

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE MEDICINA**



**AMANDA RAQUEL DA SILVA GOMES  
JULIANNE MARIA DA SILVA LIMA**

**ANÁLISE GENOTÓXICA E HISTOPATOLÓGICA DO EFEITO CARCINOGÊNICO  
GÁSTRICO DA EXPOSIÇÃO AO MNU EM PRIMATAS *Cebus Apella* DA  
AMAZÔNIA BRASILEIRA**



**BELÉM - PA  
2009**

**AMANDA RAQUEL DA SILVA GOMES  
JULIANNE MARIA DA SILVA LIMA**

**ANÁLISE GENOTÓXICA E HISTOPATOLÓGICA DO EFEITO CARCINOGENÉTICO  
GÁSTRICO DA EXPOSIÇÃO AO MNU EM PRIMATAS *Cebus Apella* DA  
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

**Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção  
do grau em Medicina pela Universidade  
Federal do Pará.  
Orientador: Dr. Paulo Pimentel de Assumpção.**

**BELÉM  
2009**

**AMANDA RAQUEL DA SILVA GOMES  
JULIANNE MARIA DA SILVA LIMA**

**ANÁLISE GENOTÓXICA E HISTOPATOLÓGICA DO EFEITO CARCINOGENÉTICO  
GÁSTRICO DA EXPOSIÇÃO AO MNU EM PRIMATAS *Cebus Apella* DA  
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

**Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do grau em Medicina pela Universidade  
Federal do Pará.**

**Banca Examinadora:**

---

Orientador

---

Nome / Instituição

---

Nome / Instituição

**Aprovado em:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Conceito:** \_\_\_\_\_

Dedico cada palavra e idéia contidas nestas linhas àquele que é a Causa Primária de tudo, ao Senhor Meu Deus que fez de mim o que sou e me permitiu chegar até aqui.

Dedico também todo esforço e as dificuldades superadas a meu Pai, Benjamim Gomes, por ele ter moldado meu caráter baseado em amor, carinho, atenção e livros... muitos livros. Por todas as nossas vitórias pai! A minha Mãe, Maria de Lourdes, que na distância me ensina o que é saudade, mas nos reencontros, consegue em um abraço me explicar o que é amor maternal!

A minha tia, madrinha, fada e anjo, Antônia Vilani, que estende as mãos e a asas a cada passo meu, por confiar nas minhas palavras e ações. Ao meu Tio Ildegrado, pelas palavras doces e sábias que advêm desse coração puro e dessa alma iluminada. Ao meu avô José Gomes, por ter sonhado para um dos seus filhos, aquilo que eu viria a realizar. A toda a família Gomes Alencar, maravilhoso presente onde Deus me inseriu e que confia em mim, quando eu mesmo desacredito. Sei que sempre posso contar com vocês.

A Larissa, Vévê e Aline, as advogadas e a diplomata do meu coração.

Aos meus amigos de Macapá e Belém, pela paciência com que tanto me ouviram falar empolgadamente em câncer e primatas e se limitavam a fazer afirmativo com a cabeça, mesmo sem entender nada do que eu estava falando, me achando doida de pedra e assassina de macacos. Em especial ao Elival, pelo apoio gráfico e estético desta obra.

Ao meu namorado, Charles Leandro, pelo carinho e paciência dedicados ao meu gênio difícil e a sua família por me acolherem com tanto afeto, concedendo-me um segundo lar.

As Srtas. Maria Fernanda, Carla Elvira e Julianne Maria, por sonharem junto comigo, porque afinal, um sonho que se sonha junto pode se transformar em um TCC, ou em dois!

As amigadas verdadeiras que eu conquistei ao longo desses seis anos de UFPA.

**Amanda Raquel da Silva Gomes**

Dedico este trabalho em primeiro lugar a Deus, por acreditar em mim e iluminar o meu caminho mesmo que às vezes eu não seja merecedora de tanto.

Dedico também este esforço a minha mãe, Maria José, porque ela é para mim o protótipo do amor verdadeiro, ela me deu substrato para construir meus próprios valores, especialmente no que diz respeito à humildade, justiça e perdão. Ao meu irmão, Júnior, que do seu jeito e mesmo em nossos desentendimentos, sempre esteve ao meu lado pronto para tudo, dividindo comigo o que nós dois tínhamos de melhor e pior. Ao meu pai, Paulo, por que eu sei que no fundo, mesmo distante e nos seus caminhos tortuosos, ele nunca deixou de me desejar com toda força que todos os meus sonhos se realizassem. À minha Tia Zuene, por ser esse anjo no nosso caminho.

Quero ainda dedicar este trabalho à minha família espiritual, que me acolheram e me amaram antes mesmo de me conhecerem, cuja dedicação e amor sem igual, me ensinaram o significado da instituição Família. Meu pai Marco Antônio, minha paixão, meu porto seguro, meu “Papis”, o ressuscitador de passarinhos mais lindo do mundo! Minha mãe Ana Sarah, minha “Mamis”, que literalmente acrescentou mais brilho à minha vida e cujo amor deixa meu dia mais colorido! À minha “Vóvis”, cuja alegria e carinho me contagiam todos os dias! Ao Daniel, meu irmão, meu “Preto”, que dividiu comigo sua casa, sua família, suas idéias, seus desodorantes, seus filmes, sua academia, seu computador, sua escrivãzinha e todo o material legal que tinha nela! E ascendeu em mim uma grande felicidade e segurança no momento que eu mais precisei. Ao meu outro irmão Dudu e à minha cunhada favorita, Brendinha, por que os adoro e parece que nos conhecemos há muito tempo.

Ao meu Padrinho espiritual, Dr. Jorge, um dos pais que Deus me deu. Um dos melhores amigos que tenho. Meu modelo de pessoa, de médico, de filho de Deus. Que me estendeu a mão quando eu mais precisava. Que nunca deixou de me dar palavras de conforto, carinho e otimismo. Que confia em mim. Que muitas vezes me disse coisas que eu, ainda muito jovem, não conseguia entender, mas que hoje se desenham sem esforço em minha forma de ver o mundo.

À família Reis Costa, que por dois anos diariamente, e hoje em menor frequência mas não com menos amor, me acolheram e ajudaram a seguir meu caminho. Tomando meus problemas e minhas inseguranças, me ajudando a crescer, me amando. D. Arlete, modelo de

mãe e mulher que eu vou guardar para sempre. Jean, a pessoa mais jovem e sábia que eu já conheci, laço de amor que eu jamais vou perder.

Ao meu namorado, Aumilto, por me amar do jeito que sou e com minhas limitações. Por deixar meus dias mais felizes. Por estar ao meu lado sempre e me completar como eu jamais imaginei que pudesse ser.

Às amigas Maria Fernanda (Pingo), Amanda (Amandita) e Carla (Cacá), por dividirem os mesmos sonhos e tornarem este trabalho possível.

Aos meus queridos amigos; Fernanda, Camila, Cecília, Ithana, Matheus, Bruno e Max, porque sem vocês os seis melhores anos da minha vida até hoje, não teriam sido assim aquela coisa que se diga “Minha nooossa...!”.

**Julianne Maria da Silva Lima**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Paulo Pimentel de Assumpção, por nos confiar à realização deste trabalho e pela orientação, dedicação e paciência imprescindíveis para a conclusão deste.

As Dr<sup>as</sup>. Sâmia Demacki e Mônica Baraúna, pelo suporte técnico na confecção dos dados que orientaram nossa discussão.

A todos os profissionais do Centro Nacional de Primatas, em especial ao Dr. José Augusto Carneiro Muniz, que nos receberam de braços abertos e dedicaram paciência e carinho diários aos animais alvo deste estudo.

Aos pesquisadores do Laboratório de Citogenética Humana da UFPA, pelo auxílio nos experimentos e por compartilharem conosco seu espaço, aparato técnico e amizade ao longo desses três anos.

Ao AON pela perseverança e vontade de viver que tanto nos incentivaram.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a idealização, elaboração e execução deste trabalho.

*“O câncer não é uma sentença de morte, é uma chamada para a vida.”*  
Autor desconhecido.

## RESUMO

O Câncer Gástrico representa hoje um desafio à saúde pública no Brasil, em especial no Estado do Pará, onde a mortalidade, em decorrência dessa neoplasia, encontra-se acima das médias nacionais. A carcinogênese é definida como um processo progressivo de dano ao material genético, levando a uma adaptação tecidual irreversível que culmina em degeneração maligna. Inúmeras condições intrínsecas e extrínsecas estão envolvidas nesta transformação. Para o Câncer gástrico está bem documentada a infecção pelo *H. Pylori*, entretanto, dada a relevância do assunto, diversos métodos de estudos têm sido propostos no sentido de compreender as intrincadas vias da carcinogênese e ampliar o conhecimento da etiopatogênese tumoral gástrica. Ganham particular importância modelos animais de carcinogênese química e testes moleculares que detectam precocemente alterações no material genético. Entre as substâncias utilizadas nesses modelos esta o N-Methyl-nitrosureia, além de outros componentes nitrosos conhecidos como agentes carcinogênicos diretos. Este trabalho se propôs a estudar os efeitos genotóxicos e anatomopatológicos da ingestão de MNU por *Cebus apella*, pois, a despeito da notória frequência desta espécie na fauna brasileira, o mesmo ainda não havia sido feito. Foram utilizados o Ensaio Cometa e o Teste do Micronúcleo para a análise tóxica do DNA de células sanguíneas e do tecido gástrico, além do histopatológico da mucosa gástrica dos animais. Como resultado, observamos que em um curto espaço de tempo, a dose empregada de MNU foi capaz de causar genotoxicidade e danos acumulados ao material genético, entretanto, sem alterações histopatológicas significante, demonstrando que as modificações continuadas e cumulativas ao DNA precedem a manifestação tecidual. Além disso, o *Cebus apella* demonstrou um bom potencial para reprodução deste tipo de estudo, pois sua ampla disponibilidade regional e fácil manejo aliada a uma maior sensibilidade a baixas concentrações do MNU, possibilitam a indução de carcinogênese química de maneira mais rápida e com uma dose menor da droga.

**Palavras-chaves:** Carcinogênese, N-Methyl-nitrosureia e *Cebus apella*

## ABSTRACT

Gastric cancer currently represents a challenge to public health in Brazil, especially in the state of Para, where the mortality due to this cancer, is above the national average. Carcinogenesis is defined as a process of progressive damage to genetic material, leading to irreversible tissue adaptation that culminates in malignant degeneration. Numerous intrinsic and extrinsic conditions are involved in this transformation. For the gastric cancer is well documented infection by *H. Pylori*, however, given the importance of the subject, several study methods have been proposed in order to understand the intricate process of carcinogenesis and enhance knowledge of the etiopathogenesis of gastric tumor. Win particularly important animal models of chemical carcinogenesis and molecular tests that detect early changes in the genetic material. Among the chemicals used in these models is the N-Methyl-nitrosourea, and other components nitrous known carcinogens as direct. This work aimed to study the genotoxic effects and pathological intake of MNU by *Cebus apella*, because, despite the remarkable frequency of this species in the Brazilian fauna, the same had not been done. We used the Comet assay and Micronucleus test for toxic DNA analysis of blood cells and gastric tissue, and histopathology of the gastric mucosa of animals. Our results indicate that in a short time, the dose of MNU was used is capable of causing genotoxicity and cumulative damage to genetic material, however, no significant histopathological changes, indicating that the changes continued and cumulative DNA preceding the outbreak tissue. In addition, *Cebus apella* showed a good potential for reproduction of this type of study because its large regional availability and easy handling combined with a greater sensitivity to low concentrations of MNU, allow for the induction of chemical carcinogenesis more quickly and with a dose less of the drug.

**Key-Words:** Carcinogenesis, N-Methyl-nitrosourea and *Cebus apella*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 – Ensaio Cometa	23
Figura 2 - Foto da formação dos Micronúcleos.	30
Figura 3 - Porção Foveolar do animal A	33
Figura 4 - Antro Gástrico do animal B	34
Figura 5 - Corpo Gástrico do animal D.	35
Gráfico 1- Percentual da Média das Células agrupadas por Categoria de Dano ao longo do tempo.	27
Gráfico 2 – Média do Índice de Dano por animal e Média Total ao longo do tempo.	28
Gráfico 3 – Média de Micronúcleos a cada 1000 células ao longo do tempo.	30
Gráfico 4 - Percentual da média das células de cada animal por Categoria de dano.	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

Cenp	Centro Nacional de Primatas
CtB	Citocalasina B
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
HE	Hematoxilina-Eosina
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDN	Índice de Dano do DNA
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MN	Micronúcleo
NIH	National Cancer Institute
NMU	N-Methyl-nitrosureia
RPM	Rotações por minuto
RTECS	REGISTRY OF TOXIC EFFECTS OF CHEMICAL SUBSTANCES
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
UFPA	Universidade Federal do Pará

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
3.1	Aspectos Éticos.....	21
3.2	Análise Genotóxica:.....	22
3.2.1	<i>Ensaio do Cometa (Versão Alcalina):</i> .....	22
3.2.2	<i>Teste do Micronúcleo:</i> .....	24
3.3	Endoscopia Processamento Tecidual e Histopatologia.....	25
3.4	Análise Estatística.....	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	26
4.1.	Análise Genotóxica das Amostras de Sangue Periférico .....	26
4.1.1	<i>Ensaio Cometa</i> .....	26
4.1.2	<i>Teste do Micronúcleo</i> .....	28
4.2	Ensaio Cometa do Tecido Gástrico.....	30
4.3	Análise Histopatológica .....	31
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	41
	<b>REFERENCIAS</b> .....	42
	<b>APÊNDICES</b> .....	48
	<b>ANEXOS</b> .....	50

## 1 INTRODUÇÃO

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima para o ano de 2009 a ocorrência de 466.730 novos casos de câncer no Brasil, sendo esperados dentro desse total cerca de vinte e dois mil novos casos de Câncer de Estômago. Esses valores correspondem a um risco estimado de 15 casos novos a cada 100 mil homens e de oito para cada 100 mil mulheres.

Diversos estudos baseados em registros epidemiológicos mostram que, embora as taxas de morbimortalidade associadas ao câncer gástrico venham declinando substancialmente nas últimas décadas e esta neoplasia tenha se tornado relativamente rara na América do Norte e na maioria dos países da Europa Ocidental, há ainda áreas onde o câncer de estômago permanece comum. Estas áreas incluem Japão, Rússia e outros países da antiga União Soviética, assim como países da América Latina. Bosetti e cols (2005) encontraram taxas de mortalidade por câncer gástrico excessivamente elevadas em Chile, Costa Rica e Equador, onde o índice supera 20/100.000 e Argentina, Brasil, Colômbia e Venezuela (com taxas entre 10 e 20/100.000) (BERTUCCIO, 2009; BOSETTI, 2005; IARC, 2002; INCA, 2009; PARKIN, 2005).

Até meados da década de 1990, o câncer gástrico era apontado como a mais comum causa de morte por câncer em todo o mundo. Atualmente, é a quarta neoplasia maligna mais freqüente, e responde por mais de 10% das mortes por câncer, com taxas de letalidade ainda altas. É a segunda causa de morte por patologia cancerosa, estando atrás apenas dos cânceres de pulmão, sendo a sobrevida relativa em cinco anos considerada baixa, cerca de 20%, na maioria dos países (INCA, 2009).

Em geral, sua magnitude é de duas a três vezes maior nos países em desenvolvimento. No Brasil, desconsiderando-se os tumores de pele não melanoma, o câncer de estômago em homens é o segundo mais freqüente nas regiões Norte (10/100.000) e Nordeste (9/100.000). No Pará, a neoplasia maligna gástrica é atualmente a terceira mais incidente em homens e mulheres (INCA, 2009). Resende e cols (2006) após análise de dados do IBGE no período de 1980 a 1997, concluíram que apesar da tendência de declínio nas taxas de mortalidade observada para a cidade de Belém, a mortalidade por câncer gástrico nesta cidade, nos diferentes triênios analisados, foi superior àquela registrada em outras capitais brasileiras

selecionadas e no Brasil, durante o período de estudo. O que reforça esta região como uma zona crítica no que diz respeito ao desenvolvimento do câncer de estômago.

Dessa forma, o molde epidemiológico que envolve o câncer gástrico em diversas regiões do mundo, e particularmente na América Latina e Brasil, suscitam a viabilização de novos métodos de estudo para melhor compreensão e prognóstico desta patologia.

A carcinogênese é apontada como resultado de um processo progressivo onde, ao longo do tempo, são acumuladas mudanças no material genético, decorrentes da exposição contínua a múltiplos fatores ambientais, associados ou não a determinado grau de suscetibilidade individual. Esta rede de interações complexas culmina em uma adaptação tecidual, decorrente da agressão continuada: a degeneração maligna.

As investigações epidemiológicas têm tido especial interesse nos últimos anos pela tumorigênese gástrica, especialmente com a emergência do *Helicobacter pylori* como um fator de risco para esta condição. Estes achados conduzem a um aperfeiçoamento dos conhecimentos a cerca da etiologia e patogênese desta neoplasia e destacam a possibilidade de prevenção ativa da doença. É consenso aceito pelo International Agency for Research on Cancer (IARC) desde 1994, que a infecção pelo *H. pylori* é uma causa primária do desenvolvimento de neoplasia maligna gástrica. Esta infecção tem início geralmente na infância ou adolescência e persiste como uma gastrite crônica, implicando que a exposição ao principal agente causal esteja presente por cinco ou mais décadas na maioria dos pacientes. Hipoteticamente, isto daria ampla margem temporal para intervir e bloquear o acúmulo progressivo de danos celulares. Sendo então crucial que consigamos compreender o processo pré canceroso (CORREA, 2004).

Diferenças na exposição ao *H. pylori* e uma gama de outros fatores ambientais provavelmente aumentam muito as variações de incidência e apresentação do câncer gástrico observadas entre as diferentes populações. Kelley e Duggan (2003) em revisão sistemática da epidemiologia do câncer gástrico apontam os fatores dietéticos como componentes determinantes das variações nas taxas de incidência e mortalidade entre países distintos e entre regiões diferentes de um mesmo país. Entretanto, diversos componentes ainda carecem de estudos definitivamente conclusivos, como a excessiva ingestão de sal, por exemplo. De fato, encontra-se bem documentado em estudos experimentais, o papel de componentes

nitrosos como agentes carcinogênicos diretos. Estes compostos podem ser encontrados no estômago humano, advindos de dieta rica em nitrito ou nitrato, fortalecendo a hipótese de que uma dieta com altos teores de tais componentes podem predispor a neoplasia maligna gástrica. As maiores fontes destes componentes nitrosos são vegetais e carnes conservadas, respectivamente. A água também é uma fonte adicional de nitrito e nitrato, mas a quantidade habitualmente encontrada é insignificante. Por outro lado, parece haver pouca associação, em estudos caso-controle, de pacientes portadores de neoplasia gástrica com dieta rica em componentes nitrosos, isoladamente (HASEGAWA, 1998; KELLEY & DUGGAN, 2003; TAKAYAMA, 2008; THORGEIRSSON, 1994).

Nesse contexto, o estabelecimento de modelos experimentais que reproduzam de maneira consistente a etiopatogênese documentada em humanos, acrescenta sobremaneira o entendimento da patologia cancerosa e a compreensão deste processo de degeneração adaptativa, viabilizando medidas profiláticas e terapêuticas que auxiliem o manejo clínico de pacientes.

O presente trabalho faz parte de um projeto maior, ainda em andamento, de estudo da carcinogênese gástrica, intitulado: “AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO BIOPRODUTO *MÉTODO CANOVA* EM MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER GÁSTRICO EM PRIMATAS NÃO HUMANOS”, e objetiva nesta etapa, ampliar os conhecimentos da patogênese tumoral gástrica, a partir da demonstração genotóxica e histopatológica do efeito carcinogênico direto do N-methyl-nitrosureia (MNU) sobre o trato gastrointestinal de *Cebus apella*, com a finalidade de viabilizar um modelo de carcinogênese gástrica em primatas desta espécie, tendo em vista que a mesma nunca foi utilizada anteriormente em estudos semelhantes.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

O conhecimento da etiopatogênese tumoral gástrica vem ao longo dos anos ganhando diversos e significativos acréscimos, tanto em nível epidemiológico quanto no que concerne às características moleculares da história natural da doença. O advento das técnicas de biologia molecular, cada vez mais aperfeiçoadas, vem dando consistência e ampliando horizontes de hipóteses anteriormente aventadas apenas por observação clínica. De fato, testes que detectam precocemente alterações estruturais e funcionais no material genético da célula têm mudado significativamente dados científicos e clínicos, assim como índices de

morbimortalidade e sobrevida de pacientes. Ganham particular importância, investigações experimentais que possibilitem relacionar informações dos estudos com os achados descritos na carcinogênese gástrica observada em humanos.

A maioria dos estudos que busca o desenvolvimento de modelo animal para carcinogênese tem como substrato de análise camundongos e outros roedores. Esses animais são apropriados para modelos de carcinogênese devido a seu baixo custo, alta incidência de tumores espontâneos e rapidez na obtenção de resultados (THORGEIRSSON, 1994; DALGARD, 1997). No entanto, alguns agentes carcinogênicos para os seres humanos não induzem neoplasias em roedores (IARC, 2004).

Por outro lado, os primatas não humanos constituem excelentes modelos experimentais face sua grande proximidade evolutiva e filogenética com o homem, possuindo maior similaridade anatômica, fisiológica e bioquímica que os roedores. O tamanho de seus órgãos faz possível realizar procedimentos de diagnóstico, tais como coletas de sangue seriadas, biopsias e exames endoscópicos. Além disso, os primatas não humanos vivem mais em comparação aos roedores, e é a sua maior longevidade que permite a exposição aos agentes carcinogênicos por longos períodos de tempo (TAKAYAMA, 2008).

O Brasil é o país que concentra o maior número de espécies de primatas do mundo. Atualmente é aceita a ocorrência de representantes de todas as 5 famílias de primatas neotropicais no território brasileiro, totalizando cerca de 110 espécies, (RYLANDS *et al.* 2000) dentre as quais se encontra o *Cebus apella*. Popularmente conhecidos como macacos pregos, esses primatas pertencem à família cebidae e podem ser encontrado em quase todo território nacional, preferencialmente nas áreas de floresta tropical. Possuem hábitos diurnos, arborícolas, e uma longevidade média de 40 anos. Os machos adultos podem atingir 60 centímetros de comprimento e pesar até 3,5Kg. Essa espécie atinge o amadurecimento reprodutivo por volta dos quatro anos e se adapta bem ao cativeiro.

Nos últimos cinquenta anos tem aumentado, consideravelmente, o uso de primatas neotropicais em investigações biomédicas e o *Cebus apella* apresenta um bom potencial para o desenvolvimento de modelos experimentais. A legislação brasileira, todavia, prevê que apenas animais nascidos em instituições de pesquisa que visam a sua criação em cativeiro, sob

condições controladas, podem ser utilizados para estas tais finalidades. O Centro Nacional de Primatas (Cenp) é uma dessas instituições.

Localizado no estado do Pará e subordinado a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), o Cenp possui uma área de 25 hectares de mata primária, um plantel de mais de 600 animais e uma estrutura clínico-cirúrgico-laboratorial de expressão nacional. Tal tecnologia viabiliza investigações biomédicas e demais pesquisas nas áreas das ciências médicas e biológicas, apoiando o desenvolvimento da pesquisa no Brasil e no exterior, uma vez que o Centro é o maior da América Latina e está entre os dez primeiros do mundo.

Na tentativa de encontrar na natureza um modelo mais próximo da degeneração maligna em tecidos humanos, diversos trabalhos relataram o desenvolvimento de neoplasias em primatas não humanos. Terrell e cols. (1980) diagnosticaram linfomas malignos nesses animais. Essa neoplasia foi observada em 42 macacos reshus (*Macaca mulatta*) e em três macacos stumptail (*Macaca arctoides*). A distribuição das massas tumorais nos tecidos foi variada, massas solitárias estiveram presentes em 14 animais e múltiplas massas nos 31 restantes. A maioria de linfomas malignos foi de um tipo celular indiferenciado.

Paoli e McClure (1982) diagnosticaram câncer gastrointestinal em 11 primatas não humanos (nove *Macaca mulatta*, um *Saguinus oedipus* oedipus e um *Galago crassicaudatus*). Dez dos 11 tumores foram adenocarcinomas. Todos os tumores tiveram invasão local.

Brack (1988) reporta o desenvolvimento espontâneo de dois adenocarcinomas mucóides colônicos em tamarins (*Saguinus oedipus*). Um macho adulto apresentou metástase para os linfonodos regionais e o pâncreas. Brack (1998) publicou também uma revisão de 26 tumores gastrointestinais diagnosticados em 23 primatas não humanos durante necropsias de rotina no *German Primate Centre*. Destes, 15 casos foram adenocarcinomas mucóides coloretais em tamarins (*Saguinus oedipus*), dos quais dois animais apresentavam associação com adenomas gástricos. Também foram reportados três casos de adenocarcinomas mucóides intestinais em *Callithrix jacchus*, um leiomioma colônico em *Galagoides demidovii* e outro em um cotton top tamarin (*Saguinus oedipus*). Dois saddle-backed tamarin (*Saguinus fuscicollis*) apresentaram linfosarcoma de jejuno, íleo e colon. Múltiplos adenocarcinomas tubulares foram encontrados em um macaco rhesus (*Macaca mulatta*).

O adenocarcinoma intestinal parece ser a neoplasia maligna mais freqüente em primatas não humanos, e é uma substancial causa de morbidade e mortalidade observada no seu envelhecimento. Uma revisão retrospectiva de 32 casos foi realizada por Valverde e cols. (2000) no *California Regional Primate Research Center*, em que foi constatado que os locais mais freqüentes de desenvolvimento de adenocarcinomas intestinais foram junção ileocecal, colo, íleo, jejuno e ceco. Metástases foram evidentes em 34% dos casos, com o envolvimento de nódulos periféricos no fígado, pulmões, pâncreas e glândulas adrenais.

Adenocarcinomas de cólon espontâneos também já foram descritos em dois macacos rhesus, que apresentaram inclusive tumores metastatizados, o que é incomum nesses primatas (KERRICK & BROWNSTEIN, 2000).

Os relatos supracitados referem-se ao desenvolvimento da carcinogênese espontânea em primatas não humanos. Porém, se comparada à dos roedores, essa incidência é baixa e está relacionada principalmente ao processo de envelhecimento. Por esse motivo, modelos experimentais de tumorigênese induzida por carcinogênicos químicos, em várias espécies de primatas não humanos, vem sendo estabelecidos pelo *National Cancer Institute* (NIH) dos Estados Unidos e pelo *National Cancer Research Institute* do Japão (TAKAYAMA, 2008).

A carcinogênese química induz o aparecimento de alterações genéticas e epigenéticas, cujo acúmulo transforma células normais em malignas (LUCH, 2009). Compostos genotóxicos N-nitrosos são agentes alquilantes que interagem com o DNA resultando em danos estruturais e finalmente causando alterações genéticas que são consideradas irreversíveis (CUI, 1995; HIROSE, 1979; HIROSE, 1989; OHGAKI, 1992). O N-Methyl-nitrosureia (MNU) exerce efeito carcinogênico direto sobre o organismo, sem requerer ativação enzimática. Estudos *in vitro* demonstram que é possível gerar MNU a partir da incubação de vários alimentos em condições ácidas, o que sugere que é possível a formação do MNU no trato alimentar em muitas espécies, incluindo o homem. Dessa forma, os modelos de tumorigênese utilizando o MNU são relevantes para o entendimento da carcinogênese gástrica (BUDÁN, 2008).

O efeito cumulativo do MNU em primatas não humanos leva ao desenvolvimento de vários tipos de tumores na cavidade oral, laringe, faringe e principalmente no estômago e esôfago (ADAMSON, 1977; THORGEIRSSON, 1994; DALGARD, 1997). Semelhante à

carcinogênese humana, o MNU induz lesões pré-neoplásicas antes do desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (TSUKAMOTO, 2007), o qual se desenvolve na região do antro estomacal dos animais (KODAMA, 2005). Cabe ressaltar que esse tipo de tumor induzido em animais por MNU (câncer gástrico do tipo intestinal na região do antro), tem sua incidência mundial decrescente em seres humanos (CREW & NEUGUT, 2006), porém, como citado anteriormente, a incidência dessa malignidade permanece elevada no Estado do Pará, o que justifica o desenvolvimento desta proposta e atesta para sua relevância.

Determinar os efeitos mutagênicos da exposição a agentes químicos demanda monitoramento seriado e aplicação de que testes que possam identificar tais modificações. Segundo revisão realizada por Brendler-Swaab e cols. (2005), onde foram comparados alguns testes de análise mutagênica, o Ensaio Cometa *in vivo* (*Single Cell Gel Electrophoresis*), é recomendado para acompanhamento de achados genotóxicos positivos *in vitro* tanto em células germinativas como em células somáticas, possuindo alta sensibilidade e ampla aplicabilidade. É particularmente utilizado como um instrumento para avaliação de genotoxicidade local, especialmente em órgãos/ células específicos os quais não podem ser precocemente avaliados por outros testes padronizados. Possui especial importância na avaliação de compostos mutagênicos, com uma de suas principais indicações estando direcionada à avaliação de células cancerosas.

O Ensaio Cometa *in vivo* vem sendo largamente aceito na comunidade científica como teste de genotoxicidade em roedores. Suas principais vantagens incluem a possibilidade de avaliação de vários tecidos ou células, sua alta sensibilidade para detectar baixos níveis de dano ao material genético e a necessidade de pequena amostra de células para aplicação da análise. Além disso, é um teste facilmente reprodutível que pode ser concluído em um curto espaço de tempo e possui custo relativamente baixo (HARTMANN, 2003; TICE, 2000).

Entretanto, desde os primeiros testes que foram realizados para o desenvolvimento dessa técnica por Rydberg e Johanson (1978), e Ostling e Johanson (1984), muitos pontos vem sendo aperfeiçoados e ponderações têm sido acrescentadas para melhorar a sensibilidade e a especificidade do Ensaio, especialmente no que diz respeito a variações para diferenciar os diversos tipos de danos ao DNA, tais como: quebras simples ou duplas e modificações nas bases nitrogenadas; diminuir falsos positivos diferenciando genotoxicidade de eventos apoptóticos; e combinar os achados do Cometa com outros testes de identificação de

toxicidade genética, tal como o Teste do Micronúcleo (HARTMANN, 2003; RITTER & KNEBEL, 2009; TICE, 2000).

Os ensaios com micronúcleo permitem identificar um aumento na frequência das mutações cromossômicas, condição *sine qua non* para a carcinogênese, e vem sendo muito utilizado em estudos *in vivo*, no monitoramento genotóxico de populações, e *in vitro*, para a avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos. Os micronúcleos são formados durante a telófase, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos e são resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Desta forma, a detecção de micronúcleo representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou dano no aparelho mitótico. (FENECH, 2000).

É importante ressaltar que uma quantidade basal de micronúcleos é formada durante a mitose devido aos mais variados tipos de erros, espontâneos ou não, ocorridos durante o ciclo. Isso quer dizer que os possíveis danos ao DNA causados, por exemplo, pela exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em micronúcleos após um ciclo de divisão celular, sendo dependentes da proporção de células que estão se dividindo. (FENECH et al. 1997).

Dentre muitos testes de mutagênese, o teste de micronúcleo (MN) é um ensaio tecnicamente simples, confiável e sensível, que pode ser repetido várias vezes, para a prevenção e monitoramento de indivíduos sob risco carcinogênico, como consumo crônico e abusivo de álcool, tabaco e/ou outras substâncias mutagênicas (RAMIREZ et al. 1999, GATTÁS, 2001).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Este é um estudo experimental descritivo com duração total de seis meses, que disponibilizou de quatro primatas não humanos pertencentes à espécie *Cebus apella*, machos, adultos, (com idade variando entre 6 a 8 anos e peso de 2.450 kg a 3.010 kg), cujos cuidados e monitoramento foram regularmente efetuados nas instalações do Centro Nacional de Primatas (Cenp), onde realizaram-se todos os procedimentos direcionados aos macacos efetivamente.

Os animais receberam o composto N-Methyl-nitrosurea (MNU) (N1517 ISOPAC® da Sigma-Aldrich) por via oral, na concentração de 5 mg/kg, que era diluída nos 500 ml de água administrados diariamente e ofertados *ad libitum*. Cada frasco de N1517, que possui 1,8 g de soluto total sendo 1 g de MNU, foi diluído em 100 ml de água destilada para que se adicionasse a água dos primatas, aproximadamente, 1,5 ml dessa diluição, isto é, 15 mg de MNU ou 27 mg de N1517. O cálculo da dosagem foi baseado na folha de dados de segurança do N1517, que cita 5 mg/kg como a menor dose de MNU utilizada por via oral em experimentos com ratos, baseado no MSDS do REGISTRY OF TOXIC EFFECTS OF CHEMICAL SUBSTANCES (RTECS ®). O mesmo documento menciona um estudo de seis anos com primatas, onde foram administrados 20 mg/kg do carcinógeno diariamente.

Ao longo do experimento, foram realizadas quatro coletas de amostras sanguíneas dos animais. Estas amostras foram utilizadas como substrato de análise de genotoxicidade do material através do Ensaio Cometa e do Teste do Micronúcleo. A primeira coleta foi efetuada no dia anterior ao início da administração do MNU (D0), e funcionou como controle do nosso estudo. A segunda, a terceira e a quarta coletas, foram realizadas em intervalos de 30, 60 e 90 dias, respectivamente, após D0. Essas amostras foram processadas e analisadas no Laboratório de Citogenética Humana e Genética Toxicológica da Universidade Federal do Pará (UFPA).

Ao final do quarto mês do experimento, os animais foram submetidos à Endoscopia Digestiva Alta, com biópsias para análise histopatológica de corpo e antro gástricos bem com testes genotóxicos com tecido gástrico. O processamento das lâminas e a análise histopatológica foram efetuados no Laboratório de Anatomia Patológica Humana Dr. Ronaldo Araújo, do Hospital Universitário João de Barros Barreto – Hospital Escola da UFPA.

### **3.1 Aspectos Éticos**

Esta pesquisa que está incluído em um projeto maior intitulado “Avaliação dos Efeitos do Bioproduto *Método Canova* em Modelo Experimental de Câncer Gástrico em Primatas Não Humanos”, o qual recebeu a devida aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da UFPA e conta com a aprovação do Cenp.(ANEXO A).

## 3.2 Análise Genotóxica:

### 3.2.1 Ensaio do Cometa (Versão Alcalina):

#### *Preparação das lâminas:*

As lâminas foram previamente cobertas em solução de agarose de ponto de fusão normal a 1,5 %. Posteriormente, foram mantidas em temperatura ambiente até a solidificação da agarose. Esta camada foi utilizada para promover a adesão na segunda camada de agarose de baixo ponto de fusão a 0,8 %, na qual a amostra foi diluída.

Após 4 h com a droga (23 h de cultura), foram coletados 300  $\mu$ L de amostra de cada grupo e em seguida feita uma centrifugação a 1000 rotações por minuto (rpm) por 5 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado deixando 20  $\mu$ L para a ressuspensão. Deste conteúdo, 10  $\mu$ L foram acrescentados em 200  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão a 0,8 % e em seguida homogeneizado para formar uma suspensão. Subsequentemente 100  $\mu$ L da suspensão de células foi aplicada rapidamente sobre a lâmina contendo agarose e então coberta com uma lamínula (24 x 60 mm). As lâminas foram mantidas a 4 °C por 5 min até a solidificação da agarose. Após este período, a lamínula foi removida e a lâmina mergulhada em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 10 mM Tris, 1 % Triton X-100, 10 % Dimetilsulfóxido (DMSO) e 1 % N-Lauroyl sarcosine; pH 10) a 4 °C e protegida da luz. Para cada animal foram preparadas duas lâminas, num total de oito lâminas por coleta.

#### *Eletroforese:*

Após a remoção das lâminas da solução de lise, as mesmas foram dispostas em posição horizontal na cuba de eletroforese. Em seguida, a cuba foi preenchida com a solução de eletroforese (1 mM EDTA, 300 mM NaOH; pH  $\geq$ 13) a 4 °C recém-preparada, a um nível superior (0,25 cm, em média) às lâminas. As lâminas foram mantidas em repouso por 20 min antes da eletroforese a fim de permitir o desenovelamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios álcali-lábeis. Após este processo, a eletroforese foi realizada a uma tensão (d.d.p) de 34 V em corrente de 300 mA por um período de 25 min. Vale ressaltar que todos esses processos foram realizados em baixa luminosidade. Após a

eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas rapidamente em água destilada gelada (4 °C) para a remoção dos resquícios da solução de eletroforese e em seguida transferidas para um novo mergulho em água destilada gelada por 5 min para a neutralização.

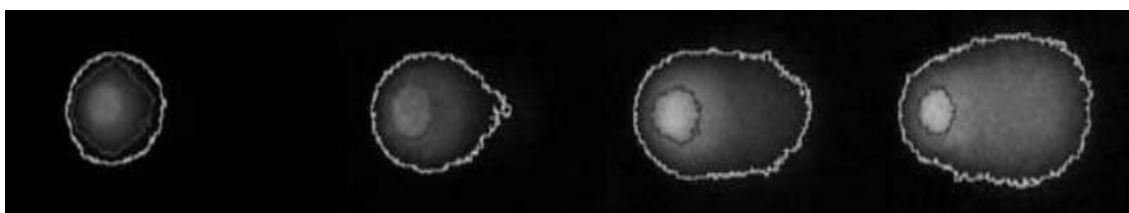
#### *Coloração:*

As lâminas foram fixadas com etanol a 100% e posteriormente coradas com 50 µL de solução de Brometo de Etídio (20 µg/mL). Em seguida foram cobertas com lamínula (24 X 60 mm) para a realização das análises.

#### *Análise das lâminas:*

As lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, com filtro triplo DAPI/FITC/TRICT. O sistema de captura e a análise da imagem foram realizados pelo programa “*Applied Spectral Imaging*”. A análise foi realizada para aproximadamente 100 células por lâmina, segundo o padrão de escores, em que, de acordo com o tamanho e intensidade da cauda do cometa (halo), podem ser obtidas cinco categorias (0 - 4), levando-se em consideração a percentagem de DNA na cauda do cometa, o que irá indicar o grau de lesão sofrido pela célula:

- 0 = sem danos (< 5 %)
- 1 = baixo nível de danos (5 – 20 %)
- 2 = médio nível de danos (20 – 40 %)
- 3 = alto nível de danos (40 - 95 %)
- 4 = dano total ( $\geq$  95%)



**Figura 1 – Ensaio Cometa**

Regiões de interesse para cada Cometa e sua “calda”. Exemplos do aumento do dano no DNA nuclear (ascendente da esquerda para a direita).

### 3.2.2 *Teste do Micronúcleo:*

#### *Cultura de linfócitos a partir de sangue total*

Foram coletados 5ml de sangue periférico em seringas descartáveis estéreis previamente heparinizadas e em um frasco de cultura contendo 5ml de RPMI, 20% de soro fetal bovino (Cultilab®) 2% de fitohemaglutinina A, foi adicionado 0,5 ml de sangue. O frasco foi incubado a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> por 44 horas. Após este período, adicionou-se 6µg de Citocalasina B (CtB)/ml à cultura , conservando-a na estufa por mais 28 horas.

Ao final das 72 horas, a cultura foi centrifugada a 800 rpm por cinco minutos. Descartando-se o sobrenadante, foram adicionados 5ml de solução hipotônica gelada (KCl 0,075M), agitando-se novamente o tubo ao final. O material foi re-centrifugado a 800 rpm por mais cinco minutos, o sobrenadante novamente descartado, o sedimento re-suspendido e foram adicionados 5ml de fixador (metano/ácido acético 5:1) recém preparado. Acrescentou-se então 3 gotas de formaldeído agitando-se novamente o tubo. Este ultimo procedimento foi repetido por mais 2 vezes, utilizando-se fixador 3:1, sem formaldeído. Descartou-se o fixador ficando apenas 1ml no tubo, o pellet de células foi então re-suspendido e agitado.

Duas gotas da suspensão foram despejadas sobre lâminas previamente lavadas e o material secou a temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa 5%, durante 7 minutos.

#### *Análise das lâminas para determinação da frequência dos micronúcleos (MN):*

As lâminas foram previamente codificadas e analisadas em teste cego, em microscópio óptico de luz com aumento de 1000 vezes. Foram selecionadas as células binucleadas (1000 células/lâmina) que possuíam: núcleos intactos e de tamanhos aproximadamente iguais, com mesmo padrão de coloração e dentro do limite citoplasmático, as de membrana celular integra e aquelas claramente distinguíveis das células adjacentes. Para a análise da frequência de MN não foram incluídas na amostra, células com um ou mais de dois núcleos, necróticas ou apoptóticas.

*Características do micronúcleo:*

Foram analisados os MN com morfologia idêntica à dos núcleos principais, diâmetro entre 1/16 até no máximo 1/3 dos núcleos principais (ou entre 1/256 a 1/9 da área de um dos núcleos principais), que apresentavam a mesma coloração dos núcleos ou, ocasionalmente, a coloração mais intensa, os que não apresentavam refringências e aqueles que não estavam ligados ou conectados a um dos núcleos principais.

*Parâmetros que foram considerados na análise:*

- Número de células binucleadas analisadas.
- Distribuição de células binucleadas com 0,1,2,3 ou mais MN em pelo menos 1000 células binucleadas.
- Número total de MN nas células binucleadas.
- Frequência de MN/1000 células binucleadas.

### **3.3 Endoscopia Processamento Tecidual e Histopatologia**

As biópsias da mucosa gástricas foram coletadas durante a realização do exame de endoscopia digestiva alta, no quarto mês do experimento, após 120 dias do início da administração de MNU. Duas amostras do antro gástrico e duas do corpo, medindo entre 2 e 3 cm, foram obtidas para realização do estudo histopatológico e pesquisa de *H. pylori*, além do ensaio cometa do tecido gástrico.

As amostras foram depositadas em frascos com solução de formalina a 10% e levadas ao processamento histológico rotineiro, desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Seções histológicas foram feitas em uma espessura de 5 micra, preparadas em lâminas e coradas com método da hematoxilina-eosina (HE) para exame histopatológico no microscópio óptico. Para a investigação do *H. pylori*, foi utilizado o método de Gram modificado (solução de Lugol a 1% com solução de violeta genciana a 2,5%).

### 3.4 Análise Estatística

Os resultados obtidos pelo ensaio cometa e teste do micronúcleo foram analisados com o programa estatístico BioEstat® versão 5.0 através do método ANOVA seguido pelo teste de Tukey. O valor de P foi fixado em 5% ( $P < 0,05$ ). Foi utilizado o programa Microsoft Office EXCEL 2007 para os cálculos de Médias, Índices e Desvios Padrão.

## 4 RESULTADOS

### 4.1. Análise Genotóxica das Amostras de Sangue Periférico

#### 4.1.1 Ensaio Cometa

Com a finalidade de observar o efeito genotóxico da exposição oral ao MNU, foram realizadas quatro coletas sanguíneas um dia antes e nos meses seguintes à administração do composto, com intervalos de 30, 60 e 90 dias respectivamente, após o início da ingestão do agente. A partir de cada amostra sanguínea confeccionaram-se duas lâminas por primata, num total de oito por amostra. Estas lâminas por sua vez, foram submetidas ao protocolo de tratamento do Ensaio Cometa (versão alcalina), e 100 células por lâmina foram analisadas e classificadas em cinco categorias ascendentes de dano nuclear. Categoria 0 = sem danos (< 5 %); Categoria 1 = baixo nível de danos (5 – 20 %); Categoria 2 = médio nível de danos (20 – 40 %); Categoria 3 = alto nível de danos (40 - 95 %); e Categoria 4 = dano total ( $\geq 95\%$ )

O gráfico 1 demonstra a evolução das categorias de dano durante as quatro amostras sanguíneas, onde cada categoria é expressa através do valor percentual da média de células, ao longo do período de cada coleta.

Ocorreu durante os 90 dias uma queda de aproximadamente 35 pontos percentuais da categoria 0, representando a diminuição da média de células cuja lesão no DNA era inferior a 5%. A categoria 1, apesar de uma pequena redução entre D30 e D60, chegou ao D90 com uma elevação de 8%. A categoria 2, que apresentou aumento em todas as amostras, após os 90 dias da administração do carcinógeno, tornou-se semelhante à categoria 1, em outras palavras, o percentual de células com baixo nível e médio nível de dano se tornaram equivalentes.

Na amostra controle (D0), o número de células com alto grau de dano (40 a 95%) era mínimo e não havia células com dano total ( $\geq 95\%$ ), esta categoria de dano celular passou a aparecer já na primeira amostra coletada após 30 dias de seguimento dos animais. A elevação gradual nas amostras seguintes evidenciou uma ascensão lenta, mas significativa das categorias 3 e 4.

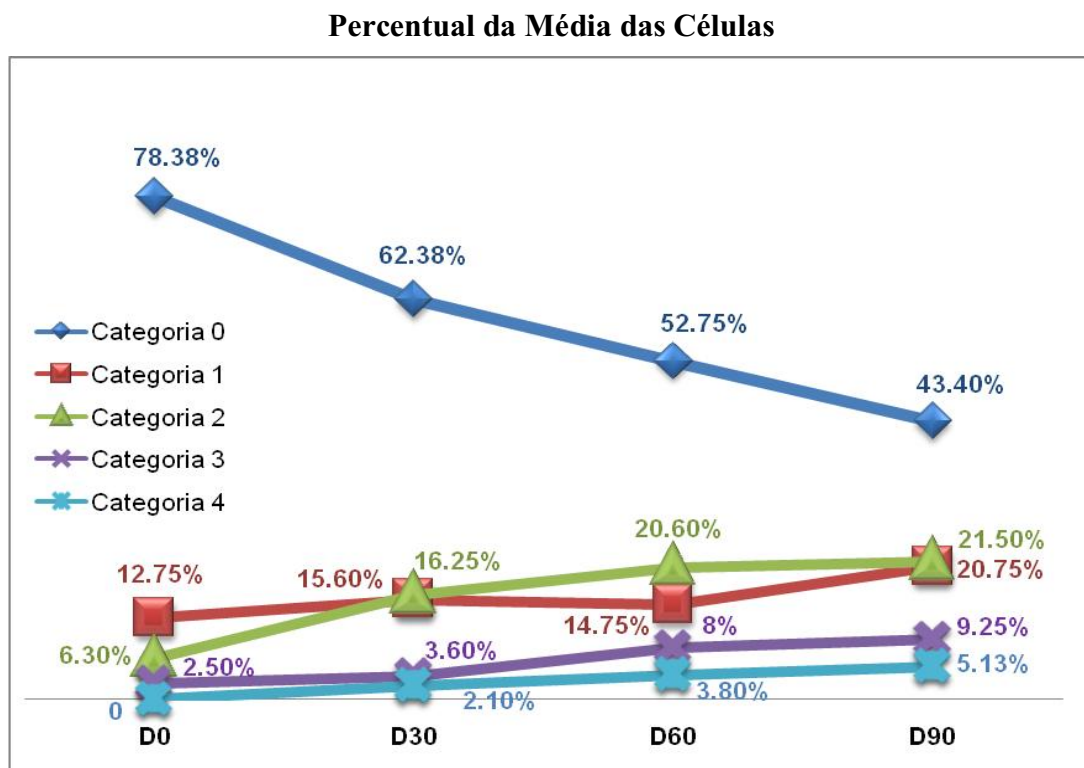


Gráfico 1- Percentual da Média das Células agrupadas por Categoria de Dano ao longo do tempo.

Os números absolutos de células de cada lâmina, excluindo a categoria 0, foram multiplicados pelo seu grau de dano nuclear correspondente, que funcionou como peso, e somados a fim de se calcular o Índice de Dano do DNA (IDN). Obtiveram-se dois Índices particulares, por primata, para cada análise no seu respectivo tempo de coleta sanguínea. A partir desses índices foi retirada uma Média de IDN dos quatro animais em cada tempo de coleta e a Média Total por amostra, como expresso no gráfico a seguir.

Foi observado aumento progressivo da média dos índices de dano nas amostras de sangue coletadas ao longo do tempo nos quatro animais de maneira particular e em conjunto. A Média de IND no controle do experimento foi semelhante entre os quatro primatas e assim se manteve em D30 e D60 só aumentando a discrepância em D90. O animal C foi o que

sofreu maior aumento da média do índice em todas as amostras e o Animal D foi o responsável pelas médias mais baixas.

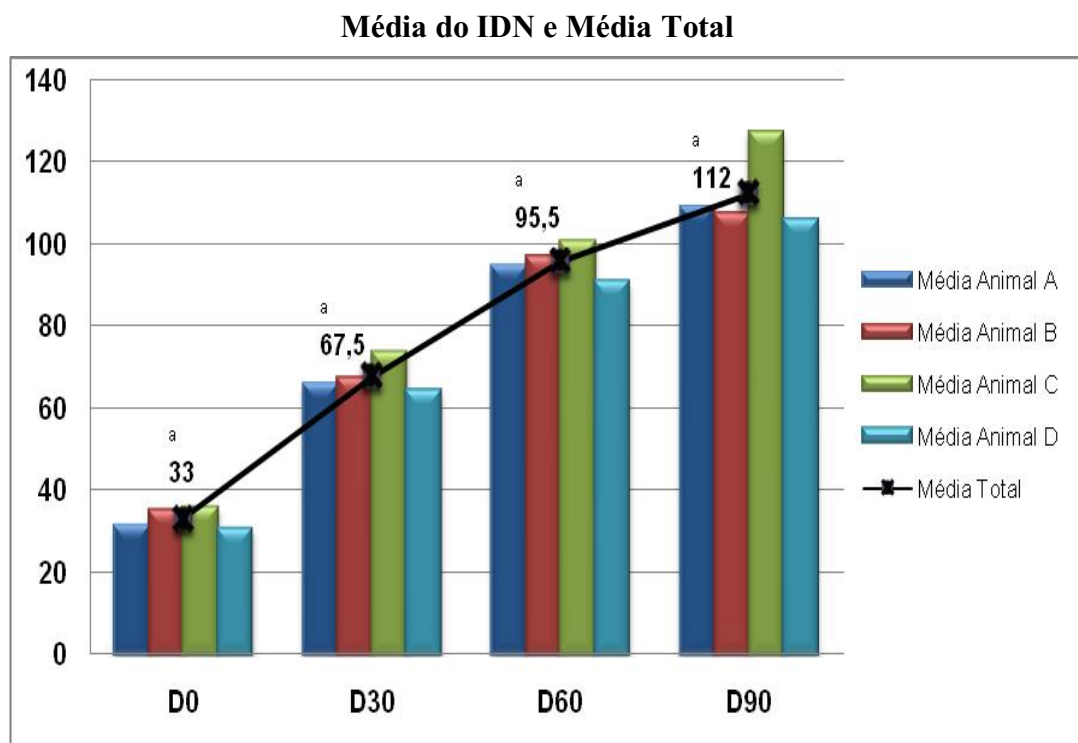


Gráfico 2 – Média do Índice de Dano por animal e Média Total ao longo do tempo.

<sup>a</sup> Estatisticamente diferente dos demais grupos ( $P < 0,05$ )

A Média Total demonstrou um crescimento sustentado e significativo ( $P < 0,01$ ) ao longo das quatro amostras. Sua maior variação ocorreu durante os trinta primeiros dias da administração do MNU, caracterizando um aumento superior a 100%, a partir daí a elevação se manteve, porém com decréscimos seguidos na curva de crescimento. Entre o controle e o D90 a média total sofreu um aumento superior a três vezes o seu valor inicial.

#### 4.1.2 Teste do Micronúcleo

O teste do Micronúcleo foi utilizado para complementar o estudo da genotoxicidade e avaliar os efeitos mutagênicos da exposição oral ao MNU. Foram avaliadas a frequência e a distribuição de Micronúcleos (MN) em 2000 linfócitos binucleados de cada animal, colhidos no sangue periférico nas amostras seriadas (D0, D30, D60, D90). Em seguida, se processou o cálculo da frequência total de MN entre os primatas e a Média de MN para cada 1000 células

no período específico. A tabela 1 mostra o número total de MN e sua distribuição nos linfócitos.

Tabela 1 – Frequência e distribuição de Micronúcleos (MN) em linfócitos binucleados (BN) dos primatas expostos ao MNU.

<b>Dias</b>	<b>Distribuição de MN</b>			<b>Total de MN</b>	<b>MN/1000 cel BN Média ± D.P.</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		
<b>D0<sup>a</sup></b>	10	3	0	12	<b>1,5 ± 0,4</b>
<b>D30</b>	95	18	10	161	<b>20,125 ± 3<sup>b</sup></b>
<b>D60</b>	137	31	19	256	<b>32 ± 6,5<sup>b</sup></b>
<b>D90</b>	156	29	28	298	<b>37,25 ± 9,4<sup>b</sup></b>

<sup>a</sup> Sangue periférico de *Cebus apella* antes da administração do MNU

<sup>b</sup> Estatisticamente diferente dos demais grupos ( $P < 0,05$ )

2000 células binucleadas foram analisadas/indivíduo; DP= Desvio Padrão

A coleta de sangue em D0, mais uma vez, foi utilizado como controle negativo para que se pudesse observar a taxa basal de MN, antes da ingestão da droga. Ocorreu aumento significativo da frequência de MN nos intervalos de 30 e 60 dias após a administração do carcinôgeno e um ligeiro aumento na amostra final. Embora a maioria dos linfócitos tenha apresentado apenas um MN por célula binucleada a presença de 2 e 3 MN por linfócito tornou-se mais expressiva ao longo do tempo. Essas células são exemplificadas na figura 2.

No gráfico 3 podemos observar o comportamento da Média de MN/1000 células e sua elevação significativa em todos os intervalos ( $P < 0,05$ ). Seu crescimento se deu de forma mais acentuada após os primeiros 30 dias do consumo de MNU decrescendo nas amostras subsequentes, mas mantendo a elevação, semelhante ao que ocorreu com a Média Total de dano no cometa. A Média de MN/1000 células de D0 sofreu um aumento superior a 24 vezes ao final dos 90 dias.

Média de MN/1000 células

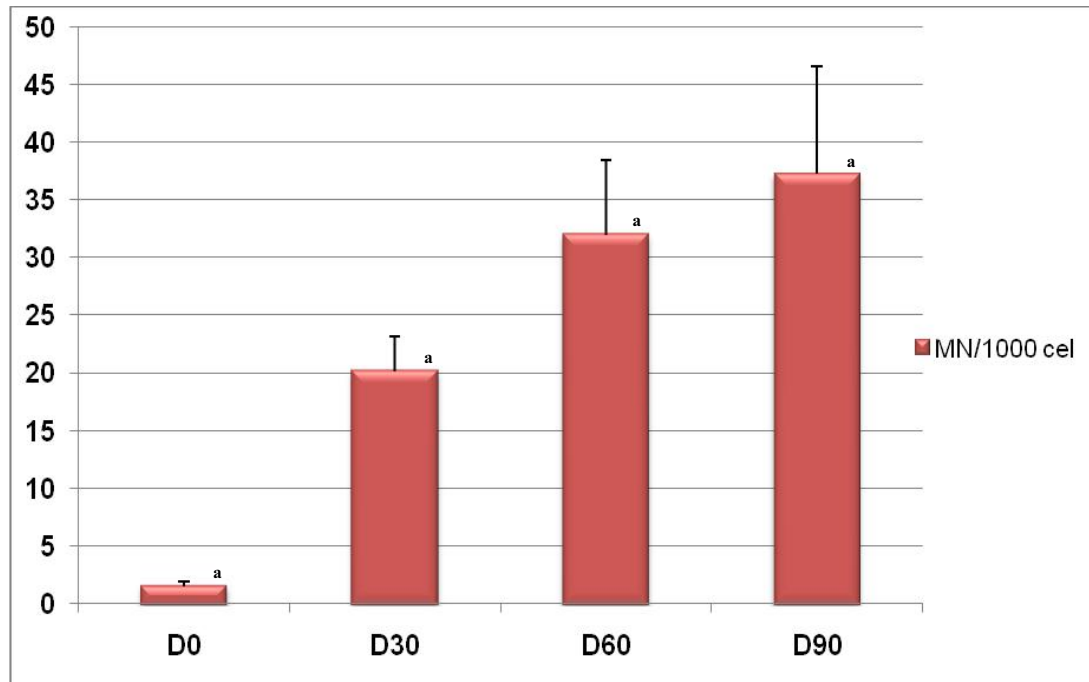


Gráfico 3 – Média de Micronúcleos a cada 1000 células ao longo do tempo.

<sup>a</sup> Estatisticamente diferente dos demais grupos ( $P < 0,05$ ).

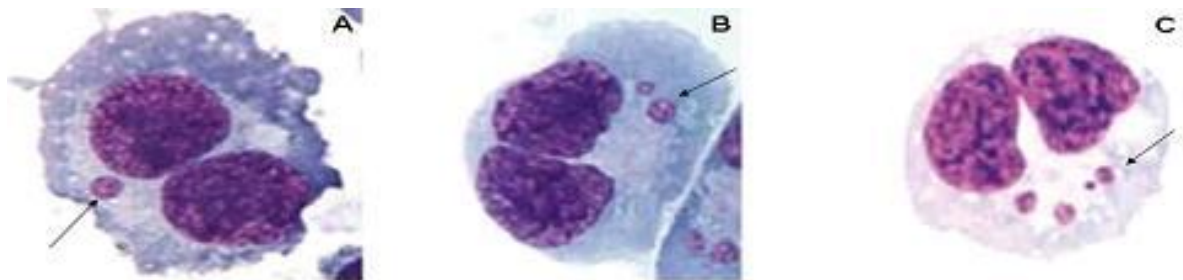


Figura 2 - Foto da formação dos Micronúcleos.

As setas indicam os Micronúcleos (MN). Na imagem A observa-se um MN em uma célula binucleada (BN).

Em B apresentam-se 2 MN em uma célula BN. Em C encontram-se 3 MN em uma célula BN.

#### 4.2 Ensaio Cometa do tecido Gástrico

Os danos inflingidos diretamente ao DNA das células gástricas foram observados através do ensaio cometa, realizado com o material colhido na Edoscopia Digestiva Alta (EDA) dos macacos no quarto mês do experimento, ou seja, em D120. A média das células por lamina permitiu a comparação das categorias de dano entre os primatas.

O gráfico abaixo mostra o percentual de células em cada categoria por animal. O padrão das curvas demonstra um comportamento semelhante entre os macacos, mas ainda sim, existiram diferenças significativas. O animal C apresentou a menor porcentagem de células sem dano e o animal B o maior percentual de células com dano total.

**Percentual da Média das Células por Animal**

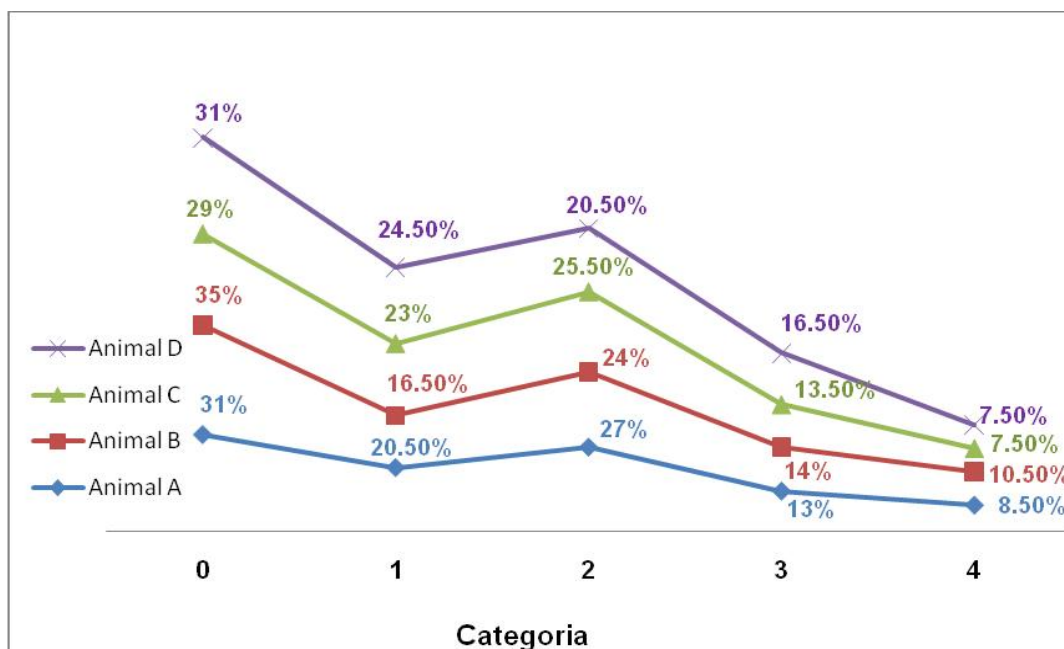


Gráfico 4 - Percentual da média das células de cada animal por Categoria de dano.

Assim como no ensaio cometa, do sangue periférico de cada animal se obteve duas lâminas com o valores absolutos de células por categorias, que foram utilizados para o cálculo de dois IDN's. Os maiores índices de dano foram registrados nas lâminas do animal C, que apresentou uma Média de IDN de 150, 5. A Média total do IDN no tecido gástrico dos quatro primatas foi de 147,875 com desvio padrão de aproximadamente 2,8.

### 4.3 Análise Histopatológica

#### Animal A:

*Bx de Antro:* Inflamação crônica moderada, com presença de mononucleares linfócitos e plasmócitos, sem agregado linfóide ou folículo linfóide hiperplásico. Atividade inflamatória de polimorfonucleares neutrófilos moderada, sem eosinófilos. Ausência de alterações metaplásicas ou displásicas. Pesquisa de *H. pylori* negativa.

*Conclusão:* Gastrite antral crônica ativa, grau moderado.

*Bx de Corpo:* Inflamação crônica leve, com presença de mononucleares linfócitos e plasmócitos, sem agregado linfóide ou folículo linfóide hiperplásico. Atividade inflamatória de polimorfonucleares neutrófilos leve, com raros eosinófilos. Ausência de alterações metaplásicas ou displásicas. Pesquisa de *H. pylori* negativa.

*Conclusão:* Gastrite crônica ativa grau leve, com raros eosinófilos.

*Bx de erosão na transição Corpo-Antro gástricos:* Inflamação crônica leve, com presença de mononucleares linfócitos e plasmócitos e agregado linfóide. Ausência de folículo linfóide hiperplásico. Atividade inflamatória de polimorfonucleares neutrófilos leve, sem eosinófilos. Ausência de alterações metaplásicas ou displásicas. Pesquisa de *H. pylori* negativa.

*Conclusão:* Gastrite crônica ativa grau leve, com agregado linfóide.

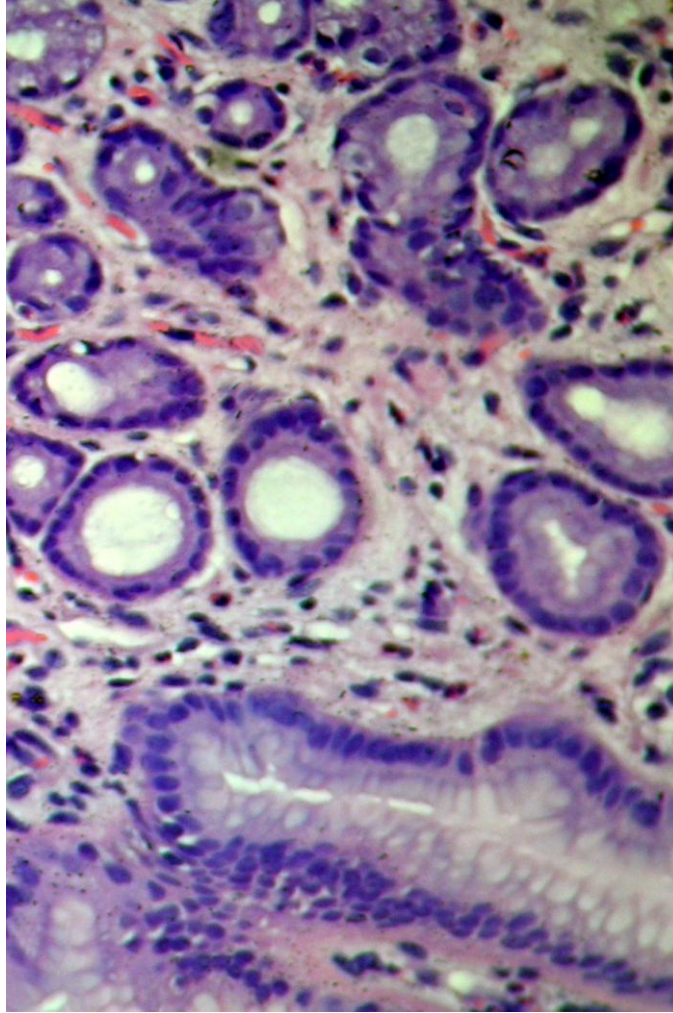


Figura 3 - Porção Foveolar do animal A

Porção foveolar de mucosa gástrica do macaco A, apresentando raros eosinófilos na lâmina própria (HE, 400x).

#### **Animal B:**

*Bx de Antro:* Inflamação crônica leve, com presença de mononucleares linfócitos e plasmócitos, sem agregado linfóide ou folículo linfóide hiperplásico. Atividade inflamatória de polimorfonucleares neutrófilos leve, com raros eosinófilos. Ausência de alterações metaplásicas ou displásicas. Pesquisa de *H. pylori* negativa.

*Conclusão:* Gastrite antral crônica ativa grau leve, com raros eosinófilo.

*Bx de Corpo:* Inflamação crônica leve, com presença de mononucleares linfócitos e plasmócitos, sem agregado linfóide ou folículo linfóide hiperplásico. Atividade inflamatória de polimorfonucleares neutrófilos leve, sem eosinófilos. Ausência de alterações metaplásicas ou displásicas. Pesquisa de *H. pylori* negativa.

*Conclusão:* Gastrite crônica ativa grau leve.

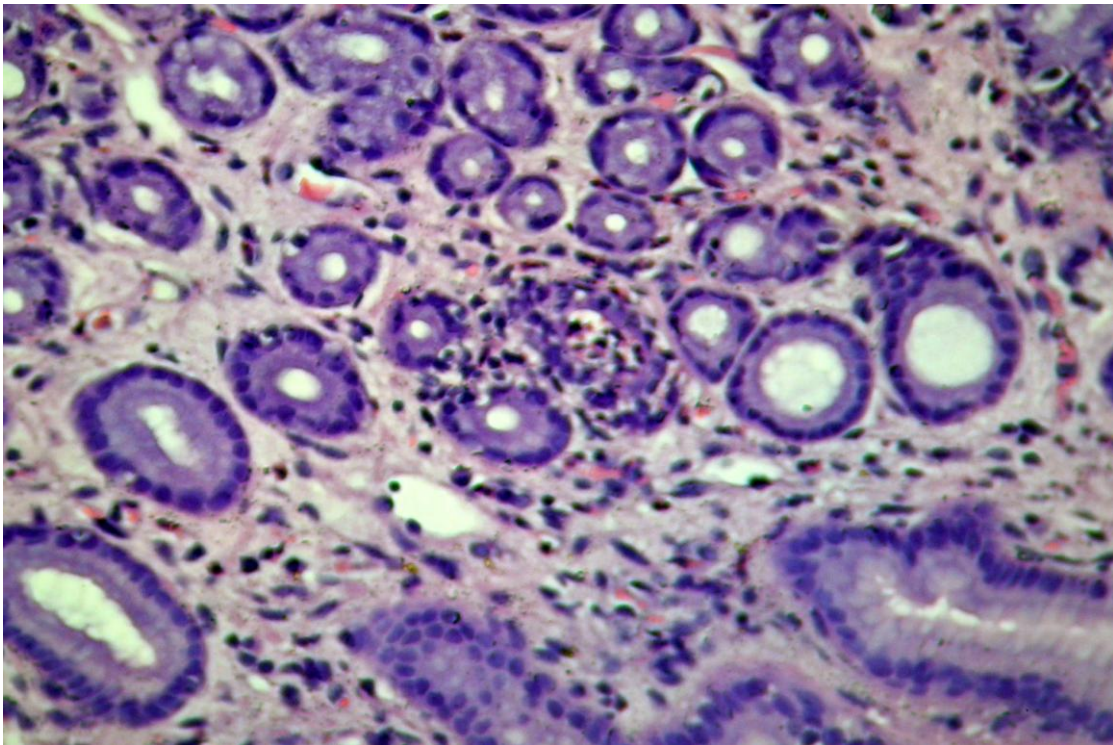


Figura 4 - Antro Gástrico do animal B

Mucosa de antro gástrico do macaco B, apresentando infiltrado inflamatório mononuclear linfoplasmocitário na lâmina própria e permeação do epitélio glandular por polimorfonucleares neutrófilos (HE, 400x).

### **Animal C:**

*Bx de Antro:* Inflamação crônica leve, com presença de mononucleares linfócitos e plasmócitos, sem agregado linfóide ou folículo linfóide hiperplásico. Atividade inflamatória de polimorfonucleares neutrófilos leve, com raros eosinófilos. Ausência de alterações metaplásicas ou displásicas. Pesquisa de *H. pylori* negativa.

*Conclusão:* Gastrite antral crônica ativa grau leve, com raros eosinófilos.

*Bx de Corpo:* Ausência de atividade inflamatória, sem mononucleares linfócitos e plasmócitos visíveis, sem agregado linfóide ou folículo linfóide hiperplásico. Sem atividade inflamatória de polimorfonucleares neutrófilos, sem eosinófilos. Ausência de alterações metaplásicas ou displásicas. Pesquisa de *H. pylori* negativa.

*Conclusão:* Ausência de alterações morfológicas significativas.

**Animal D:**

*Bx de Antro:* Inflamação crônica leve, com presença de mononucleares linfócitos e plasmócitos, sem agregado linfóide ou folículo linfóide hiperplásico. Atividade inflamatória de polimorfonucleares neutrófilos leve, com raros eosinófilos. Ausência de alterações metaplásicas ou displásicas. Pesquisa de *H. pylori* negativa.

*Conclusão:* Gastrite antral crônica ativa grau leve, com raros eosinófilos.

*Bx de Corpo:* Inflamação crônica leve, com presença de mononucleares linfócitos e plasmócitos, sem agregado linfóide ou folículo linfóide hiperplásico. Atividade inflamatória de polimorfonucleares neutrófilos leve, com raros eosinófilos. Ausência de alterações metaplásicas ou displásicas. Pesquisa de *H. pylori* negativa.

*Conclusão:* Gastrite crônica ativa grau leve, com raros eosinófilos.

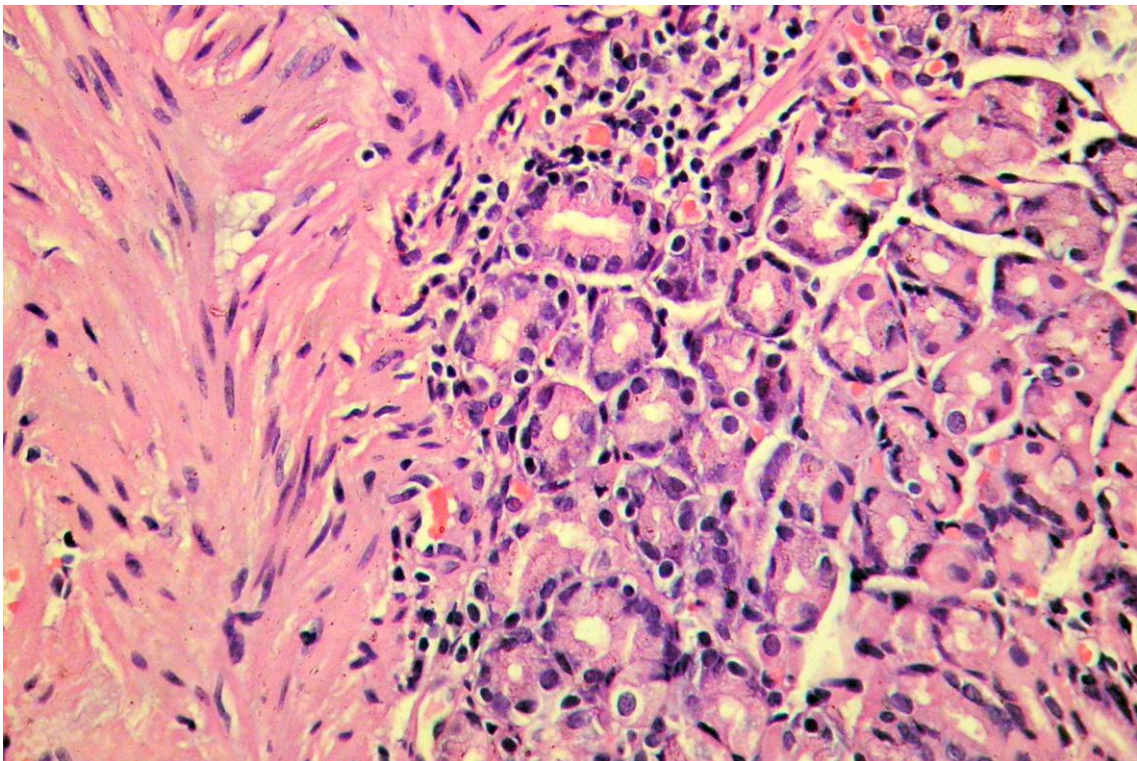


Figura 5 - Corpo Gástrico do animal D.

Mucosa de corpo gástrico do macaco D, apresentando infiltrado inflamatório mononuclear linfoplasmocitário na lâmina própria (HE, 400x).

<b>Animais</b>	<b>Localização da biópsia</b>	<b>Inflamação crônica <sup>a</sup></b>	<b>Agregado linfóide</b>	<b>Folículo linfóide hiperplásico</b>	<b>Atividade inflamatória <sup>b</sup></b>	<b>Eosinófilos</b>	<b>Metaplasia intestinal</b>	<b>Neoplasia intraepitelial (Displasia)</b>	<b>Neoplasia Invasiva</b>	<b>Infecção por H. pylori <sup>c</sup></b>
<b>Animal A</b>	Antro	Moderada	Ausente	Ausente	Moderada	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Negativa
<b>Animal A</b>	Corpo	Leve	Ausente	Ausente	Leve	Raros	Ausente	Ausente	Ausente	Negativa
<b>Animal A</b>	Corpo (Erosão)	Leve	Presente	Ausente	Leve	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Negativa
<b>Animal B</b>	Antro	Leve	Ausente	Ausente	Leve	Raros	Ausente	Ausente	Ausente	Negativa
<b>Animal B</b>	Corpo	Leve	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Negativo
<b>Animal C</b>	Antro	Leve	Ausente	Ausente	Leve	Raros	Ausente	Ausente	Ausente	Negativo
<b>Animal C</b>	Corpo	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Negativo
<b>Animal D</b>	Antro	Leve	Ausente	Ausente	Leve	Raros	Ausente	Ausente	Ausente	Negativa
<b>Animal D</b>	Antro	Leve	Ausente	Ausente	Leve	Raros	Ausente	Ausente	Ausente	Negativa

**Quadro 1** – Síntese das Alterações Microscópicas encontradas no Histopatológico.

<sup>a</sup> Mononucleares, Linfócitos e Plasmócitos; <sup>b</sup> Polimorfonucleares e Neutrófilos; <sup>c</sup> Método GRAM modificado

## 5 DISCUSSÃO

A carcinogênese é apontada como resultado de um processo progressivo onde, ao longo do tempo, são acumuladas mudanças no material genético, decorrentes da exposição contínua a múltiplos fatores ambientais, associados ou não a determinado grau de suscetibilidade individual. Esta rede de interações complexas culmina em uma adaptação tecidual, decorrente da agressão continuada: a degeneração maligna.

Dados de estudos experimentais em roedores têm sido extrapolados no sentido de inferir risco carcinogênico em humanos a partir de determinadas substâncias químicas (IATROPOULOS, 1992). Entretanto, substâncias carcinogênicas em ratos não têm necessariamente os mesmos efeitos cancerígenos em humanos, ao passo que aumentos de risco para malignização em primatas não humanos obtêm boa correlação com o que é observado em humanos (IARC, 2004).

A despeito da grande disponibilidade e fácil manejo do primata *Cebus apella* em nossa região, esta espécie nunca foi utilizada anteriormente em experimentos semelhantes. O presente estudo analisou as alterações genotóxicas e histopatológicas no sangue e no epitélio gástrico de primatas *Cebus apella*, decorrentes da administração oral continuada do N-Methyl-Nitrosureia (MNU).

Considerando-se a falta de parâmetros de viabilidade de exposição e toxicidade nessa espécie e o seu menor porte em relação aos demais primatas utilizados nos modelos consagrados, nosso estudo optou por utilizar a dose de 5mg/kg após a diluição do composto, que corresponde à menor dose sabidamente estabelecida para protocolos de carcinogênese química, pela via oral, em ratos, como refere a Sigma-Aldrich em sua folha de dados de segurança, baseada em dados do RTECS.

Nos três primeiros meses de estudo, amostras de sangue periférico serviram de substrato de análise da integridade da estrutura nuclear. Os dados obtidos através do Ensaio Cometa e do Teste do Micronúcleo foram estudados de acordo com o tempo de exposição ao agente. A amostra controle (D0) revelou 78% das células analisadas sem dano genético

(<5%). Já após os primeiros 30 dias de exposição ao MNU, houve queda no percentual de células consideradas dentro do padrão fisiológico de dano e surgimento de células com danos irreversíveis (Categorias 3 e 4), assim como foi observado aumento da frequência de células classificadas com danos leves e moderados, caracterizando padrão de genotoxicidade presente (Gráfico 1). Como ilustrado no Gráfico 2, os Índices de dano no DNA identificados pelo Ensaio Cometa foram progressivamente maiores ao longo do tempo, sugerindo um efeito genotóxico sustentado da exposição ao MNU, com elevação da média total de danos ao DNA nos quatro animais estudados em mais de 100% no primeiro mês.

Os valores da média total de danos se mantiveram em ascensão ao longo das análises, mas em valores menores que o observado no primeiro mês, sugerindo diminuição no número de células sem dano dentro do total observado em cada amostra, assim como aumento daquelas com dano nuclear irreversível. De fato, o aumento absoluto do número de micronúcleos por linfócito estudado (Tabela 1), e a elevação progressiva da média de micronúcleos para cada 1000 células binucleadas ao longo do tempo de acompanhamento (Gráfico 3), podem ser interpretados como resultado de instabilidade do ciclo celular resultante da toxicidade do agente químico (BRENDLER-SWAAB, 2005; GATÀZ, 2001; RAMIREZ, 1999).

Thorgeirsson e cols. (1994) realizaram um estudo de 22 anos de acompanhamento de primatas cinomolgus (*Macaca fascicularis*), rhesus (*Macaca mulatta*), e africanos (*Cercopithecus aethiops*) – chamados “macacos do velho mundo” – que foram expostos por via oral a diferentes agentes de potencial carcinogênico, na época, ainda não bem estabelecido. E concluíram que o MNU é um agente de ação carcinogênica direta do trato gastrointestinal nesses animais. Takayama e cols. (2008) estudaram o aparecimento de tumores por exposição à carcinógenos químicos nessas mesmas espécies por 34 anos, e obtiveram resultados semelhantes, estabelecendo o MNU como agente indutor da carcinogênese do trato gastrointestinal quando administrado por via oral na dose de 10mg/kg.

Após 120 dias de seguimento da administração oral do MNU, foi realizada a Endoscopia Digestiva Alta dos animais, com coleta de material para avaliação histopatológica e genotóxica (Ensaio Cometa *in vivo*) do tecido gástrico. A distribuição das categorias de dano ao material genético das células do epitélio gástrico evidenciou padrão de

genotoxicidade. Aproximadamente 10% das células foram identificadas com dano total (>95%) e no máximo 35% de células teciduais eram sadias (sem danos). Apesar do dano das células epiteliais gástricas, observado no Ensaio Cometa (Gráfico 4), a histopatologia da mucosa do estômago revelou alterações inespecíficas em três dos quatro animais em estudo (Quadro 1).

Estes achados configuram uma dissociação entre alterações genéticas e de expressão tecidual, que sugerem que em um período de quatro meses de exposição da espécie *Cebus apella* ao MNU na dose de 5mg/kg, é possível dar início ao processo de mutagênese celular, no entanto sem repercussão tecidual expressiva. O que pode caracterizar um processo pré-carcinogênico incipiente, uma vez que o índice de células com alto dano e perda total do material genético – alterações não esperadas fisiologicamente – pôde ser identificado em mais de 20% das células estudadas nos quatro primatas.

Em todos os animais foi observada gastrite crônica ativa com pequena eosinofilia local (Figuras 4 e 5). Um dos quatro desenvolveu gastrite crônica ativa em grau moderado com folículo linfóide identificado na histopatologia da porção foveolar (Figura 3). Assim, um período maior de acompanhamento é necessário para que seja identificada repercussão histológica e funcional significativa do agente mutagênico empregado, no trato gastrointestinal da espécie *Cebus apella*.

Alterações histológicas sabidamente envolvidas na carcinogênese gástrica estão fortemente relacionadas à infecção pelo *H. pylori*. Entretanto, modelos de indução química obtiveram resultados semelhantes nos estudos de Hagiwara e cols. (2001), com catecolaminas, sugerindo que alterações inflamatórias em menor ou maior grau são dose-dependentes e tempo-dependentes e constituem elementos integrantes do processo pré-canceroso, não necessariamente envolvendo a infecção pelo *H. pylori*.

Hattori, em 1986, colocava a metaplasia intestinal como uma condição decorrente da reação inflamatória local sustentada, sendo um evento *paracanceroso*, que pode estar presente desde antes do estabelecimento da degeneração maligna. Por outro lado, Correa e cols. (1988) conseguiram reconhecer um modelo de carcinogênese envolvendo uma cascata de eventos

progressivamente relacionados e interdependentes, constituída basicamente por gastrite crônica ativa não atrófica → atrofia multifocal → metaplasia intestinal (primeiro completa, depois incompleta) → displasia → carcinoma invasivo. É bem documentado na literatura que cada evento representa um contínuo de trocas caracterizando múltiplos eventos que se ampliam em intensidade e extensão ao longo do tempo (CORREA, 2007).

Atualmente, os esforços estão convergindo para melhor compreensão do processo pré-canceroso de maneira a identificar um ponto “gatilho” onde seja possível interferir, estabilizando o dano ao material genético da célula no sentido de alcançar uma parada na progressão das adaptações já estabelecidas (VIETH & STOLTE, 2005). Diversos trabalhos vêm sendo direcionados para o acompanhamento em longo prazo de alterações teciduais de animais submetidos a agentes potencialmente genotóxicos, com posterior caracterização do dano celular na lesão já estabelecida (CHAN, 2005; DALGARD, 1997; TAKAYAMA, 2008; THORGEIRSSON, 1994). Entretanto, segundo Correa (1994), não há um cenário típico que possa indicar de maneira objetiva quais anormalidades são patognomônicas para o desenvolvimento do carcinoma gástrico, assim como não é possível precisar em qual estágio do processo ele aparece ou qual interpretação particular pode ser extraída dos estudos de carcinogênese publicados até agora.

## 6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho mostram que a dose empregada de MNU é capaz de causar genotoxicidade e danos acumulados ao material genético da célula em um período relativamente curto de tempo. Sugerindo que doses menores do que as tradicionalmente aplicadas a primatas podem ser indutoras do processo pré-canceroso na espécie *Cebus apella*. A dissociação entre os achados moleculares e histopatológicos sustenta esta hipótese, uma vez que as alterações continuadas e cumulativas ao DNA precedem a manifestação tecidual.

As técnicas moleculares implicados neste estudo para detecção e quantificação dos danos citogenéticos foram satisfatórios, uma vez que nos permitiram observar as alterações estruturais ainda precoces no material genético dos primatas, induzidas pelo MNU desde os primeiros 30 dias de administração da droga. A sensibilidade alcançada pela combinação dos dois testes lhes confere status de bons avaliadores de exposição genotóxica nas populações.

A possibilidade de indução da carcinogênese química de maneira mais rápida e com uma dose menor de droga, associadas à ampla disponibilidade regional e fácil manejo do primata *Cebus apella*, torna esta espécie um modelo viável de experimentação animal para estudos posteriores. De fato, é fundamental que haja novas investigações para estudo da incidência de tumores espontâneos nesta espécie, e para estabelecimento de dosagens toleráveis e de doses de toxicidade nesses animais. Assim, em concentrações não tóxicas, seria necessário acompanhar por um período de tempo mais longo as alterações moleculares e epiteliais possivelmente pré-cancerosas, no intuito de acompanhar a degeneração maligna propriamente dita e seu processo de carcinogênese.

## REFERÊNCIAS

ADAMSON, R.H.; KROLIKOWSKI, F.J.; CORREA, P.; SIEBER, S.; DALGARD, D.W. Carcinogenicity of 1-methyl-1-nitrosourea in nonhuman primates. *JNC159*:415-422. 1977.

ARAÚJO-FILHO, I.; BRANDÃO-NETO, J.; PINHEIRO, L.A.; AZEVEDO, I.M.; FREIRE, F.H.; MEDEIROS, A.C. Prevalence of helicobacter pylori infection in advanced gastric carcinoma. *Arq Gastroenterol.* 4:288-92, 2006.

ASSUMPÇÃO, P.P and BURBANO. R.R. Genética e câncer gástrico. In: Linhares E, Laércio L, Takeshi S (editores). *Atualização em Câncer-Gástrico*. 1º ed. São Paulo: Tecmed Editora 95-106, 2005.

ASSUMPCAO, P.P et al. Numerical aberrations of chromosome 8 detected by conventional cytogenetics and fluorescence in situ hybridization in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 16: 45 e 49, 2006.

BARBOSA, H.P.M.; MARTINS, L.C.; SANTOS, S.E.B.; DEMACHKI, S.; ASSUMPÇÃO, M.B.; ARAGÃO, C.D.; CORVELO, T.C.O. Interleukin-1 and TNF- $\alpha$  polymorphisms and Helicobacter pylori in a Brazilian Amazon population *World J Gastroenterol* 28: 15(12): 1465-1471, 2009.

BERTUCCIO, P et al. Recent patterns in gastric cancer: A global overview. *Int. J. Cancer*: 125: 666–673 2009.

BIDINOTTO, L.T.; BARBISAN, A.L.T.S.; ROCHA, N.S.; SALVADORI, D.M.F.; BARBISAN, L.F. Effects of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on DNA damage and development of urothelial tumors in a mouse bladder carcinogenesis model. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47:624-630, 2006.

BOSETTI, C.; MALVEZZI, M.; CHATENOU, L.; NEGRI, E.; LEVI, F.; LA VECCHIA, C. Trends in cancer mortality in the Americas, 1970–2000. *Annals of Oncology* 16: 489–511, 2005.

BRACK, M. Intestinal carcinomas in two tamarins (*Saguinus fuscicollis*, *Saguinus oedipus*) of the German Primate Centre. *Lab. Anim.* 22:144-147, 1988.

BRACK, M.L. Gastrointestinal tumors observed in nonhuman primates at the German primate center. *J. Med. Primatol* 27:319-324, 1998.

Brazil, General situation and trends. *Health in the Americas*, 1998 em <<http://www.paho.org/English/HIA1998/Brazil>>. Acesso em: 17 JUL 2008.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*. 20: 245-254, 2005.

BRENNER, H.; ROTHENBACHER, D.; ARNDT, V. Epidemiology of Stomach Cancer M. Verma (ed.), *Methods of Molecular Biology, Cancer Epidemiology*, vol. 472 © 2009 Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, Totowa, NJ Book.

BUDÁN, F. et al. Early modification of c-myc, Ha-ras and p53 expressions by N-methyl-N-nitrosourea. *In Vivo*. 22:793-7, 2008.

BURLINSON, B. et al. *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth international Workgroup on genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup. *Mutation Research* 627: 31-35, 2007.

CHAN, M.M.; LU, X.; MERCHANT, F.M.; IGLEHART, J.D.; MIRON, L.P. Gene expression profiling of NMU-induced rat mammary tumors: cross species comparison with human breast cancer. *Carcinogenesis* vol.26 no.8 pp.1343--1353, 2005.

CORREA, P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res.* 48:3554-60, 1988.

CORREA, P. Is gastric cancer preventable? *Gut*, 53:1217–1219. 2004.

CORREA, P. and HOUGHTON, J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *GASTROENTEROLOGY* 133:659–672, 2007.

CORSO, C.; PARRY, J.M. Comparative genomic hybridization analysis of N-Methyl-N'-Nitrosoguanidine-Induced rat gastrointestinal tumors discloses a cytogenetic fingerprint. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 43:20–27, 2004.

CREW, K.D. and NEUGUT, A.I. Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 12:354-362, 2006.

CUI, X.S.; TORNDAL, U.B.; ERIKSSON, L.C.; MOLLER, L. Early formation of adducts DNA compared with tumor formation in a long-term study in rats administered 2-nitrofluorene. *Carcinogenesis*, 16, 2135-2141. 1995.

DALGARD, D.W. Introduction, Biological Markers, and Therapy of Tumors in Primates. Final Report of Contract No. NO1-CP-40510, The National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA, Laboratory Project Identification: CHV Study No. 421-16; 1-177. 1997.

FASSA, L. Imaging and cancer: A review. *M O L E C U L A R O N C O L O G Y* 2 115–152, 2008.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation research*, n. 392, p.11-18. 1997.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*. n° 455. p.81-95. 2000.

GALLO, J.R.; J HARRIS, E.J.; KRISHNA, U.; WASHINGTON, M.K.; PEREZ-PEREZ, G.; PEEK JUNIOR, R.M. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastric carcinogenesis. *Laboratory Investigation* 88: 328–336, 2008.

GATTÁS, G.J.F. Alterações Citogenéticas em indivíduos expostos a agentes mutagênicos do tabaco e do álcool. In: Carvalho MB. Tratado de cirurgia de cabeça e pescoço e otorrinolaringologia. São Paulo: Atheneu. p.1491, 2001.

HARTMANN, A et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18: 45–51. 2003.

HASEGAWA, R.; FUTAKUCHI, M.; MIZOGUCHI, Y.; YAMAGUCHI, T.; SHIRAI, T.; ITO, N.; LIJINSKY, W. Studies of initiation and promotion of carcinogenesis by *N*-nitroso compounds. *Cancer Letters* 123, 185–191, 1998.

HATTORI, T. Development of adenocarcinomas in the stomach. *Cancer* 57: 1528-1534, 1986.

HIROSE, M.; MAEKAWA, A.; KAMIYA, S.; ODASHIMA, S. Carcinogenic effect of *N*-etilo e *N*-amil -*N*-nitrosouredo quees oN female Donryu ratos. *Jpn. J. CanceR Res. (Gann)*, 70, 653-662, 1979.

HIROSE, M.; YAMAGUCHI, S.; FUKUSHIMA, S.; HASEGAWA, R.; TAKAHASHI, S.; ELAO, N. Promotion por dihydroXYBenzene derivatives of *N*-metilo -*N'*-nitro--*N*-Nitrosoguanidineinduc -ed rat F344 foreror mach e glandularocarcin machogenesis. *CanceR Res.*, 49, 5143-5147, 1989.

**HISTÓRICO** do Centro Nacional de Primatas – CENP. Disponível em: <[http://www.mentoronline.com.br/cenp/Apres\\_Criacao.asp](http://www.mentoronline.com.br/cenp/Apres_Criacao.asp)>. Acesso em: 20 DEZ 2008.

HÖCKER, M.; HOHENBERGER, P. Helicobacter pylori virulence factors - one part of a big picture. *Lancet*; 362: 1231–33, 2003.

HOTCHKISS, C.E et al. Flow cytometric Analysis of Micronuclei in Peripheral bloodreticulocytes IV: An index of chromosomal damage in the Rhesus Monkey (Macaca mulatta). *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 102(2), 352–358, 2008.

IARC. Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 2004; 84: 41–267.

IATROPOULOS, M.J. Accelerated rodent bio-assay predictive of chemical carcinogenesis. *Exp.Toxicol. Pathol.* 44, 481–487, 1992.

INCA. Estimativa 2009: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA 2008.

Instituto Nacional do Câncer (INCA), <http://www.inca.org.br>, 2009. Acesso em: 10 JAN 2009.

International Agency for Research on Cancer (IARC), <http://www.iarc.fr>, 2001. Acesso em: 10 JAN 2009.

KANEKO, M et al. Different genetic alterations in rat forestomach tumors induced by genotoxic and non-genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis* vol.23 no.10 pp.1729–1735, 2002.

KELLEY, J.R and DUGGAN, J.M. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *Journal of Clinical Epidemiology* 56 1–9, 2003.

KERRICK, G.P and BROWNSTEIN, D.G. Metastatic large intestinal adenocarcinoma in two rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 39:40-42. 2000.

KODAMA, M.; MURAKAMI, K.; SATO, R.; OKIMOTO, T.; NISHIZONO, A.; FUJIOKA, T. *Helicobacter pylori*-infected animal models are extremely suitable for the investigation of gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 11:7063-71. 2005.

LADEIRA, M.S.; RODRIGUES, M.A.; SALVADORI, D.M.; QUEIROZ, D.M.; FREIRE-MAIA, D.V. DNA damage in patients; nfecteD by *Helicobacter pylori*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13:631-7. 2004.

LOURENÇO, L.G.; HAMADA, G.S. **Gastric cancer in Brazil**. *Gastric Cancer* 4: 103–105, 2001.

LUCH, A. On the impact of the molecule structure in chemical carcinogenesis. *EXS.* 99:151-79. 2009.

MOURA, L.E.; FERREIRA, L.M.; CARDOSO, S.A.; RODRÍGUEZ, B.R.; ASSUMPÇÃO, P.P.; BELLO, M.J.; REY, J.A.; FERREIRA, L.F.; CASARTELLI, C. DNA mismatch repair gene methylation in gastric cancer in individuals from northern Brazil. *Biocell*, 2:237-43. 2008.

MOUTINHO, V and MARKINO, E. Epidemiological features of the gastric cancer in Belem (Brazil). *ABCD: Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva.* 3:69-74. 1988.

OHGAKI, H.; HARD, G.C.; HIROTA, N.; MAEKAWA, A.; TAKAHASHI, M. E.; KLEIHUES, P. SeleCTIVe Mutation of codons 204 e 213 of <sup>a</sup>e *p53* gene em ratos tumors induceD por alquilantes *N*-nitroso compounds. *CanceR Res.*, 52: 2995-2998, 1992.

OSTLING, O. and JOHANSON, K.J. Microeletroforetic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123: 291-298 1984.

PANANI, A.D. Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: Clinical implications. *Cancer Letters* 266: 99–115, 2008.

PARKIN, D. M.; BRAY, J.; PISANI, F.; PISANI, P., 2005. *Global Cancer Statistics, 2002*. *CA Cancer J Clin*; 55:74-108, 2005.

PAOLI, A.; MCCLURE, H.M. Gastrointestinal neoplasms in nonhuman primates: a review and report of eleven new cases. *Vet Pathol Suppl.* 27:104-25, 2008.

RAIOLA, L.C.C et al. Interrelationship between MYC gene numerical aberrations and protein expression in individuals from northern Brazil with early gastric adenocarcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics.* 181:31- 35, 2008.

RAMIREZ, A.; GATTÁS, G.J.; CARVALHO, M.B.; SALDANHA, PH. Clinical implications of micronuclei frequency as a biomonitor for alcoholic patients with oral carcinomas. *Oral Oncol.* 6:199-204, 1999.

RESENDE, A.L.S.; MATTOS, I.E.; KOIFMAN, S. Mortalidade por câncer gástrico no estado do Pará, 1980-1997. *Arq Gastroenterol* v. 43 – no.3 – jul./set. 2006.

REZENDE, A.L.S. **Mortalidade por Câncer Gástrico e Hábito Alimentar no Estado do Pará 1980-1997.** BELÉM, 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade Federal do Pará, Belém 2002.

RITTER, D.; KNEBEL, J. Genotoxicity testing in vitro – development of a higher throughput analysis method based on the comet assay. *Toxicology in Vitro* ,2009.

ROSENBERG, D.W.; GIARDINA, C.; TANAKA, T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* vol.30 no.2 pp.183–196, 2009.

RYDBERG, Band JOHANSON, K.J. Estimulation of DNA strand breaks in single mammalian cells. 1978. In: HANAWALT, P.C., FRIEDBERG, E.C., FOX, C.F. (Eds.) DNA repair mechanisms. Academic Press: New York, 465-8.

RYLANDS, A. B.; SCHNEIDER, H.; LANGGUTH, A.; MITTERMEIER, R. A. "An assessment of the diversity of new world primates". *Neotropical Primates*, v. 8, n. 2, p. 61-93, 2000.

SCHUURMAN, HJ.; SMITH, H,Y.; COZZI, E. Tolerability of cyclophosphamide and methotrexate induction immunosuppression in nonhuman primates. *Toxicology* 213: 1-12, 2005.

SHIMIZU, N.; INADA, K.; NAKANISHI, H.; TSUKAMOTO, T.; IKEHARA. Y.; KAMINISHI, M.; KURAMOTO, S.; SUGIYAMA, A.; KATSUYAMA, T.; TATEMATSU, M. Helicobacter pylori infection enhances glandular stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils treated with chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, 20:669-76, 1984.

SHIMIZU, N.; INADA, K.I.; TSUKAMOTO, T.; NAKANISHI, H.; IKEHARA, Y.; YOSHIKAWA, A.; KAMINISHI, M.; KURAMOTO, S.; TATEMATSU, M. New animal model of glandular stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils infected with Helicobacter pylori and treated with a chemical carcinogen. *J. Gastroenterol*; 34:61-6, 1999.

SIGMA-ALDRICH BRASIL. Folha de dados de segurança do produto N-NITROSO-N-METHYLUREA ISOPAC. São Paulo Abril, 2008.

SMITH, M.G.; HOLD, G.L.; TAHARA, E.; EL-OMAR, E.M. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 12:2979-90, 2006.

SOUZA, I.K.F and FEREGUETTI, T. Efeitos de extratos de própolis em modelo de carcinogênese Gástrica experimental induzida por n-metil-n'-nitro-n-nitrosuréia (nmu), em mongolian gerbils. In II Simpósio de Pesquisa e VI SEMIC – Seminário de Iniciação Científica da UNIFENAS, 2007.

SUGIYAMA, A.; MARUTA, F.; IKENO, T.; ISHIDA, K.; KAWASAKI, S.; KATSUYAMA, T.; SHIMIZU, N.; TATEMATSU, M. Helicobacter pylori infection enhances Nmethyl-N-nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in the Mongolian gerbil. *Cancer*. 58:2067-9. 1998

TAKAYAMA, S.; RENWICK, A.G.; JOHANSSON, S.L.; THORGEIRSSON, U.P.; TSUTSUMI, M.; DALGARD, D.W.; SIEBER, S.M. Long-Term toxicity and carcinogenicity study of cyclamate in nonhuman primates. *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 53, 33–39, 2000.

TAKAYAMA, S.; THORGEIRSSON, U.P.; ADAMSON, R.H. Chemical carcinogenesis studies in nonhuman primates *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 84, 2008.

TATEMATSU, M.; TSUKAMOTO, T.; TOYODA, T. Effects of eradication of *Helicobacter pylori* on gastric carcinogenesis in experimental models. *J Gastroenterol*; 42[Suppl XVII]:7–9, 2007.

TERRELL, T.G.; GRIBBLE, D.H.; SBURN, B.I. Malignant lymphoma in macaques: a clinicopathologic study of 45 cases. *J Natl Cancer Inst.* 64:561-568, 1982.

THORGEIRSSON, U.P.; DALGARD, D.W.; REEVES, J.; ADAMSON, R.H. Tumor incidence in a chemical carcinogenesis study of nonhuman primates. *Regul Toxicol Pharmacol.* 19:130-151, 1994.

TICE, R.R. et al. Single cell gel Comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 206-221, 2000.

TSUKAMOTO, T.; MIZOSHITA, T.; TATEMATSU, M. Animal Models of Stomach Carcinogenesis *Toxicologic Pathology*. 35:636–648, 2007.

VIETH, M. and STOLTE, M. Patologia de cânceres do trato gastrintestinal superior. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 19: 857-869, 2005

VALVERDE, J.D.; GRIFFEY, S.M.; ROBERTS, J.A. Spontaneous intestinal adenocarcinoma in geriatric macaques. *Camp med* 50 (5) 540 - 544. 2000.

WANG, J.P.; QI, L.; MOORE, M. R.; NG, J.C. A review of animal models for the study of arsenic Carcinogenesis. *Toxicology Letters* 13: 17–31, 2002.

**APÊNDICE A** - Tabela com resultados do Ensaio Cometa

	Grau de Dano (Valor de 0 a 4)											Análise	
	0		1		2		3		4		Índice de Dano		Média do índice
	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	
<b>Controle Negativo D0</b>													
Animal A	78	85	8	10	10	3	4	2	0	0	40	22	31
Animal A	72	79	16	13	11	8	1	0	0	0	41	29	35
Animal A	76	75	14	19	4	6	6	0	0	0	40	31	35.5
Animal A	79	83	11	11	5	4	5	2	0	0	36	25	30.5
<b>Média total/D.P</b>													<b>33 / 2.6</b>
<b>Segunda Coleta D30</b>													
Animal A	64	61	19	14	12	20	4	2	1	3	59	72	65.5
Animal B	61	66	18	12	15	16	4	2	4	2	76	58	67
Animal C	61	59	17	13	19	18	5	4	2	2	78	69	73.5
Animal D	65	62	17	15	16	14	5	3	2	1	72	56	64
<b>Média total/D.P</b>													<b>6.5 / 4.183</b>
<b>Terceira Coleta D60</b>													
Animal A	52	50	17	15	25	21	7	8	3	2	100	89	94.5
Animal B	56	51	10	14	21	25	8	7	5	3	96	97	96.5
Animal C	56	49	11	15	19	24	9	6	5	6	96	105	100.5
Animal D	53	55	17	19	14	16	12	7	4	3	97	84	90.5
<b>Média total/D.P</b>													<b>95.5 / 4.163</b>
<b>Quarta Coleta D90</b>													
Animal A	45	41	20	24	23	22	8	9	4	4	106	111	108.5
Animal B	46	44	21	20	20	23	9	8	4	5	104	110	107
Animal C	37	42	17	20	23	27	11	8	9	6	132	122	127
Animal D	47	45	21	23	16	18	13	8	5	4	112	99	105.5
<b>Média total/D.P</b>													<b>112 / 10.074</b>

**APÊNDICE B** – Tabela com resultado do Micronúcleo

<b>Controle Negativo D0</b>	<b>No. Cel.</b>	<b>0 MN</b>	<b>1 MN</b>	<b>2 MN</b>	<b>3 MN</b>	<b>Total</b>	<b>MN/1000 Cel.</b>
Animal A	2000	1998	3	0	0	3	1.5
Animal B	2000	1996	2	2	0	2	1
Animal B	2000	1997	3	0	0	3	1.5
Animal C	2000	1997	2	1	0	4	2
<b>Total</b>			10	3	0	12	
<b>Desvio Padrão / Média</b>							<b>0.4 / 1.5</b>
<b>Segunda Coleta D30</b>							
Animal A	2000	1952	22	7	4	48	24
Animal B	2000	1959	27	4	2	41	20.5
Animal C	2000	1965	21	3	4	39	19.5
Animal D	2000	1967	25	4	0	33	16.5
<b>Total</b>			95	18	10	161	
<b>Desvio Padrão / Média</b>							<b>3.09 / 20.125</b>
<b>Terceira Coleta D60</b>							
Animal A	2000	1923	34	11	7	77	38.5
Animal B	2000	1932	40	8	4	68	34
Animal B	2000	1935	36	7	5	65	32.5
Animal C	2000	1954	27	5	3	46	23
<b>Total</b>			137	31	19	256	
<b>Desvio Padrão / Média</b>							<b>6.51 / 32</b>
<b>Quarta Coleta D90</b>							
Animal A	2000	1923	51	12	6	93	46.5
Animal B	2000	1932	45	7	8	83	41.5
Animal B	2000	1935	35	4	10	73	36.5
Animal C	2000	1954	25	6	4	49	24.5
<b>Total</b>			156	29	28	298	
<b>Desvio Padrão / Média</b>							<b>9.429 / 37.25</b>

**ANEXO A** – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação



**PARECER MED002/2007**

**Projeto:** AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO BIOPRODOTO *MÉTODO CANOVA* EM MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER GÁSTRICO EM PRIMATAS NÃO HUMANOS.

**Coordenador:** PAULO PIMENTEL DE ASSUMPÇÃO.

**Área Temática:** Medicina

**Vigência:** 01-01-2008 a 31-12-2009

O Projeto intitulado “AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO BIOPRODOTO *MÉTODO CANOVA* EM MODELO EXPERIMENTAL DE CÂNCER GÁSTRICO EM PRIMATAS NÃO HUMANOS” foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE) e os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para manipulação e uso de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das suas atribuições, resolve APROVAR a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora deste período devem receber nova autorização deste comitê.

Prof. Dr. Antônio Pereira  
Presidente do CEPAE/UFPA