura acoplada a sistemas de computação.

Os resultados mostraram que, nestes tumores, apenas 6% do DNA está na forma de cromocentros; enquanto que no núcleo normal, 13% do DNA se encontra nesta forma.

A partir desses dados, os autores concluem que as células tumorais operam com uma proporção maior de sua informação genética.

Da mesma forma, técnicas de hibridização mostraram que em células normais cultivadas, apenas 20% de seu DNA é expresso, enquanto que em células transformadas por vírus, 30% de seu DNA pa-

rece ser ativo (Sandritter et al, 1974).

O conceito defendido até bem pouco tempo atrás, de que a transformação maligna era um evento rápido e único, cedeu lugar diante das evidências, à formulação de que o aparecimento do câncer envolve um aglomerado de alterações, as quais se sucedem de maneira progressiva e sequencial (Farber, 1971).

Dentro desse esquema, é possível que a ativação de certos genes ou segmentos de DNA, normalmente repressos na célula sadia, seja um dos fenômenos envolvidos na transformação maligna.

2. Alterações na constituição das classes de ploidia do fígado.

As alterações nos padrões de distribuição dos valores Feulgen-DNA, por nós detectados, durante o tratamento com DMN, parecem ser comuns à administração de outros agentes hepatocarcinogênicos.

Dietilnitrosamina (DEN) provoca, em fígado de rato após 15 dias do início de sua administração, o aparecimento de núcleos 16N. No respectivo controle, a classe mais elevada é a 8N. Com 45 dias de tratamento, essa classe anômala se insinua de forma mais evidente (Grundmann, 1963).

Kasten (1970) descreve o aparecimento de classes de ploidia atípicas, em fígado de rato, após apenas 8 dias de tratamento com dimetilaminoazobenzeno (DAB). Neste período, a mudan-

ça mais significativa foi o surgimento de núcleos com valores de DNA dentro da faixa triplóide. À medida que o tratamento se prolonga, essas modificações se insinuam de forma mais grave. Há o achatamento dos picos das classes $2n$, $4n$ e $8n$, com uma maior dispersão dos valores Feulgen-DNA, ao longo da escala utilizada. Consequentemente, os limites entre as classes de ploidia tornam-se cada vez menos nítidos. Nota-se dessa maneira, que durante o processo de carcinização com DAB, há um aumento da proliferação celular, já a partir da primeira semana de dieta com a droga. É sugerido que o agente carcinogênico em questão atua prontamente nos mecanismos de controle da síntese de DNA, promovendo um incremento em tal processo.

Em alguns dos hepatomas produzidos com DAB, há uma dispersão dos valores Feulgen-DNA, sem o aparecimento de picos ou modas dominantes. Já em outros tumores da mesma espécie, os núcleos se concentram em intervalos mais estreitos, determinando o surgimento de modas dominantes, as quais podem aparecer em posição diplóide, hipodiplóide ou hiperdiplóide (Kasten, 1970).

Grundmann (1963) também detectou, em hepatocarcinoma produzido por DEN, núcleos dentro da faixa triplóide. De acordo com o autor, a presença desses núcleos sugere o nascimento de uma linhagem celular ou " stem line ", segundo o conceito emitido por Makino (1957).

As justificativas para o aparecimento de classes de ploidia anômalas variam.

De um lado, pode-se admitir que há um incremento no número de núcleos em fase de síntese de DNA, na preparação para divisão (ou endomitose) subsequente.

De outro lado, o fenômeno pode estar relacionado com irregularidades no processo de duplicação e separação dos cromossomos ,

durante a divisão celular.

Medidas citofotométricas de grupos cromossômicos em metáfase e anáfase, revelaram, em fígado de ratos tratados com DAB, a presença de valores Feulgen-DNA intermediários (Koulisch e Lessler, 1962).

A irregularidade de tais lotes cromossômicos indica, numa conclusão preliminar, possíveis falhas nos processos de duplicação e separação dos cromossomos, durante o ciclo celular.

Aberrações cromossômicas numéricas ou estruturais, são distúrbios comuns em populações de células tumorais.

Tais anormalidades podem estar relacionadas com danos ou mutações nas regiões centroméricas dos cromossomos, cuja integridade é fundamental para a separação dos mesmos durante a mitose.

Há que se lembrar ainda, que com a descompactação da heterocromatina, sua resistência à hidrólise ácida diminui, podendo haver despolimerização do ácido apurínico num tempo mais curto de hidrólise, com perdas de porções de DNA e/ou ácido apurínico (Mello e Raimundo, 1977). Tal fenômeno deve contribuir para o aparecimento de núcleos com quantidades de DNA anômalas, nos animais tratados com DMN.

3. Resumo das alterações hepáticas encontradas.

Apesar de não terem sido produzidos dentro de condições experimentais por nós utilizadas, hepatomas típicos, as alterações introduzidas pela DMN no fígado de camundongo, não deixam dúvidas sobre as potencialidades citotóxicas dessa droga. Se não queremos lembrar:

- a) As alterações na forma e no volume dos núcleos de hepatócitos.
- b) As modificações na estrutura da cromatina desses núcleos, particularmente a descompactação dos cromocentros.
- c) O aumento no volume dos nucléolos.
- d) As anomalias na formação e composição das classes de ploidia.

4. Tumores pulmonares.

4.1. Origem e morfologia dos tumores pulmonares.

Muitas das neoplasias pulmonares experimentalmente produzidas, têm origem na área bronquíolo-alveolar.

Injeções intratraqueais com 3-metilcolantreno produzem, em ratos, tumores de células escamosas, de origem bronquíolo-alveolar. Numa etapa inicial, tais tumores mostram-se bem diferenciados sendo do tipo queratinizante e histologicamente benignos. Contudo, após 5 meses de tratamento, uma marcante atipia, assim como o aparecimento de metástases, denunciam a malignidade dessas formações tumorais (Nettessheim e Schreiber, 1975).

Os agentes químicos causadores de câncer nas vias respiratórias são, na sua maioria, contaminantes do ar atmosférico.

No entanto, algumas substâncias, dentre elas as nitrosaminas, têm o poder de induzir cânceres no trato respiratório, independentemente de seu ponto de entrada no organismo (Nettessheim e Schreiber, 1975 e Warzok e Thust, 1977).

Warzok e Thust (1977), lograram produzir em hamsters (Dzungarian dwarf hamsters), tumores pulmonares, após a aplicação transplacental de dietilnitrosamina. Fêmeas grávidas receberam uma injeção intraperitoneal de dietilnitrosamina, numa concentração de 30 mg / Kg de peso corporal. Dentre os 29 animais nascidos dessas fêmeas, 21 sobreviveram mais de 126 dias, quando o primeiro tumor foi registrado. No cômputo geral, 16 dos 21 animais (76,2%) desenvolveram tumores pulmonares.

Os neoplasmas são classificados como adenocarcinomas derivados do crescimento do epitélio de pequenos bronquíolos. Em diferentes partes desses tumores, estruturas semelhantes a glândulas, com um padrão ora tubular, ora alveolar, ou ainda papilar, podem ocorrer simultaneamente. Segundo os autores, essas estruturas histológicas representam diferentes potencialidades de uma mesma célula epitelial.

Por outro lado, estudando o desenvolvimento de tumores pulmonares produzidos pela administração intratraqueal de benzopireno, em hamsters (Syrian golden hamsters), Stenback (1973) conclui que estes animais respondem de forma diferente dos camundongos quando da aplicação de agentes carcinogênicos. Neste experimento, a maior parte dos tumores desenvolveu-se no trato respiratório superior. Os adenocarcinomas são de origem broncogênica, isto é formam-se a partir do epitélio dos bronquios.

Já em camundongos, os tumores do trato respiratório inferior, em particular os de origem bronquíolo-alveolar, são muito mais comuns.

4.2 Aspectos etiológicos e bioquímicos da produção de tumores pulmonares.

Nas últimas décadas a mortalidade por câncer de pulmão vem aumentando rapidamente nos países desenvolvidos (Nettesheim e Schreiber, 1975).

Este fenômeno desperta a atenção para os possíveis fatores etiológicos envolvidos na indução de tumores pulmonares.

Há pouca dúvida a respeito de que, são os agentes químicos introduzidos pelo homem, em seu próprio meio ambiente, os causadores desse incremento na frequência dos cânceres pulmonares.

A indução de cânceres de pulmão por nitrosaminas administradas via tubo digestivo, abre novas perspectivas para as pesquisas de caráter etiológico, dentro desse campo.

Segundo Lijinsky et al (1973), nitrosaminas podem ser formadas no trato gastrointestinal, mediante a reação de nitritos presentes nos alimentos com aminas secundárias e terciárias ingeridas deliberadamente ou incidentalmente.

Os autores admitem dessa forma, a possibilidade de se formarem nitrosaminas carcinogênicas a partir de aminas presentes na fumaça do cigarro, engolidas com a saliva, e nitritos ingeridos na alimentação.

Tal explicação dá outro enfoque ao aparecimento de cânceres pulmonares em fumantes.

Segundo essa hipótese, o fato de muitos usuários de cigarros não desenvolverem tumores pulmonares, poderia ser explicado pela sua baixa ingestão de nitritos.

Ainda segundo Lijinsky et al (1973), a rapidez com que a aminopirina reage com nitritos, mesmo as baixas concentrações para formar dimetilnitrosamina, sugere que, a ingestão continuada dessa droga, em associação com alimentos contendo nitritos, pode representar uma fonte considerável do agente carcinogênico.

O uso de aminopirina foi proibido em certos países, entre

eles os Estados Unidos da América, mas ainda é livre em várias partes do mundo (Lijinsky et al, 1973).

Recentemente, Harris et al (1977) demonstraram que a DMN provoca a metilação do DNA de brônquios humanos mantidos em cultura de tecidos. Ambas as posições 0-6 e N-7 da guanina são metiladas. Esses resultados indicam que o epitélio bronquial tem a capacidade de metabolizar a DMN até intermediários reativos, que provocam a metilação do DNA.

Assim sendo, é possível que, no caso específico dos camundongos, o epitélio das vias respiratórias seja capaz de metabolizar a DMN até intermediários carcinogênicos, os quais atuariam localmente, desencadeando o processo de transformação maligna. Daí a alta incidência de tumores verificada em nosso trabalho.

Entretanto, a hipótese segundo a qual a ativação da DMN se faria no fígado, não deve ser descartada por completo.

Como já foi dito anteriormente, experimentos com ratos demonstraram que os intermediários metabólicos da DMN possuem uma certa estabilidade, sendo capazes de alcançar os vasos sanguíneos, para aí produzirem aberrações cromossômicas em linfócitos circulantes (Lilly et al, 1975).

Neste caso, deve-se admitir que tais intermediários atuariam à distância. Produzidos no fígado, eles iriam induzir a formação de cânceres nos pulmões.

No entanto, tal hipótese levanta uma questão importante, ou seja: por que não se formaram hepatomas típicos no fígado?

Embora o assunto mereça estudos mais detalhados, quer-se crer que há uma relação órgão-específica muito estreita entre dose do agente carcinogênico - tempo de administração - espécie animal utilizada e órgão atingido.

Qualquer modificação, por menor que seja, nestas variáveis

deve provocar diferentes respostas ao agente carcinogênico.

4.3. Análise citofotométrica dos tumores pulmonares.

Conceito de " stem line cells ".

O conceito de " stem line cells " baseia-se em dados morfológicos e estatísticos, obtidos a partir da análise cromossômica de inúmeros tumores ascíticos de ratos.

Segundo este conceito, cada tumor possui uma (ou mais de uma) linhagem de células, células estas que se constituem na principal fonte de crescimento do tumor.

Tais populações celulares se caracterizam por ocorrerem com uma alta frequência, por possuírem um padrão cromossômico característico e por um comportamento mitótico regular dos cromossomos.

A contagem cromossômica nesses tumores mostra o aparecimento de modas características (chromosome stem lines), indicando a presença das células responsáveis pela progênie dos mesmos (Makino, 1957).

Analogamente, utiliza-se a expressão " DNA stem line ", na referência a valores predominantes, em histogramas obtidos a partir da análise citofotométrica de tumores (Kiefer e Sandritter , 1976).

O reconhecimento de uma população predominante nem sempre é fácil. Os valores de DNA podem se distribuir por intervalos amplos, devido à proliferação celular e poliploidização.

Em tais casos, não há muito sentido falar-se em " stem line ", embora seja possível calcular-se por meios matemáticos, um valor médio de maior frequência.

Isto é mais comum em tumores indiferenciados, onde os valores de DNA se distribuem sem o aparecimento de modas características.

Já nos tumores com alto grau de diferenciação, o aparecimento de linhagens ou populações predominantes (stem lines) é mais frequente. (Kiefer e Sandritter, 1976).

Enquanto tumores benignos mostram, com algumas exceções modas diplóides, a aneuploidia é uma característica confiável de malignidade (Kiefer e Sandritter, 1976).

Atkin (1969), analisando citofotométricamente, 119 tumores malignos humanos (a maioria carcinomas), encontrou dados corroboradores do conceito de " stem line cells ".

Cada um dos tumores apresentava uma moda proeminente ao redor da qual, outras classes de ploidia apareciam.

Nos tumores pulmonares por nós analisados, a moda sofre um deslocamento no sentido de valores hipodiplóides. Principalmente, no tumor 63, onde inclusive, há uma grande população de células hipodiplóides (27%). Tais populações predominantes devem constituir as linhagens celulares ("stem line cells") responsáveis pelo crescimento dos tumores. As classes hiperdiplóides presentes nos histogramas se originaram, provavelmente, pela multiplicação do conteúdo de DNA dessas células. O parênquima tumoral sofreu, por tanto, um processo de poliploidização.

É interessante citar que o conceito de " stem line cells " tem importantes implicações terapêuticas (Kraemer et al, 1971). Um agente quimioterápico só será realmente eficaz se atuar destruindo as células responsáveis pelo crescimento do tumor (stem line cells). Caso contrário, uma vez suspensa a medicação, essas células voltarão a proliferar, reconstituindo a formação maligna .

Além destas considerações, cabe também lembrar a utilidade

prática das medidas citofotométricas de DNA, que vêm sendo utilizada das cada vez mais no diagnóstico e mesmo controle terapêutico de cânceres; veja-se por exemplo o livro de Andreeff (1975).

V - CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais utilizadas, a DMN provoca, em camundongos, os seguintes fenômenos:

19) Descompactação ou dissolução dos cromocentros dos núcleos dos hepatócitos. Tal fenômeno é detectado desde o início do tratamento (3 semanas), intensificando-se com o transcorrer do mesmo.

29) Alterações nos padrões de distribuição dos valores Feulgen-DNA dos núcleos de hepatócitos. Tais alterações incluem :

- a) aparecimento precoce de núcleos de classes de ploidia mais avançadas,
- b) surgimento de núcleos " hipodiplóides " (classe C) ,
- c) redução ou deslocamento de populações de classes de ploidia,
- d) achatamento dos picos de classes de ploidia (maior dispersão dos valores Feulgen-DNA) à medida que o tratamento se prolonga.

39) Formação de tumores malignos primários no pulmão.

A necrôpsia dos animais mortos a partir do 59 mês de tratamento revelou, em todos eles, a presença de tumores pulmonares. São carcinomas oriundos, provavelmente, do epitélio de pequenos bronquíolos. A análise citofotométrica de dois desses tumores revelou a ocorrência de processos de poliploidização no parênquima tumoral.

VI - SUMÁRIO

Noventa e um camundongos (42 machos e 49 fêmeas) receberam dimetilnitrosamina na água de beber, durante 6 meses, com a seguinte concentração:

- a) 17 ppm (partes por milhão), durante o primeiro mês.
- b) 10,6 ppm durante os cinco meses restantes.

A solução contendo a droga foi oferecida " ad libitum ".

Nestas circunstâncias, a DMN provoca diversas modificações nos núcleos de hepatócitos, tais como são vistos após a reação de Feulgen. Os cromocentros desses núcleos (heterocromatina constitutiva) sofrem um processo de dissolução ou descompactação. Paralelamente, determinações citofotométricas revelaram alterações nos padrões de distribuição dos valores Feulgen-DNA de tais núcleos. Há que se relatar ainda, um notável aumento no volume de seus nucléolos. Os próprios núcleos também sofrem modificações na forma e aumento de volume porém, de natureza mais discreta.

Além das alterações hepáticas, desenvolveram-se tumores malignos primários nos pulmões. De fato, todos os animais que completaram os seis meses de tratamento, mostravam tumores pulmonares. Os mesmos foram classificados como adenocarcinomas oriundos, provavelmente, do epitélio de pequenos bronquíolos. A análise citofotométrica de dois desses tumores revelou a ocorrência de processos de poliploidização no parênquima tumoral.

Os dados são discutidos com base em achados recentes à respeito da ação bioquímica da DMN e sua relação com o aparecimento do câncer. Valemo-nos também do conceito de " stem line cell "

(Makino, 1957) para interpretação de certos achados citofotométricos.

VII - SUMMARY

Ninety one mice* (42 males and 49 females) received dimethylnitrosamine (DMN) in the drinking water, " ad libitum " during six months. The concentration of DMN in the water varied from:

- a) 17 ppm (parts per milion) during the first month to ,
- b) 10,6 ppm during the other five months.

DMN produces several changes in hepatocyte nuclei, as seen by Feulgen's reaction. Dissolution of its chromocenters (constitutive heterochromatin) is one of the alterations described. There is also a considerable increase in nuclear and nucleolar volumes (especially in the last one). Simultaneously , cytophotometric measurements revealed modifications in the distribution patterns of Feulgen-DNA values of these nuclei.

Besides the hepatic modifications, DMN caused the development of primary malignant tumors in the lungs. Actually, all the animals that survived to 6 months of treatment, showed lung tumors. They were classified as adenocarcinomas derived from outgrowths of the epithelium of small bronchioles. Cytophotometric analysis performed in two of these tumors showed the occurrence of polyploidy in tumoral parenchyma.

The data are discussed in view of recent findings concerning DMN mode of action and cancer development. Makino's stem line cell theory, which has important implications for tumor therapy, is also discussed.

VIII - BIBLIOGRAFIA

- AMORIM, M.F. Patologia dos tumores. São Paulo, Fundo Editorial Prociencx, 1964.
- ANDREEFF, M. Impulscytophotometrie. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1975.
- ATKIN, N.B. Perimodal variation of DNA values of normal and malignant cells. Acta Cytol., 13 (5): 270 - 274, 1969.
- BARLOGIE, B. Determination of ploidy and proliferative characteristics of human solid tumors by pulse cytophotometry. Cancer Res., 38 (10): 3333-3339, 1978.
- BASSIR, O. & MADUAGWU; E.N. Occurrence of nitrate, nitrite, dimethylamine and dimethylnitrosamine in some fermented nigerian beverages. Agric. Food. Chem., 26 (1): 200-203, 1978.
- BERNHARD, W. Ultrastructure of the cancer cell. In: Lima de Faria, A. (ed). Handbook of Molecular Biology. Amsterdam, North Holland Publish. Co., 1969.
- BIESELE, J.J. Some morphological effects of alkylating agents. Exp. Cell Res., suppl. 9 : 525-534, 1963.
- BRODSKY, W.YA. & URIVAEVÁ, I.V. Cell polyploidy: Its relation to tissue growth and function. In: BOURNE, G.H. & DANIELLI, J.F., ed. International Review of Cytology. N.Y., S. Fran -

cisco, London, Academic Press, 1977. Vol. 50, p. 275-332.

BURDETTE, W.J. Hepatic carcinogenesis. In: PACK, G.T. & ISLAM, A.H., ed. Tumors of the liver. Berlin, Heidelberg, N.Y., Springer-Verlag, 1970. p. 53-71.

ENGELSE, L. & PHILIPPUS, E.J. In vivo repair of rat liver DNA damaged by dimethylnitrosamine or diethylnitrosamine. Chem-Bio. Interact., 19 (1): 111-124, 1977.

FAGEN, J.M. et al. N-nitrosamines in the rubber and tire industry. Science, 205 (4412): p. 1262-1264, 1979.

FARBER, E. Studies on the molecular mechanisms of carcinogenesis. In: WHELAN, W.J. & SCHULZ, J., ed. Homologies in enzymes and metabolic pathways. Metabolic alterations in cancer. Amsterdam, North Holland Publ. Co., 1971. p. 314-334.

FERREIRA, A.L., LISON, L. e VALERI, V. Caryometric study of spermatogenesis in the rat. Z. Zellforsch., 76 (1) : 31-55, 1967.

GOMES, M.I.D., SWANN, P.F. e MAGEE, P.N. The absorption and metabolism in rats of small oral doses of dimethylnitrosamine: Implication for the possible hazard of dimethylnitrosamine in human food. Biochem J., 164 (3): 497-500, 1977.

GRAY, J.I., COLLINS, M.E., e MACDONALD, B. Precursors of dimethylnitrosamine in fried bacon. J. Food Prot., 41 (1): 31 - 35, 1978.

GRUNDMANN, E. Quantitative cytochemistry of carcinogenesis in the rat liver. Acta Unio. Intern. Contra Cancrum, 19, p.571-575, 1963.

GRUNDMANN, E. & FECHLER, W. RNS - Gehalt und Volumen der Nucleolen in der Rattenleber wahrend der experimentellen Carcinogenese durch Diathylnitrosamin. Zeitschrift fur Krebsforschung, 67, p. 80-92, 1965-

HARRIS, C.C. , AUTRUP, H., STONER, G.D., McDOWELL, E.M., TRUMP, B.F., SCHAFFER, P. Metabolism of dimethylnitrosamine and 1,2- dimethylhydrazine in cultured human bronchi. Cancer Res., 37 (7 part 1): 2309-2311, 1977.

HOCH-LIGETI, C., ARGUS, M.F. e ARCOS, J.C. Combined carcinogenic effects of dimethylnitrosamine and 3-methylcolantrene in the rat. J. Nat. Cancer Inst., 40 (3): 535-549, 1968.

HURST, R.E. Dimethylnitrosamine levels in untreated herring meals. J. Sci. Food Agric., 27 (7): 600-602. 1976.

KASTEN, F.H. The potencial of quantitative cytochemistry in tumor and virus research. In: WIED, G.L. & BAR, G.F., eds. Introduction to quantitative Citochemistry - II. New York - London, Academic Press, 1970. p. 263-269.

KIEFER, G. & SANDRITTER, W. DNA and the cell cycle. Beitr. Pathol., 158 (4): 332-362, 1976.

- KOULISH, S. & LESSER, M.A. Cytological aspects of normal and tumorous liver. Cancer Res., 22 : p. 1188-1196, 1962.
- KRAEMER, P.M., PETERSON, D.F. e VAN DILLA, M.A. DNA consistency in heteroploidy and the Stem line Theory of Tumors. Science, 174 (4010): 714-717, 1971.
- LIJINSKY, W., TAYLOR, H.W., SNYDER, C., NETTESHEIM, P. Malignant tumors of liver and lung in rats fed aminopyrine or heptamethylneimine together whit nitrite. Nature (Lond.) , 224 : p. 176-178, 1973.
- LIJINSKY, W., SINGER, G.M. e TAYLOR, W.W. Carcinogenic N-nitroso compounds. In: Excerpta Medica Internacional Congress Series Nº 351 Vol. 3, Cancer epidemiology , environmental factors. Proceedings of the XI International Cancer Congress, Florence, 1974.
- LILLY, L.J., BAHNER, B. e MAGEE, P. N. Chromosome aberrations induced in rat lymphocytes by N-nitroso compounds as a possible basis for carcinogen screening. Nature, 258 :P.611-612, 1975.
- LOVELESS; A. Possible relevance of 0-6 alkilation of deoxiguanosine to mutagenicity of nitrosamines and nitrosamides. Nature, 223 : p. 206-208, 1969.
- MAGEE, P.N. & BARNES, J.M. The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine. Brit. J. Cancer, 10 : p. 114-122, 1956.

- MAGEE, P.N. & SCHOENTAL, R. Carcinogenesis by nitroso compounds. Brit. Med. Bull., 20 (2): 102-106, 1964.
- MARISON, G.P., MARGISON, J.M. e MONTESANO, R. Methylated purines in the deoxiribonucleic acid in various Siriam golden hamsters tissues after administration of a hepatic carcinogenic dose of dimethylnitrosamine. Biochem. J. , 157 (3): 627-634, 1976.
- MAKINO, S. The chromosome cytology of the ascites tumors of rats, with special reference to the concept of the Stemline cell. Int. Rev. Cyt., 6 : p. 25-84, 1957.
- MELLO, M.L.S. Método do duplo comprimento de onda. In _____ Estudo citoquímico e citofísico quantitativo de algumas hetero e eucromatinas - Dissertação apresentada ao Dep. de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Unicamp para obtenção do grau de Livre Docente - Campinas, 1976. p. 36-40.
- MELLO, M.L.S. & RAIMUNDO, H.H. Change with age of Feulgen - DNA values in the blood-sucking insect Triatoma infestans Klug . Histochemistry , 54 : 219-223, 1977.
- MELLO, M.L.S. Heterocromatina. Ciência e Cultura, 30 (3): 290 - 303, 1978.
- MILLS, A.L. & ALEXANDER, M. Factors affecting dimethylnitrosamine formation in samples of soil and water. J. Environ. Qual. 5 (4): 437-440, 1976.

MONTESANO, R. & MAGEE, P.N. Metabolism of dimethylnitrosamine by human liver slices " in vitro " . Nature, 228 : p. 173-174, 1970.

MULLER, H.A. Die Chromozentren in den Leberzellkernen der Maus unter normalen und pathologischen Bedingungen. Ergeb. allg. Path. Anat., 47 : 145-185, 1966.

NETTESHEIM, P. & SCREIBER, H. Advances in experimental lung cancer research. In: ALTMANN, H.H.W. et al., eds. Handbuch der allgemein Pathologie. Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag, 1975. p. 604-691.

O'CONNOR, P.J. CAPPS, M.J., CRAIG, A.W. Comparative studies of the hepatocarcinogen N,N-dimethylnitrosamine in vivo: reaction sites in rat liver DNA and the significance of their relative stabilities. Br. J. Cancer, 27: 153-166, 1973.

O'CONNOR, P.J. MARGISON, G.P. e CRAIG, A.W. Phosphotriesters in in rat liver DNA after the administration of the carcinogen N,N-dimethylnitrosamine in vivo. Biochem. J., 145 : p. 475-482, 1975.

PANCHOLY, S.K. Formation of carcinogenic nitrosamines in soils. Soil Biol. Biochem., 10 (1): 27-32, 1978.

PARDUE, M.L. & GALL, J.G. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. Science, 168 : p. 1356-1358, 1970.

PEGG, A:E: & HUI, G. Formation and subsequent removal of O - 6 methylguanine from deoxiribonucleic acid in rat liver and kidney after small doses of dimethylnitrosamine. Biochem. J. 173 (3): 739-749, 1978.

SANDRITTER, W., KIEFER, G., KIEFER, R., SALM, R., MOORE, G.W.e GRIMM, H. DNA in heterochromatin cytophotometric pattern recognition image analysis among cell nuclei in duct epithelium and in carcinoma of the human breast. Beitr. Path Ed., 151 : 87-96, 1974.

SCHOENTAL, R. The mechanisms of action of the carcinogenic nitroso and related compounds. Br.J. Cancer, 28 : p. 436-439, 1973.

STEMBACK, F. Morphologic characteristics of experimentally induced lung tumors and their precursors in hamsters. Acta Cytol. 17 (6) : 476-486, 1963.

TANNENBAUM, S.R., ARCHER, M.C., WISHNOK, J.S., BISHOP, W. Nitrosamine formation in human saliva. J. Natl. Cancer Inst., 60 (2): 251-254, 1978.

VIDAL, B.C., SCHUTER, G. e MOORE, G.W. Cell nucleus pattern recognition: Influence of staining. Acta Cytol., 17 (6):510-521, 1973.

VIDAL, B.C. & PIMENTEL, E.R. Ciclo celular: Determinação de G1, S e G2 por fluorometria. Rev. Bras. de Pesquisas Med. e Biol., 11 (6): 353-358, 1978.

WARZOK, R. & THUST, R. Morphology of diethylnitrosamine induced lung tumours in Dzungariam dwarf hamsters. Exp. Pathol. (Jena) 13 (1) : 44-51. 1977.

WASSERMAN, A.E., PENSABENE, J.W., PIOTROWSKI, E.G. Nitrosamine formation in home-cooked bacon. J. Food Sci., 43 (1): 276 - 277, 1978.

YASMINEH, W.G. & YUNIS, J.J. Localization of mouse satellite DNA in constitutive heterochromatin. Exp. Cell Res., 59 : p. 69-75, 1970.

YUNIS, J.J. & YASMINEH, W.E. Heterochromatin, DNA and cell function. Science, 174 : p. 1200, 1971.