

Paulo César Bálade Saad

**Efeitos da Associação do Beta-Caroteno, Alfa-Tocoferol e do Fumo no Câncer de Pulmão**

São José do Rio Preto

2006

Paulo César Bálade Saad

**Efeitos da Associação do Beta-Caroteno, Alfa-Tocoferol e do Fumo no Câncer de Pulmão**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Área de Concentração: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Maluf Cury

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2006

#### Ficha catalográfica

Saad, Paulo César Bálade.

Efeitos da associação do beta-caroteno, alfa-tocoferol e do fumo no câncer de pulmão / Paulo César Bálade Saad. São José do Rio Preto, 2006.

92 f. : il.

Tese (Doutorado) – FAMERP

Área de Concentração: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Maluf Cury.

1. Beta-caroteno. 2. Alfa-tocoferol. 3. Fumo. 4. Uretana.  
5. Neoplasias pulmonares. I. Título. II. Cury, Patrícia Maluf.

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Câncer de pulmão.....	01
1.2 Fumo.....	04
1.3 Beta-caroteno e alfa-tocoferol.....	07
1.4 Fatores de proteção ao câncer.....	09
1.5 Uretana.....	12
1.6 Modelo experimental.....	13
1.7 Objetivos.....	14
2 MATERIAL E MÉTODO.....	15
2.1 Animais utilizados.....	15
2.2 Exposição ao fumo e medida do monóxido de carbono.....	15
2.3 Indução dos tumores e coleta do material.....	16
2.4- Análise histológica.....	19
2.5 Análise morfométrica.....	19
2.6 Controle de ração e peso.....	22
2.7 Grupos experimentais.....	23
2.8 Análise estatística.....	29

3 RESULTADOS.....	30
3.1 Análise histológica.....	32
3.1.1 Contagem de nódulos e hiperplasias.....	32
3.2 Análise morfométrica.....	41
3.2.1 Área dos nódulos.....	41
3.2.2 Contagem de pontos.....	46
4 DISCUSSÃO.....	49
4.1 Efeito do cigarro na evolução dos tumores induzidos por uretana.....	50
4.2 Efeitos do beta-caroteno e do alfa-tocoferol no processo de carcinogênese pulmonar.....	56
CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
ANEXOS.....	75

À Laís,  
pelo apoio e companheirismo em todos os momentos de minha vida.

Aos meus filhos Ricardo, Maria Eduarda e Maria Júlia.....  
razão de tudo.

Aos meus pais.....  
sei que se orgulhariam.

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Maluf Cury, orientadora e amiga, pelos ensinamentos e pela oportunidade. Aprendi que o jeito mais fácil de crescer como pessoa é conviver com pessoas melhores que eu.

Ao Prof. Dr. José Antonio Cordeiro, sempre prestativo e competente na análise estatística.

Ao Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile, cujo convívio aumentou minha admiração e respeito, e pela forma digna com que fui recebido em um momento difícil, mas decisivo para a concretização deste sonho.

Ao Prof. Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann pelo apoio no início do programa, tornando possível esta caminhada.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Azoubel, verdadeiro pesquisador, exemplo para todos nós.

Aos companheiros e fundamentais Maury Faria Jr. e Bianca Rocha, sempre prontos e estimulados. Nossa vitória foi pelo trabalho em equipe.

A todos os funcionários da FAMERP que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial ao Júlio, Marcos, João, Pedro, Valter, Florêncio e principalmente ao Sr. Bizuti, cuja experiência e criatividade foram fundamentais na preparação da ração e à Cecília pela confecção das lâminas histológicas.

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga e à colega Prof<sup>ª</sup> M.Sc. Ana Maria Galvan Custódio, pela utilização do analisador de imagens do laboratório de microscopia e microanálise do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Ibilce) - UNESP, campus de São José do Rio Preto.

Ao Prof. M.Sc. Halim Atique Neto, diretor do Hospital Veterinário do Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP pela utilização do laboratório de microscopia, e ao médico veterinário Rodrigo Storti, pelo auxílio na captura das imagens histológicas para a morfometria.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Analúcia Rampazzo Xavier pela ajuda na interpretação dos artigos e informações bioquímicas, além das dicas durante nossas conversas de corredor.

Ao Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP, em especial às Pró-Reitorias Acadêmica e de Pesquisa e Pós-Graduação, pelo apoio para a concretização do trabalho.

Aos amigos Prof. M.Sc. Eduardo Martini Romano e Prof. M.Sc. Rubens da Silva, pela cobertura frente às minhas atividades na Coordenação do Curso de Fisioterapia para que pudesse me dedicar à elaboração deste trabalho.

***A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios....  
Por isso, cante, ria, dance, chore  
e viva intensamente cada momento da sua vida...  
...antes que a cortina se feche  
e a peça termine sem aplausos.***

*(Charles Chaplin)*



## LISTA DE FIGURAS

### **FIGURA 1: CÂMARA DE EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DO CIGARRO**

Compressor com fluxo contínuo (A), frasco contendo três cigarros (B) e câmara de exposição dos animais à fumaça dos cigarros (C).....20

### **FIGURA 2: VISTA MACROSCÓPICA DOS NÓDULOS PULMONARES**

Nódulos visíveis macroscopicamente em pulmões de camundongos submetidos à uretana. (A)- Grupo 3 – só uretana e (B)- Grupo 2- uretana + cigarro.....22

### **FIGURA 3: VISTA MICROSCÓPICA – NÓDULO E HIPERPLASIA**

(A) Hiperplasia pulmonar e (B) Nódulo pulmonar. 100X, Hematoxilina e Eosina.....23

### **FIGURA 4: ANALISADOR DE IMAGEM DIGITAL**

Analisador de imagens *Image-Pro<sup>â</sup>Plus version 4.5 for Windows* software acoplado a um microscópio *Olympus modelo BX60* de pesquisa.....24

### **FIGURA 5: CONTAGEM DE PONTOS**

Retículo coerente de 168 pontos e 84 linhas impressa em transparência, colocado em frente à imagem da lâmina no monitor do computador para a contagem de pontos.....25

### **FIGURA 6: PREPARO DA RAÇÃO EM LABORATÓRIO**

Preparo de ração com suplementação de beta-caroteno.....27

**FIGURA 7: EVOLUÇÃO DO PESO**

Evolução semanal do peso médio dos camundongos dos grupos experimentais. Valores em gramas (g).....34

**FIGURA 8: CONSUMO DE RAÇÃO**

Evolução diária do consumo de ração dos camundongos. Valores em gramas (g) .....35

**FIGURA 9: NÚMERO DE NÓDULOS**

Representação gráfica do tipo “box-plot”. Contagem microscópica do número de nódulos por grupo. ....40

**FIGURA 10: NÚMERO DE HIPERPLASIAS**

Representação gráfica do tipo “box-plot”. Contagem microscópica do número de hiperplasias por grupo.....40

**FIGURA 11: NÓDULOS E HIPERPLASIAS – ESTUDO DOSE-RESPOSTA 1**

Média do número de nódulos e hiperplasias verificados nos animais dos grupos GDR-0, GDR-30 e GDR-60.....43

**FIGURA 12: NÓDULOS E HIPERPLASIAS – ESTUDO DOSE-RESPOSTA 2**

Média do número de nódulos e hiperplasias verificados nos animais dos grupos G2, GDR-2,5 e G3. ( $p = 0,016$  para nódulos). Não há evidência de diferença significativa quanto ao tempo de exposição ao cigarro.....44

**FIGURA 13: NÓDULOS E HIPERPLASIAS – ESTUDO DOSE-RESPOSTA 2**

Representação gráfica do tipo “box-plot”. Contagem microscópica da soma de nódulos e hiperplasias dos grupos G2, G2,5 e G3.....45

**FIGURA 14: MENOR ÁREA**

Representação gráfica do tipo “box-plot”.

O grupo G2 (uretana + cigarro) mostrou-se menor que G4 (beta-caroteno 0,25% + uretana + cigarro) ( $p=0,03$ ) e G8 (beta-caroteno 0,25% + uretana ) ( $p=0,047$ ).....48

**FIGURA 15: MAIOR ÁREA**

Representação gráfica do tipo “box-plot”.

O grupo G2 (uretana + cigarro) mostrou-se menor que G4 (beta-caroteno 0,25% + uretana + cigarro) ( $p=0,03$ ).....48

**FIGURA 16: MÉDIA DAS ÁREAS**

Representação gráfica do tipo “box-plot”.

Os grupos G4 (beta-caroteno 0,25% + uretana + cigarro) e G8 (beta-caroteno 0,25% + uretana) apresentaram maior média das áreas que G2 (uretana + cigarro) e G3 (só uretana) ( $p=0,028$ ).....49

**FIGURA 17: SOMA DAS ÁREAS**

Representação gráfica do tipo “box-plot”.

O grupo G2 (uretana + cigarro) apresentou a soma das áreas menor que os grupos G4 (beta-caroteno 0,25% + uretana + cigarro) ( $p=0,018$ ) e G3 (só uretana) ( $p=0,047$ ).....49

**FIGURA 18: MORFOMETRIA – CONTAGEM DE PONTOS**

Representação gráfica do tipo “box-plot”. Valores relativos à contagem de pontos. (A) - fração nuclear (Fnuc), (B) - fração citoplasmática (Fcit), (C) - fração estromal (F.est) e (D) - relação núcleo- citoplasma (N/C). A fração estromal dos grupos G3 e G4 foram menores que os grupos G2, G5 e G7 ( $p=0,011$ ), e a do grupo G7 foi maior que os grupos G2 e G10 ( $p=0,011$ ). A fração nuclear do grupo G5 foi menor que o grupo G7 ( $p=0,04$ ).....52

## LISTA DE TABELAS

### **TABELA 1: NÚMERO DE NÓDULOS**

Dados obtidos da contagem microscópica do número de nódulos pulmonares nos animais dos grupos experimentais.....38

### **TABELA 2: NÚMERO DE HIPERPLASIAS**

Dados obtidos da contagem microscópica do número de nódulos pulmonares nos animais dos grupos experimentais.....39

### **TABELA 3 – ÁREA DOS NÓDULOS PULMONARES**

Valores em  $\mu\text{m}^2$  relativos a menor área, maior área, média das áreas e soma das áreas.....47

### **TABELA 4– MORFOMETRIA - CONTAGEM DOS PONTOS**

Dados obtidos para a morfometria pela técnica de contagem de pontos - fração nuclear (Fnuc), fração estromal (F.est) e a relação núcleo- citoplasma (N/C).....51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

*ad libitum* - à vontade

**aiq** - amplitude interquartílica

**ATBC** - Alpha-tocopherol, Beta-carotene Cancer Prevention Study

**CARET** - Beta-carotene and Retinol Efficacy Trial

**CO** – Monóxido de carbono

**Cm** - centímetros

**DDT** - Dicloro–Difenil–Tricloroetano

**DEN** – dietilnitrozaminas

**DNA** - Ácido Desoxirribonucléico

**dp** – desvio padrão

**EUA** – Estados Unidos da América

**E<sub>t</sub>OCONH<sub>2</sub>** - Carbamato de etila

**F<sub>cit</sub>** - fração citoplasmática

**F<sub>est</sub>** - fração estromal

**F<sub>nuc</sub>** - fração nuclear

**G1** - Grupo 1 - controle só cigarro

**G2** - Grupo 2 - uretana + cigarro

**G3** - Grupo 3 - só uretana

**G4** - Grupo 4 - beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

**G5** - Grupo 5 - beta caroteno 0,05 + uretana + cigarro

**G6** - Grupo 6 beta caroteno 0,005% + uretana + cigarro

**G7** - Grupo 7 - alfa tocoferol 0,25% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

**G8** - Grupo 8 - beta caroteno 0,25% + uretana

**G10** - Grupo 10 - alfa tocoferol 0,05% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

**G11** - Grupo 11 - alfa tocoferol 0,005% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

**GDR 0** – Grupo dose-resposta zero – só uretana (60 dias)

**GDR 30** – Grupo dose-resposta trinta dias - uretana + cigarro (30 dias)

**GDR 60** - Grupo dose-resposta sessenta dias - uretana + cigarro (60 dias)

**GDR 2,5** – Grupo dose-resposta dois e meio - uretana + cigarro (60 dias) + observação (60 dias)

**INCA** – Instituto Nacional de Câncer

**ml** – mililitros

**mm**- milímetros

**mg** - miligramas

**mg/Kg** – miligramas por quilo

**nº** - número

**N/C** – relação núcleo - citoplasma

**NaCl** – cloreto de sódio

**NCI** – Instituto Nacional do Câncer

**O<sub>2</sub>** - oxigênio

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**OPAS** – Organização Pan-Americana da Saúde

**PHS** - Physicians' Health Study

**ppm** – parte por milhão

**SUVIMAX** - Suplementação com Vitaminas e Minerais Antioxidantes

**Vigescola** – Vigilância de Tabagismo em Escolares

## RESUMO

O hábito de fumar cigarros é responsável pela morte de milhões de pessoas por ano em todo o mundo, estando diretamente relacionado ao câncer de pulmão. Estudos demonstraram que maiores índices plasmáticos de beta-caroteno ou a grande ingestão de alimentos ricos em carotenóides diminuem o risco de desenvolver esta neoplasia. Por outro lado, existem estudos que sugerem que o pulmão de fumantes pode alterar o metabolismo do beta-caroteno, gerando maior risco de alterações celulares e neoplasias. É provável que o alfa-tocoferol tenha efeito benéfico sobre esta associação. **Objetivo:** Avaliar a participação do beta-caroteno e do alfa-tocoferol no desenvolvimento de câncer de pulmão induzido por uretana e sua relação com a exposição ao cigarro. **Material e Método:** Camundongos Balb C foram divididos em 10 grupos: G1(cigarro), G2(cigarro e uretana), G3 (uretana), G4, G5 e G6 (cigarro, uretana e beta-caroteno a 0,25; 0,05 e 0,005% respectivamente), G8 (uretana e Beta-caroteno a 0,25%), G7, G10 e G11 (cigarro, uretana e beta-caroteno a 0,25 e alfa-tocoferol a 0,25; 0,05 e 0,005% respectivamente). A exposição ao cigarro ocorreu durante 10 minutos, 2 vezes por dia, 5 dias por semana, por 16 semanas. Para a indução de tumores, foi administrada uretana por via intraperitoneal na dose de 3,0mg/Kg. Foram quantificados nódulos e hiperplasias, realizada análise morfométrica dos nódulos e submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney para análise estatística. **Resultados:** O grupo G3 apresentou maior número de nódulos ( $P=0,001$ ), menor fração estromal ( $P=0,011$ ) e maior soma da área de tumor ( $P=0,047$ ) comparado ao grupo G2. O grupo G8, mostrou-se com menor número de nódulos ( $P=0,013$ ) e hiperplasias ( $P=0,05$ ) comparados ao grupo G3. As duas doses menores de beta-caroteno (G5 e G6) se mostraram estatisticamente semelhantes, porém com menor número de nódulos quando comparados ao grupo G4 ( $P=0,04$ ). O grupo G4 apresentou menor número de hiperplasias que G8, porém o número de nódulos não se alterou ( $P=0,045$ ). A fração estromal dos grupos G3 e G4 foram semelhantes, porém menores que G2 e G5 ( $P=0,011$ ). Quanto ao alfa-tocoferol, a fração estromal do grupo G7 foi maior que a dos grupos G2, G3, G4 e G10 ( $P=0,011$ ). A dieta com beta-caroteno a 0,25% aumentou a área dos nódulos, demonstrada pela maior área ( $P=0,03$ ), menor área ( $P=0,03$ ), soma das áreas ( $P=0,018$ ) e média das áreas ( $P=0,006$ ) no grupo G4 comparada com o grupo G2. **Conclusão:** Com estes resultados, concluiu-se que na evolução de tumores induzidos por uretana em camundongos o fumo passivo se comporta como um fator protetor, porém não há evidência de que seja dose-dependente. A suplementação de beta-caroteno na dose de 0,25% também age como protetor, porém associada ao fumo passivo tem efeito menor do que em doses mais baixas (0,05 e 0,005%). A exposição à fumaça do cigarro não altera o número de nódulos quando na presença de dieta com beta-caroteno a 0,25%, porém o número de hiperplasias com a presença do cigarro diminui. A associação do alfa-tocoferol ao beta-caroteno 0,25% e ao fumo passivo gera um fator protetor, principalmente na dose 0,25%.

### Palavras Chaves:

Beta-caroteno; Alfa-tocoferol; Fumo; Uretana; Neoplasias pulmonares.



## ABSTRACT

Cigarettes accounts for the death of millions of people a year worldwide, directly related to lung cancer. Some studies have shown that larger plasmatic indexes of beta-carotene or a great ingestion of foods rich in carotenoids diminish the risk of developing this neoplasia. On the other hand, studies suggest that the smokers' lung can alter the metabolism of beta-carotene, that is, producing greater risk of cell alterations and neoplasias. It is probable that the alpha-tocopherol has beneficial effect on this association. **Objective:** To evaluate the participation of beta-carotene and alpha-tocopherol in the development of lung cancer induced by urethane and its relationship with cigarette exposition. **Material and Method:** Balb C mice were divided into 10 groups: G1(cigarette), G2 (cigarette and urethane), G3 (only urethane), G4, G5 and G6 (cigarette, urethane and beta-carotene to 0.25, 0.05 and 0.005%, respectively), G8 (urethane and beta-carotene to 0.25%), G7, G10 and G11 (cigarette, urethane and beta-carotene to 0.25 and alpha-tocopherol 0.25; 0.05 and 0.005%, respectively). The exposition to the cigarette was for 10 minutes, twice a day, 5 days a week, during 16 weeks. For induction of tumors, urethane was administered intraperitoneally, in the dose of 3.0mg/Kg. Nodules and hyperplasias were quantified; morphometric analyses of the nodules were performed. Kruskal-Wallis and of Mann-Whitney tests were used for statistical analysis. **Results:** Group G3 presented greater number of nodules ( $P=0.001$ ), smaller stromal fraction ( $P=0.011$ ) and greater sum of the tumor area ( $P=0.047$ ) compared to group G2. Group G8 showed smaller number of nodules ( $P=0.013$ ) and hyperplasias ( $P=0.05$ ) compared to group G3. Both smaller doses of beta-carotene (G5 and G6) were statistically similar, although with smaller number of nodules when compared to group G4 ( $P=0.04$ ). Group G4 presented smaller number of hyperplasias than G8, however, the number of nodules did not alter ( $P=0.045$ ). Stromal fraction of groups G3 and G4 was similar, although smaller than G2 and G5 ( $P=0.011$ ). According to the alpha-tocopherol, the stromal fraction of group G7 was greater than the one of the groups G2, G3, G4 and G10 ( $P=0.011$ ). The 0.25%-beta-carotene diet increased the area of the nodules, demonstrated by the largest area ( $P=0.03$ ), smaller area ( $P=0.03$ ), sum of the areas ( $P=0.018$ ) and average of the areas ( $P=0.006$ ) in group G4 when compared to G2. **Conclusion:** According to these results, it was concluded that passive tobacco can be a protecting factor in the evolution of tumors induced by urethane in mice, however, there is no evidence that this could be dose-dependent. The supplementation of beta-carotene in 0.25%-dose can also be a protecting factor, however, associated to passive tobacco it has smaller effect than in lower doses (0.05 and 0.005%). The exposition to cigarette smoke does not alter the number of nodules induced by urethane in mice when in the presence of 0.25%-beta-carotene diet; however the hyperplasia number with the presence of the cigarette diminished. The association of the alpha-tocopherol to the 0.25%- beta-carotene and the passive tobacco produces a protecting factor, mainly in the dose of 0.25%.

### Keywords:

Beta-carotene; Alpha-tocopherol; Tobacco; Urethane; Lung cancer.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer de pulmão

Segundo o “*Informe Mundial sobre o Câncer*”, sua incidência poderá aumentar 50% até 2020, ano para o qual são projetados 16 milhões de novos casos. Esse aumento é creditado ao envelhecimento da população mundial e aos efeitos do tabagismo e de hábitos de vida “insanos”. Numa perspectiva mundial, há motivos justificados para centrar as atividades preventivas contra o câncer em dois fatores em particular, o tabaco e a dieta, porque foram responsáveis por 43% de todas as mortes por câncer em 2000, representando 2,7 milhões de óbitos. No ano 2000, cerca de 10 milhões de pessoas apresentaram tumores malignos e 6,2 milhões morreram por essa causa <sup>(1)</sup>.

O câncer de pulmão está em primeiro lugar como causa de morte por câncer. É um dos tumores mais freqüentes, perdendo para o de pele, o de próstata em homens e o de mama em mulheres <sup>(2)</sup>.

O número de casos novos de câncer de pulmão estimados para o Brasil em 2006, é de 17.850 entre homens e de 9.320 nas mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 19 casos novos a cada 100 mil homens e 10 para cada 100 mil mulheres. Excluindo-se os tumores de pele não melanoma, o câncer de pulmão em homens é o segundo mais freqüente nas regiões Sul (37/100.000), Sudeste (24/100.000) e Centro-Oeste (16/100.000), sendo nas regiões Norte (8/100.000) e Nordeste (8/100.000) o terceiro mais freqüente. Para as mulheres é o quarto mais freqüente nas regiões Sul (16/100.000), Sudeste (12/100.000), Centro-Oeste (9/100.000) e Norte (5/100.000), sendo o quinto mais freqüente na região Nordeste (5/100.000) <sup>(3)</sup>.

Na população masculina mundial, o hábito de fumar continua sendo responsável pela maioria dos casos diagnosticados de câncer de pulmão (podendo chegar a mais de 90% em alguns países ou regiões). Nas mulheres, pode-se atribuir cerca de metade dos casos de câncer pulmonar ao tabagismo <sup>(3)</sup>.

O câncer de pulmão permanece como uma doença altamente letal. A sobrevida média cumulativa total em cinco anos varia entre 13 e 21% em países desenvolvidos e entre 7 e 10% nos países em desenvolvimento. O fator de risco mais importante para o desenvolvimento do câncer de pulmão é o fumo. Este hábito é capaz de aumentar este risco em 20 a 30 vezes em tabagistas de longa data e em 30 a 50% em fumantes passivos, não existindo nenhuma dose ou quantidade segura para o consumo. As taxas de incidência em um determinado país refletem seu consumo de cigarros <sup>(3)</sup>.

Outros fatores relacionados são certos agentes químicos (como o arsênico, asbesto, berílio, cromo, radônio, níquel, cádmio e cloreto de vinila, principalmente encontrados no ambiente ocupacional), fatores dietéticos (baixo consumo de frutas e verduras), a doença pulmonar obstrutiva crônica (enfisema pulmonar e bronquite crônica), fatores genéticos (que predispõem à ação carcinogênica de compostos inorgânicos de asbesto e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) e história familiar de câncer de pulmão <sup>(3)</sup>.

Embora seja conhecido que a abstinência ao fumo seja a forma mais eficiente de prevenção, a taxa de fumantes permanece elevada, especialmente entre adolescentes <sup>(4)</sup>. A OMS estima que um terço da população mundial adulta, isto é, 1 bilhão e 200 milhões de pessoas (entre as quais 200 milhões de mulheres), sejam fumantes. Pesquisas comprovam que aproximadamente 47% de toda a população

masculina e 12% da população feminina no mundo fumam. Enquanto nos países em desenvolvimento os fumantes constituem 48% da população masculina e 7% da população feminina, nos países desenvolvidos a participação das mulheres mais do que triplica: 42% dos homens e 24% das mulheres têm o comportamento de fumar <sup>(3)</sup>.

De acordo com o *Inquérito Domiciliar sobre Comportamentos de Risco e Morbidade Referida de Doenças e Agravos Não Transmissíveis*, realizado em 2002 e 2003 pelo INCA, entre pessoas de 15 anos ou mais, residentes em 15 capitais brasileiras e no Distrito Federal, a prevalência de tabagismo variou de 12,9 a 25,2% nas cidades estudadas. Os homens apresentaram prevalências mais elevadas do que as mulheres em todas as capitais. Essa pesquisa também mostrou que a concentração de fumantes é maior entre as pessoas com menos de oito anos de estudo. Em relação à prevalência de experimentação e uso de cigarro entre jovens, de acordo com estudo Vigilância de Tabagismo em Escolares (VIGESCOLA) realizado entre escolares de 12 capitais brasileiras, nos anos de 2002-2003 a prevalência da experimentação nessas cidades variou de 36 a 58% no sexo masculino e de 31 a 55% no sexo feminino, enquanto a prevalência de escolares fumantes atuais variou de 11 a 27% no sexo masculino e 9 a 24% no feminino <sup>(3)</sup>.

## **1.2 Fumo**

O cigarro contém mais de 4500 substâncias, distribuídas como fase gasosa e fase particulada. O constituinte mais importante da fase gasosa é o nitrogênio, numa proporção de 55 a 72% do total; em seguida aparecem o oxigênio com 9,2 a 14,3%; o gás carbônico com 6,9 a 13,4% e o monóxido de carbono com 1,9 a 6,3%. Outras 500 substâncias (benzeno, amônia, tolueno, acetaldeído, acroleína etc)

encontram-se na fase gasosa do cigarro. A fase particulada do cigarro contém, pelo menos, 3500 outras substâncias (alcatrão, nicotina, colesterol, fenol, ácido fórmico, ácido acético, chumbo, cádmio, zinco, níquel etc). O tabaco contém, ainda, substâncias radioativas tais como o rádio-226 e polônio-210. Os fertilizantes fosfatados são a principal fonte destes radioelementos <sup>(5)</sup>.

A corrente principal da fumaça do cigarro é a aquela que é filtrada pelo cigarro e diretamente inalada pelo fumante, enquanto a corrente secundária é a que sai da extremidade do cigarro aceso e se espalha diretamente no ar ambiente. A corrente secundária é muito mais importante como elemento poluente do ar ambiente, por não ser filtrada e, conseqüentemente, ter altas concentrações dos materiais tóxicos gasosos e particulados do cigarro <sup>(5)</sup>.

Em 1993, Henningfield et al.<sup>(6)</sup> relataram que a queima de um cigarro produz monóxido de carbono e dezenas de outros produtos tóxicos responsáveis pela alteração da oxigenação dos tecidos, além de liberar nicotina (amina terciária volátil capaz de estimular, deprimir ou perturbar o sistema nervoso central e todo o organismo, dependendo da dose e da frequência com que é utilizada), responsável pela dependência do tabaco.

Aproximadamente 95% da nicotina contida no fumo é absorvida desde a mucosa da boca até os alvéolos, ocorrendo maior absorção na cavidade oral. A mesma age como irritante para as vias aéreas, tanto se inalada quanto se administrada por outras vias, desencadeando o mecanismo da tosse e broncoconstrição, servindo os nervos vagos presumivelmente como via aferente. O efeito broncoconstrictor da nicotina aumenta a resistência bronquial à ventilação pulmonar, influi diminuindo o consumo de

O<sub>2</sub> e a atividade da enzima adenosina-trifosfatase dos macrófagos alveolares, prejudicando a função fagocitária destes, o que predispõe o indivíduo a infecções <sup>(7)</sup>.

Em trabalho realizado por Rowell et al. <sup>(8)</sup>, ratas expostas ao fumo do tabaco apresentaram alterações de todo o trato respiratório, tais como perdas e mudanças importantes na estrutura ciliar (assimetria e alongamento), infiltrado inflamatório nasal, traqueal e pulmonar, aumento na quantidade de células caliciformes e abundante produção de muco.

Segundo o Departamento de Saúde de Serviços Humanos dos Estados Unidos (1988), cada cigarro contém 7-9 mg de nicotina, dos quais se estima que pouco mais de 1 mg seja absorvido pelos pulmões, atingindo o cérebro em dez segundos e distribuída para todos os sistemas. A eliminação é feita em aproximadamente duas horas e sua metabolização ocorre principalmente no fígado. Apenas 5% da nicotina são excretados em sua forma original pelos rins <sup>(9)</sup>.

Dados do INCA <sup>(10)</sup> mostram que no alcatrão encontram-se elementos carcinogênicos como: hidrocarbonetos, fenóis, benzopirenos, metais pesados, polônio 210, nitrosaminas, DDT, entre outros. Muitos dos compostos carcinogênicos identificados na fumaça do cigarro não estão presentes na folha do tabaco, mas são formados pela pirólise induzida por meio das altas temperaturas encontradas na ponta do cigarro aceso <sup>(9)</sup>.

A complexa mistura dos vários componentes do cigarro parece agir como carcinógenos, co-carcinógenos ou promotores de tumor. Já é documentado que o seu consumo está diretamente associado ao aumento do risco de câncer de pulmão,

laringe, cavidade oral, esôfago, orofaringe, pâncreas, rins, bexiga urinária e estômago, bem como doenças crônicas, como cardiopatias e doenças pulmonares. Até mesmo a exposição passiva à fumaça é capaz de aumentar o risco de câncer de pulmão e cardiopatias <sup>(11)</sup>.

Alguns trabalhos demonstraram que os componentes do cigarro podem lesar o DNA <sup>(4)</sup>. A mutação do gene p53 no câncer de pulmão pode ser atribuída mais intensamente à ação dos carcinógenos presentes no cigarro do que à existência de mutações endógenas prévias <sup>(4, 12)</sup>. O uso do cigarro também tem efeito promotor de tumorigênese no trato respiratório alto de hamsters iniciados com dietilnitrozaminas (DEN) <sup>(11)</sup>.

Sabe-se que o fumo é mais profundamente inalado e retido por mais tempo na periferia do pulmão, onde as células permanecem expostas principalmente a nitrosaminas específicas do tabaco, além de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos <sup>(13)</sup>. Estes dois grupos são importantes carcinógenos no desenvolvimento do câncer de pulmão presentes no fumo <sup>(11, 14, 13)</sup>.

### **1.3 Beta-caroteno e alfa-tocoferol**

Segundo Olson <sup>(15)</sup> e Hathcock <sup>(16)</sup>, as vitaminas são compostos orgânicos que variam amplamente quanto à estrutura química e atividade biológica, podendo funcionar tanto como co-fatores de enzimas em diferentes reações bioquímicas, quanto como antioxidantes/oxidantes, modulando o balanço oxidativo, e até mesmo como hormônios, regulando a expressão gênica. Sendo assim, discute-se atualmente a eficácia da ingestão de quantidades elevadas de vitaminas para atender demandas além

das suas funções nutricionais, no sentido de prevenção de doenças crônicas tais como as doenças cardiovasculares e o câncer <sup>(17)</sup>.

As vitaminas mais investigadas como substâncias quimiopreventivas são as vitaminas A incluindo os carotenóides e as vitaminas C e E. Sabe-se que, por um lado, as vitaminas C e E e os carotenóides funcionam como antioxidantes em sistemas biológicos <sup>(18, 19)</sup>, e por outro, o processo carcinogênico é caracterizado por um estado oxidativo crônico, especialmente na etapa de promoção <sup>(20)</sup>. Além disso, a fase de iniciação está associada com dano irreversível no material genético da célula, muitas vezes devido ao ataque de radicais livres <sup>(21)</sup>. Desse modo, os nutrientes antioxidantes poderiam reduzir o risco de câncer inibindo danos oxidativos no DNA <sup>(20, 22, 23)</sup>, sendo portanto considerados como agentes potencialmente quimiopreventivos <sup>(24)</sup>.

A vitamina A (retinol) pertence à família de substâncias denominadas retinóides, na qual se inclui o retinol e seus metabólitos naturais (retinal e ácido retinóico), bem como um grande número de análogos sintéticos <sup>(25)</sup>. A atividade quimiopreventiva dos retinóides observada tanto em modelos experimentais de carcinogênese quanto em alguns tipos de cânceres em humanos, tem sido atribuída à ação do ácido retinóico sobre a expressão de genes envolvidos com a diferenciação e proliferação celulares <sup>(26)</sup>. Os carotenóides, por sua vez, constituem uma família de mais de 600 membros já identificados na natureza, sendo que cerca de 50 apresentam atividade pró-vitáminica A, ou seja, podem funcionar como precursores de vitamina A em mamíferos <sup>(27)</sup>. Destes, o beta-caroteno é o mais abundante na natureza e é encontrado em vegetais e frutas de cor verde-escuro e amarelo-alaranjado <sup>(18, 28, 29)</sup>.



O efeito protetor dos carotenóides, em especial do beta-caroteno, demonstrado em diferentes modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, tem sido atribuído mais à uma ação do próprio pigmento do que dos retinóides produzidos a partir do seu metabolismo endógeno <sup>(18, 30, 31)</sup>.

A vitamina E é uma substância lipossolúvel e existente na natureza como tocoferóis e tocotrienóis, em quatro formas diferentes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ), sendo o alfa-tocoferol a forma antioxidante mais ativa e amplamente distribuída nos tecidos e no plasma <sup>(32)</sup>. A vitamina E constitui o antioxidante lipossolúvel mais efetivo encontrado na natureza, e importante fator de proteção contra a peroxidação lipídica nas membranas celulares e na circulação sanguínea <sup>(18, 19)</sup>. Os óleos vegetais e as margarinas, além de amêndoas, amendoim e gérmen de trigo, constituem alimentos ricos em vitamina E <sup>(17)</sup>.

Devido às propriedades químicas das vitaminas C e E e dos carotenóides, substâncias altamente reativas e facilmente oxidadas, podem agir como parte do sistema de defesa antioxidante do organismo humano, quando presentes em quantidades fisiológicas e sob determinadas condições intracelulares, como por exemplo, a pressões parciais fisiológicas de oxigênio <sup>(18, 33)</sup>. Ao contrário, em altas concentrações e à pressões parciais de oxigênio elevadas podem funcionar como agentes oxidantes, contribuindo para a formação de radicais livres <sup>(34, 35, 36)</sup>. Assim, o termo "antioxidante" deve ser utilizado com cautela, sendo proposto por Olson <sup>(37)</sup> o termo "moduladores fisiológicos", por ser mais abrangente e incluir os efeitos adversos eventualmente resultantes do uso abusivo dessas substâncias <sup>(17)</sup>.

#### 1.4 Fatores de proteção ao câncer

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que pessoas que ingerem maior quantidade de frutas e vegetais, alimentos que contêm carotenóides, e aquelas que têm alto índice plasmático de beta-caroteno, têm risco menor de desenvolver câncer de pulmão, tanto em homens quanto em mulheres, fumantes ou não <sup>(4)</sup>. Foi demonstrado experimentalmente que o beta-caroteno pode bloquear a carcinogênese e inibir o crescimento de células tumorais específicas. Os mecanismos propostos para tais ações em relação ao câncer de pulmão variam desde um papel antioxidante, fortalecimento de junções comunicantes do tipo GAP, aumento da capacidade imunológica, ser precursor do ácido retinóico e até um indutor de enzimas de detoxificação de carcinógenos <sup>(20)</sup>.

Na década de oitenta foram iniciados estudos de suplementação farmacológica com micronutrientes, coordenados pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos EUA, e baseados em achados promissores de estudos epidemiológicos e de investigações em modelos animais <sup>(24, 38)</sup>.

Segundo Silva & Naves <sup>(17)</sup> atualmente, quatro estudos epidemiológicos de intervenção já foram concluídos, e um estudo está em andamento. Dentre os estudos disponíveis, um apresentou resultado positivo, e outro, resultado nulo, sendo que nos dois restantes, constatou-se resultados negativos.

No estudo realizado em Linxian (China) <sup>(39)</sup>, a suplementação conjunta de vitamina E, alfa-caroteno e selênio foi benéfica para indivíduos de populações com baixo consumo de micronutrientes e com concentrações plasmáticas reduzidas de

carotenóides. Assim, observou-se uma redução de 21% na mortalidade por câncer de estômago e de 9% na mortalidade total da população geral.

No estudo *Physicians' Health Study* (PHS)<sup>(40)</sup>, com 22071 médicos que foram acompanhados por 12 anos, não houve diferença significativa entre o grupo que recebeu suplementação de beta-caroteno (50 mg em dias alternados) e o grupo placebo, em relação à incidência de câncer ou mortalidade por todas as causas.

No entanto, nos dois estudos de intervenção, o “Alpha-tocopherol, Beta-carotene Cancer Prevention Study” (ATBC) e o “Beta-carotene and Retinol Efficacy Trial” (CARET), que usaram altas doses de beta-caroteno em humanos fumantes, demonstraram aumento no risco de câncer de pulmão<sup>(41, 42)</sup>. O ATBC obteve um aumento de 16% da incidência de câncer entre os participantes que receberam doses suplementares de beta-caroteno por aproximadamente seis anos. Já o CARET foi interrompido 21 meses antes do planejado devido a evidências de não-benefícios da suplementação e talvez até mesmo danos aos participantes.<sup>(42, 43)</sup>

De uma forma geral, estes achados inesperados levaram a comunidade científica a reconsiderar a relação entre antioxidantes e câncer, à luz da influência de fatores tais como dose suplementada, fator de risco, idade dos indivíduos, etc<sup>(17)</sup>.

Neste contexto foi proposto o estudo Suplementação com Vitaminas e Minerais Antioxidantes (SUVIMAX) iniciado em 1994, na França<sup>(45)</sup>. Trata-se de um estudo epidemiológico prospectivo, de intervenção, que tem como objetivo avaliar os efeitos do consumo concomitante de vitaminas e minerais antioxidantes, suplementados em doses mais fisiológicas (próximas às recomendações nutricionais) sobre a

mortalidade por câncer, por um período de 8 anos. A população do referido estudo constitui-se de indivíduos não submetidos a fatores de risco e mais jovens que aquela dos estudos mencionados anteriormente. O grande envolvimento dos participantes, bem como alguns resultados preliminares indicam que esse estudo pode contribuir efetivamente para um maior entendimento sobre a relação entre nutrientes antioxidantes e o câncer <sup>(46)</sup>.

Burton e Ingold <sup>(33)</sup> afirmaram que em tecidos submetidos à alta pressão parcial de oxigênio como o pulmão, o beta-caroteno é imediatamente auto-oxidado ou age como pró-oxidante. Sugere-se, deste modo, que no pulmão de fumantes, os oxidantes originados da fumaça, como radicais peróxidos e óxidos de nitrogênio, poderiam desencadear essa auto-oxidação, sendo esta uma possível explicação para o aumento da incidência de câncer nos trabalhos anteriormente citados <sup>(43, 44)</sup>.

Os resultados do estudo de Wang <sup>(4)</sup> sugerem que o pulmão de fumantes, um meio rico em radicais livres, pode alterar o metabolismo de beta-caroteno, aumentando sua instabilidade ou sua oxidação. Todavia, os mecanismos envolvidos não são conhecidos, existindo a hipótese de que a exposição ao cigarro diminui o nível de antioxidantes como o alfa-tocoferol no pulmão. Este mesmo autor demonstrou que a oxidação do beta-caroteno por fumo diminuiu de 42% a 70% quando o alfa-tocoferol foi usado concomitantemente com o beta-caroteno no experimento <sup>(4)</sup>.

No trabalho de Duthie e colaboradores <sup>(47)</sup>, a suplementação da dieta de fumantes e não-fumantes com uma mistura de vitamina C, beta-caroteno e vitamina E resultou em uma redução estatisticamente significativa de danos por oxidação endógena de DNA de linfócitos. Contrariamente a esses estudos, nos estudos CARET e ATBC,

não foram observados efeitos favoráveis do alfa-tocoferol à redução de incidência de câncer de pulmão ou na taxa de mortalidade devida a essa doença, assim como também não obtiveram resultados estatisticamente significantes de uma interação entre o alfa-tocoferol e o beta-caroteno com relação à diminuição da incidência de câncer de pulmão, contrariando os resultados do estudo de Duthie <sup>(47)</sup>.

### 1.5 Uretana

Carbamato de etila ( $E_tOCONH_2$ ) ou uretana é um composto potencialmente carcinogênico e forma-se naturalmente em alimentos como pão, iogurte, vinho, cerveja, saquê e, principalmente, em bebidas fermento-destiladas tais como uísque, rum, vodca, grapa, cachaça e tiquira (aguardente de mandioca). Existem várias vias possíveis para sua formação nas bebidas destiladas, geralmente envolvendo a reação entre o etanol e precursores nitrogenados, tais como a uréia, fosfato de carbamila e cianeto. Os teores máximos de carbamato de etila para bebidas alcoólicas foram estabelecidos no Canadá em 1985, pelo "Departamento da Saúde e do Bem Estar", e são seguidos até hoje <sup>(48)</sup>.

É um composto genotóxico com ação *in vitro* e *in vivo*. Apresenta uma ligação covalente ao DNA da célula e é considerado um carcinógeno animal <sup>(49)</sup>, capaz de induzir a carcinogênese pelo aumento da produção de espécimes de radicais livres e pela depuração do DNA por seus metabólitos <sup>(50)</sup>. Ao mesmo tempo, substâncias com derivados de etil carbamato, como a uretana, podem inibir ou reduzir a atividade de enzimas reparadoras de danos ao DNA <sup>(51)</sup><sub>51</sub>.

## 1.6 Modelo experimental

Devido à grande quantidade de variáveis de confusão quando se estuda epidemiologicamente os efeitos do cigarro e de outros carcinógenos no ser humano, existem muitos modelos experimentais para tentar diminuir essas variáveis. A uretana, um éster etílico do ácido carbâmico, é um carcinógeno amplamente utilizado em estudos de carcinogênese química experimental <sup>(52, 53, 54, 55)</sup>, desenvolvendo, por exemplo adenocarcinomas em pulmão de camundongos. Esses trabalhos utilizaram a uretana administrando-a, tanto na forma oral como por injeções, em doses geralmente não superiores a 1mg/kg.

Em trabalho realizado por Reymão e colaboradores<sup>(56)</sup>, a dose de 3mg/kg, via intraperitoneal, dividida em duas aplicações com um intervalo de administração de 48 horas, em camundongos de 7 a 13 semanas de vida, mostraram-se ideais para a produção de tumor em curto espaço de tempo, sem induzir, pela toxicidade, uma mortalidade significativa nos animais. Após um mês da injeção de uretana, os autores relatam ter observado hiperplasia das células de revestimento alveolar, e com dois meses, a presença de adenomas visíveis macroscopicamente como nódulos amarelados e, com seis meses, a presença de carcinomas. Os nódulos são de pneumócitos do Tipo II <sup>(57)</sup>.

Foram analisados os efeitos da poluição atmosférica em relação ao câncer de pulmão, em modelo experimental com camundongos. Esse modelo mostrou-se muito útil na medida em que rapidamente o animal desenvolve o câncer, tornando mais fácil a análise das variáveis em estudo, e eliminando os outros fatores de confusão encontrados nos trabalhos epidemiológicos<sup>(56, 57)</sup>.

Além da contagem do número de nódulos tumorais macroscópicos para a comparação entre o grupo controle e o grupo exposto à poluição<sup>(56)</sup>, também foi possível estudar microscopicamente as lesões pulmonares. Uma das alterações mais precocemente observadas nesse modelo foram às alterações morfológicas detectadas histologicamente tanto qualitativa quanto quantitativamente, com apenas dois meses de experimento, como a alteração na relação tumor/estroma. Isso mostra a sensibilidade e a praticidade do modelo, permitindo ainda a análise de muitas variáveis.

### **1.7 Objetivos**

O presente trabalho tem os seguintes objetivos:

- 1- Avaliar os efeitos de exposição ao cigarro em modelo experimental.
- 2- Avaliar a participação do beta-caroteno e do alfa-tocoferol no desenvolvimento de câncer de pulmão e sua relação com a exposição ao cigarro, em modelo experimental.
- 3- Avaliar as possíveis diferenças histológicas e morfométricas das neoplasias desenvolvidas e a sua relação com o uso do beta-caroteno e do alfa-tocoferol.

---

## **2 MATERIAL E MÉTODO**

### **2.1 Animais utilizados**

Foram utilizados camundongos machos Balb C adultos jovens (7 a 13 semanas de vida) provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal desta mesma instituição.

### **2.2 Exposição ao fumo e medida do monóxido de carbono**

A exposição ao fumo foi realizada mediante a utilização de um compressor com fluxo contínuo em um frasco contendo três cigarros ligado a uma câmara medindo 49cm de comprimento, 38cm de largura e 40cm de altura, onde ficavam os animais expostos à fumaça por dez minutos, duas vezes ao dia, cinco dias por semana.

A medida do monóxido de carbono dentro da câmara de exposição à fumaça dos cigarros foi realizada nos três minutos finais da exposição, utilizando-se um medidor denominado “*BEDFONT EC50 – SMOKELYZERS*”, gerando valores em ppm (parte por milhão).





**FIGURA 1: CÂMARA DE EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DO CIGARRO**

Compressor com fluxo contínuo (A), frasco contendo três cigarros (B) e câmara de exposição dos animais à fumaça dos cigarros (C).

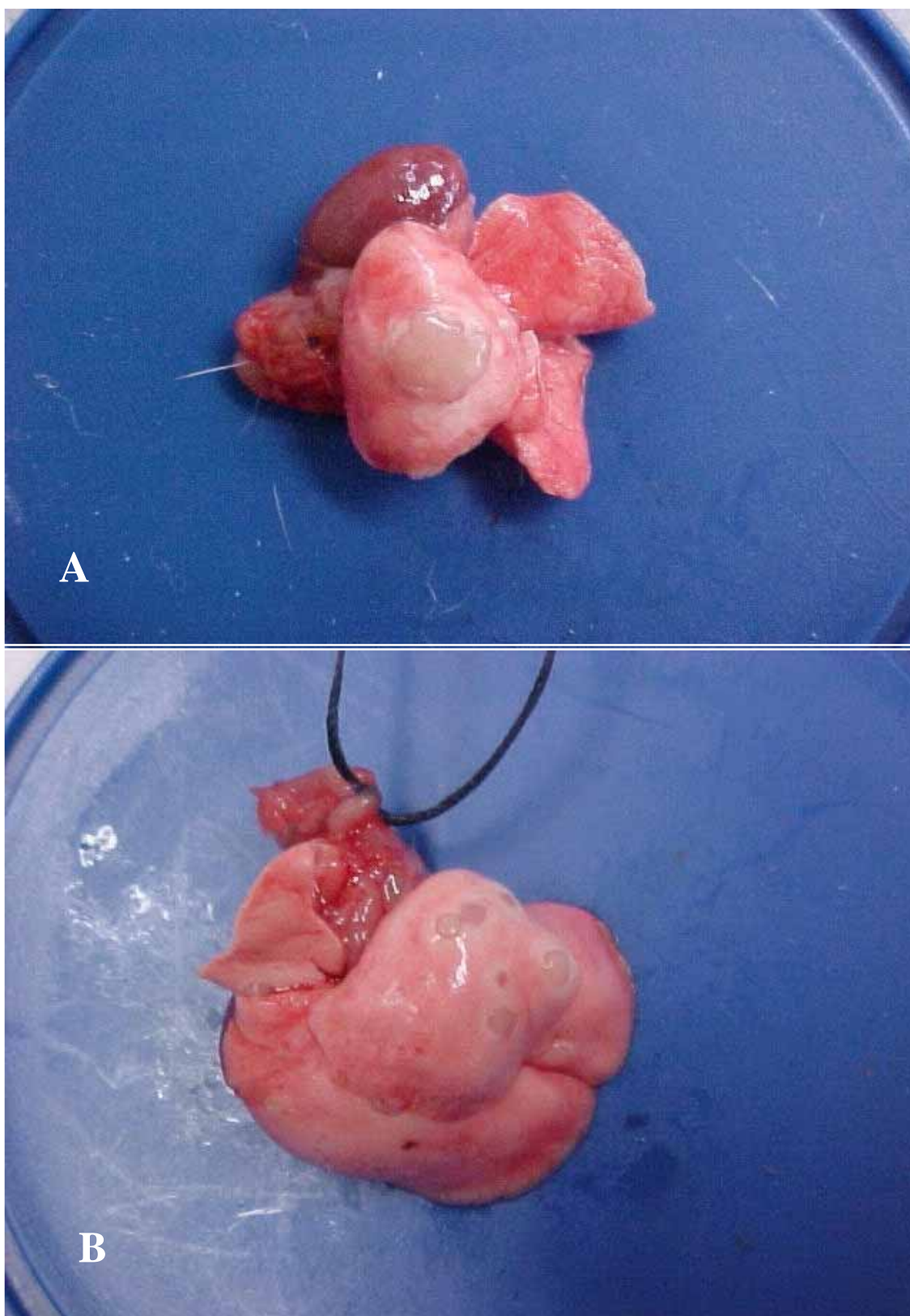
### 2.3 Indução dos tumores e coleta do material

Nos animais dos grupos em que buscou-se a indução de tumores, foram injetados 3mg/kg de uretana, a partir de uma solução mestra de 10g diluída em 100ml de NaCl a 0,9% por via intraperitoneal, fracionada em duas doses de 1,5mg/kg, com um intervalo de 48 horas entre as doses. O sacrifício foi feito por secção da aorta abdominal, após anestesia por inalação de éter. Os pulmões foram retirados com a traquéia e fixados por instilação intratraqueal de solução de 10% de formalina tamponada em volume suficiente para completa expansão pulmonar (aproximadamente 2ml) e mantidos imersos na mesma solução por um período de 24 a 48 horas.

Os pulmões foram então seccionados com navalhas, em cortes de aproximadamente 3mm de espessura e, juntamente com os linfonodos mediastinais, submetidos a exame histológico de rotina, corados com hematoxilina e eosina.

Em todos os camundongos foi realizado o exame macroscópico dos órgãos internos das cavidades abdominal e torácica à procura de alterações ou metástases, e análise microscópica de rins, baço, timo e fígado.

Os animais que morreram no meio do experimento não foram repostos. Em todos foi realizado o exame necroscópico para avaliar a causa *mortis*. Não foi achado nenhuma alteração macro ou microscópica significativa.

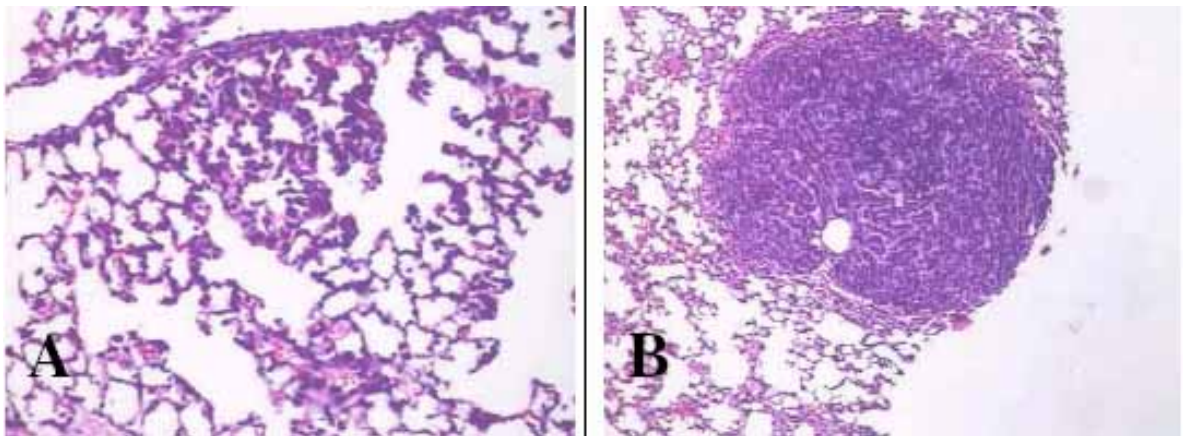


**FIGURA 2: VISTA MACROSCÓPICA DOS NÓDULOS PULMONARES**

Nódulos visíveis macroscopicamente em pulmões de camundongos submetidos à uretana. (A)- Grupo 3 – só uretana e (B)- Grupo 2- uretana + cigarro.

## 2.4 Análise histológica

Na microscopia, foi feita análise quantitativa de hiperplasias e nódulos pulmonares (figura 3). Adotou-se o seguinte critério para a distinção entre nódulo e hiperplasia: considerava-se nódulo se o grupo de células com alterações sugestivas de neoplasia fosse maior ou igual à área de cinco espaços alveolares; se menor que isso, era considerado hiperplasia<sup>(57)</sup>.



**FIGURA 3: VISTA MICROSCÓPICA – NÓDULO E HIPERPLASIA**  
(A) Hiperplasia pulmonar e (B) Nódulo pulmonar. 100X, Hematoxilina e Eosina.

Nos primeiros grupos foram realizados cortes seriados em três níveis visando contemplar a representação total do parênquima pulmonar, o que não foi mantido nos grupos seguintes devido não apresentar diferenças nos resultados.

## 2.5 Análise morfométrica

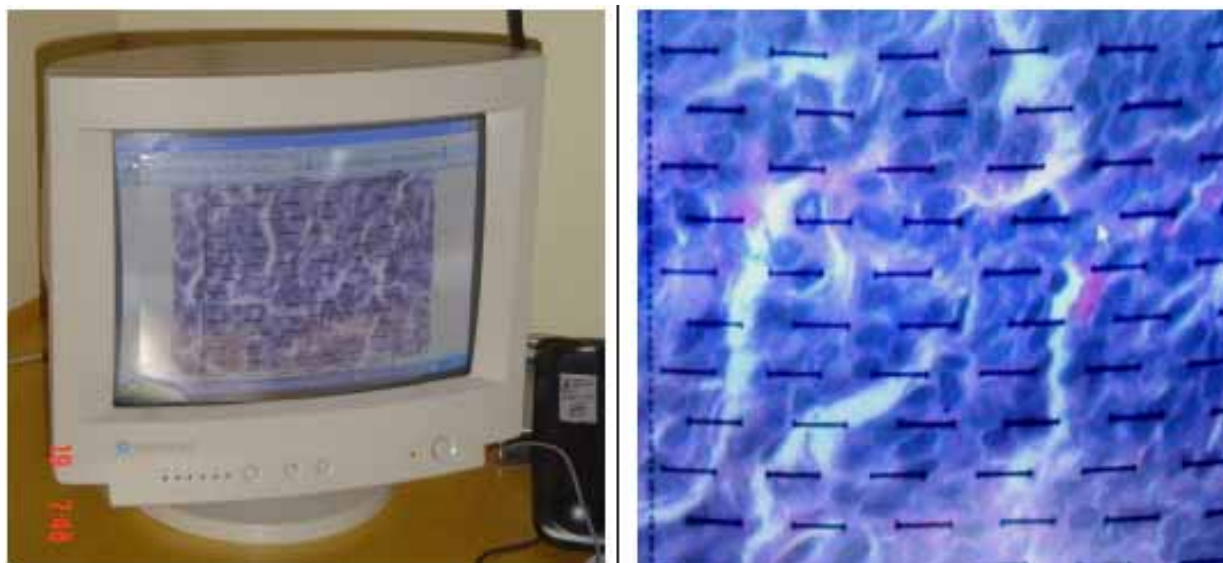
A análise morfométrica constitui um método objetivo de avaliação da morfologia de uma lesão. As imagens foram digitalizadas no sistema analisador de

imagens *Image-Pro<sup>®</sup>Plus version 4.5 for Windows<sup>®</sup> software* acoplado a um microscópio *Olympus modelo BX60* de pesquisa, para a mensuração das áreas e captura das imagens. Com a ajuda de um retículo coerente de 168 pontos e 84 linhas impressa em transparência, colocado em frente à imagem da lâmina no monitor do computador (figura 5), realizou-se a técnica de contagem de pontos <sup>(58)</sup>.



**FIGURA 4: ANALISADOR DE IMAGEM DIGITAL**

Analizador de imagens *Image-Pro<sup>®</sup>Plus version 4.5 for Windows<sup>®</sup> software* acoplado a um microscópio *Olympus modelo BX60* de pesquisa

**FIGURA 5: CONTAGEM DE PONTOS**

Retículo coerente de 168 pontos e 84 linhas impressa em transparência, colocado em frente à imagem da lâmina no monitor do computador para a contagem de pontos.

**Área dos nódulos**

Em cada grupo, foram verificadas a medida da área dos nódulos em cinco animais escolhidos aleatoriamente. A medida foi realizada demarcando-se o perímetro dos nódulos e calibrando o equipamento de acordo com o aumento utilizado no microscópio. Foi utilizado o aumento de 100x na maioria dos nódulos, e o de 40x nas situações em que os mesmos eram maiores que o alcance da tela. Os resultados das áreas dos nódulos foi submetida à análise estatística, sendo divididos em: 1- maior área, 2- menor área, 3- soma das áreas e 4- média das áreas e submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney.

### **Contagem dos pontos**

Para o estudo, foram selecionados aleatoriamente no mínimo um e no máximo cinco nódulos de pelo menos três camundongos por grupo, sendo que em cada nódulo, foram feitos em média a contagem de cinco campos diferentes no aumento de 400 vezes. Sempre que o item analisado (núcleo, citoplasma ou estroma) encontrava-se na intersecção de duas retas do retículo, marcava-se um ponto (P). Foram analisadas a fração nuclear ( $F_{nuc} = \text{n}^\circ \text{ de pontos no núcleo} / \text{n}^\circ \text{ de pontos no núcleo} + \text{n}^\circ \text{ de pontos no citoplasma}$ ), fração citoplasmática ( $F_{cit} = \text{n}^\circ \text{ de pontos no citoplasma} / \text{n}^\circ \text{ de pontos no núcleo} + \text{n}^\circ \text{ de pontos no citoplasma}$ ), fração estromal ( $F_{est} = \text{n}^\circ \text{ de pontos no estroma} / \text{n}^\circ \text{ de pontos no núcleo} + \text{n}^\circ \text{ de pontos no citoplasma}$ ) e relação núcleo- citoplasma ( $N/C = \text{n}^\circ \text{ de pontos no núcleo} / \text{n}^\circ \text{ de pontos no citoplasma}$ ), e submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney.

### **2.6 Controle de ração e peso**

Os animais foram mantidos com ração e água *ad libitum*. A ração com suplementação de beta-caroteno e de alfa-tocoferol foi preparada em laboratório da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, realizando-se a pesagem, a mistura e a modelagem das mesmas (figura 6), sendo então mantidas em estufa e então armazenadas em local privado de luz para evitar a oxidação. A concentração era específica para cada grupo, e quando colocadas nas gaiolas, utilizou-se um suporte de modo a que não a expusesse à luz. O preparo era realizado semanalmente, a fim de preservar as propriedades da ração.



**FIGURA 6: PREPARO DA RAÇÃO EM LABORATÓRIO**

Preparo de ração com suplementação de beta-caroteno.

## 2.7 Grupos experimentais

O experimento foi dividido em 3 partes:

### **PARTE 1:**

Na primeira parte buscou-se avaliar os efeitos do tabagismo na evolução de tumores induzidos por uretana. Para tal, os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos:



**GRUPO 1 (G1)- CONTROLE SÓ CIGARRO**

Foram utilizados 23 camundongos. Os mesmos foram submetidos à exposição contínua durante 10 minutos à fumaça de 3 cigarros, 2 vezes ao dia, 5 vezes por semana, por 16 semanas, com ração e água *ad libitum*..

**GRUPO 2 (G2)- URETANA + CIGARRO**

Foram utilizados 20 camundongos, todos eles tratados com uretana e posteriormente expostos à fumaça dos cigarros por 16 semanas.

**GRUPO 3 (G3)- SÓ URETANA**

Foram utilizados 19 camundongos tratados apenas com uretana e mantidos em observação por 16 semanas.

Devido aos resultados inesperados, além desses 3 grupos, foi realizado um estudo tipo dose resposta:

**ESTUDO DOSE RESPOSTA 1:**

Foram utilizados três grupos denominados GDR-0, GDR-30 e GDR-60:

**GDR 0 – SÓ URETANA (60 dias)**

Foram utilizados 17 camundongos, todos eles tratados com uretana e mantidos em observação por 8 semanas.

**GDR 60 - URETANA + CIGARRO (60 dias)**

Foram utilizados 17 camundongos tratados com uretana e posteriormente expostos à fumaça dos cigarros por 8 semanas.

**GDR 30 – URETANA + CIGARRO (30 dias)**

Foram utilizados 15 camundongos tratados com uretana, expostos à fumaça dos cigarros por 4 semanas e mantidos em observação por mais 4 semanas, sendo então sacrificados dois meses após a injeção de uretana .

**ESTUDO DOSE RESPOSTA 2:**

Neste estudo buscou-se aumentar o tempo de exposição ao cigarro, sendo utilizados os resultados dos grupos **G2** (uretana + cigarro por 4 meses), **G3** (só uretana por 4 meses) e criado mais um grupo de animais denominado “**GDR2,5**”, perfazendo um experimento de dose-resposta com intervalo maior.

**GDR 2,5**

Foram utilizados 9 camundongos tratados com uretana, expostos à fumaça dos cigarros por 8 semanas e mantidos em observação por mais 8 semanas, sendo então sacrificados quatro meses após a injeção de uretana .

**PARTE 2:**

Com o objetivo de avaliar a participação do beta-caroteno no desenvolvimento do câncer de pulmão induzido por uretana e sua relação com a exposição ao cigarro, nesta parte do trabalho os animais foram divididos aleatoriamente da seguinte forma:

**GRUPO 4 (G4)- BETA CAROTENO 0,25% + URETANA + CIGARRO**

Foram utilizados 15 camundongos tratados com uretana, expostos à fumaça dos cigarros por 16 semanas e mantidos com ração preparada (0,25% de beta-caroteno) e controle de consumo.

**GRUPO 5 (G5)- BETA CAROTENO 0,05% + URETANA + CIGARRO**

Foram utilizados 8 camundongos tratados com uretana, expostos à fumaça dos cigarros por 16 semanas e mantidos com ração preparada (0,05% de beta-caroteno) e controle de consumo.

**GRUPO 6 (G6)- BETA CAROTENO 0,005% + URETANA + CIGARRO**

Foram utilizados 8 camundongos tratados com uretana, expostos à fumaça dos cigarros por 16 semanas e mantidos com ração preparada (0,005% de beta-caroteno) e controle de consumo.

**GRUPO 8 (G8)- BETA CAROTENO 0,25% + URETANA**

Foram utilizados 9 camundongos tratados com uretana, ração preparada com 0,25% de beta-caroteno com controle de consumo e mantidos em observação por 16 semanas, sendo então sacrificados e realizados os procedimentos de rotina.

**PARTE 3:**

Nesta parte do trabalho buscou-se avaliar a participação do alfa-tocoferol associado ao beta-caroteno no desenvolvimento do câncer de pulmão induzido por uretana e sua relação com a exposição ao cigarro. Para tal, foi padronizada a

concentração de 0,25% de beta-caroteno devido os resultados apresentarem um maior número de nódulos comparado às outras doses (0,05% e 0,005%). Os animais foram divididos aleatoriamente da seguinte forma:

**GRUPO 7 (G7)- ALFA TOCOFEROL 0,25% + BETA CAROTENO 0,25% +  
URETANA + CIGARRO**

Foram utilizados 9 camundongos tratados com uretana, expostos à fumaça dos cigarros por 16 semanas e mantidos com ração preparada (0,25% de alfa-tocoferol e 0,25% de beta-caroteno) com controle de consumo.

**GRUPO 10 (G10)- ALFA TOCOFEROL 0,05% + BETA CAROTENO 0,25% +  
URETANA + CIGARRO**

Foram utilizados 12 camundongos tratados com uretana, expostos à fumaça dos cigarros por 16 semanas e mantidos com ração preparada (0,05% de alfa-tocoferol e 0,25% de beta-caroteno) com controle de consumo.

---

## **GRUPO 11 (G11)- ALFA TOCOFEROL 0,005% + BETA CAROTENO 0,25% + URETANA + CIGARRO**

Foram utilizados 9 camundongos tratados com uretana, expostos à fumaça dos cigarros por 16 semanas e mantidos com ração preparada (0,005% de alfa-tocoferol e 0,25% de beta-caroteno) com controle de consumo.

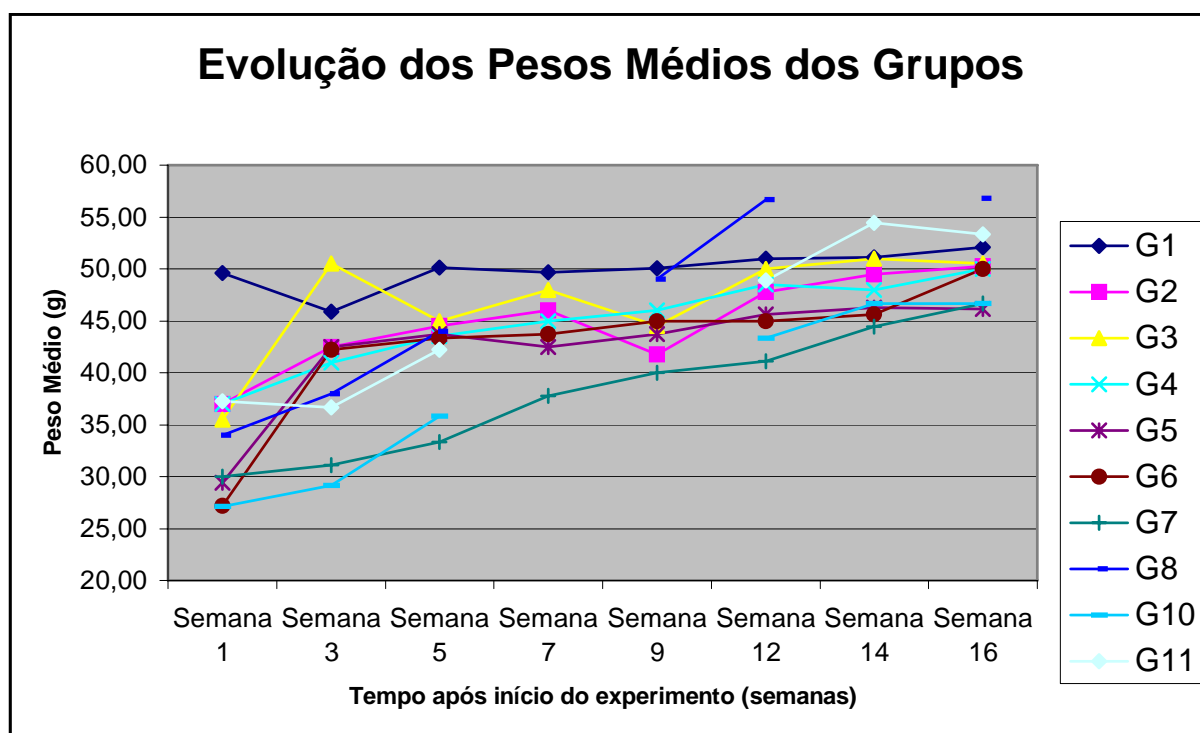
### **2.8 Análise estatística**

A análise foi feita com emprego dos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis com procedimento de comparação múltipla, e o teste de Mann Withney para a análise morfométrica. Os resultados estão apresentados com a mediana, amplitude interquartílica ( $aiq = 3^{\circ} \text{quartil} - 1^{\circ} \text{quartil}$ ), média e desvio padrão.

### 3 RESULTADOS

Em todos os grupos avaliados, foram colhidos o peso semanal de cada grupo e o peso de cada camundongo antes do sacrifício.

A média de peso mensal e o número de animais dos grupos experimentais encontram-se no Anexo I, e a evolução do peso semanalmente está representada na figura 7.



GRUPO 1 (G1)- controle só cigarro

GRUPO 2 (G2)- uretana + cigarro

GRUPO 3 (G3)- só uretana

GRUPO 4 (G4)- beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 5 (G5)- beta caroteno 0,05 + uretana + cigarro

GRUPO 6 (G6)- beta caroteno 0,005% + uretana + cigarro

GRUPO 8 (G8)- beta caroteno 0,25% + uretana

GRUPO 7 (G7)- alfa tocoferol 0,25% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

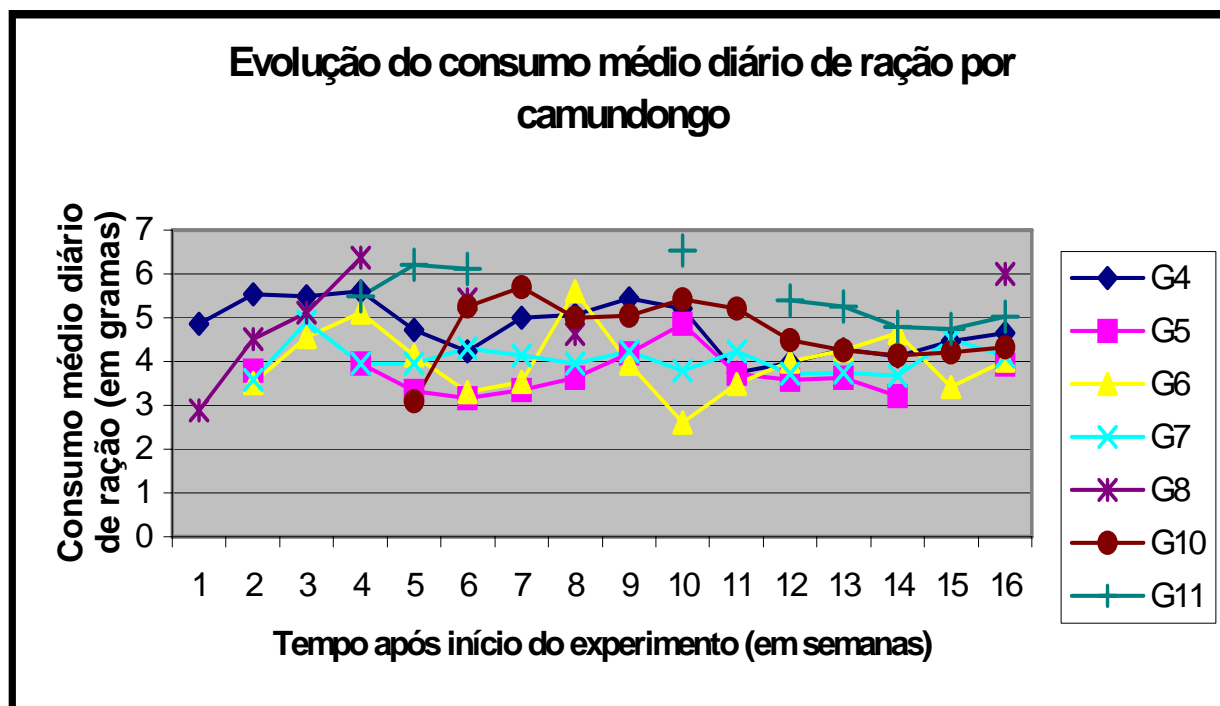
GRUPO 10 (G10)- alfa tocoferol 0,05% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 11 (G11)- alfa tocoferol 0,005% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

#### FIGURA 7: EVOLUÇÃO DO PESO

Evolução semanal do peso médio dos camundongos dos grupos experimentais. Valores em gramas (g).

A quantidade média de ração com suplemento de beta-caroteno e alfa-tocoferol ingerida pelos animais dos grupos G4, G5, G6, G7, G8, G10 e G11 foi monitorada diariamente e os dados encontram-se no Anexo III. A figura 8 mostra a evolução semanal deste consumo.



GRUPO 1 (G1)- controle só cigarro

GRUPO 2 (G2)- uretana + cigarro

GRUPO 3 (G3)- só uretana

GRUPO 4 (G4)- beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 5 (G5)- beta caroteno 0,05 + uretana + cigarro

GRUPO 6 (G6)- beta caroteno 0,005% + uretana + cigarro

GRUPO 8 (G8)- beta caroteno 0,25% + uretana

GRUPO 7 (G7)- alfa tocoferol 0,25% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 10 (G10)- alfa tocoferol 0,05% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 11 (G11)- alfa tocoferol 0,005% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

#### FIGURA 8: CONSUMO DE RAÇÃO

Evolução diária do consumo de ração dos camundongos. Valores em gramas (g)

A medida de CO em ppm foi semelhante nos grupos G1, G2 e G4 com concentração média de 556,00 ppm nos três últimos minutos de exposição ao fumo, optando-se então por não realizar mais essa medida nos demais grupos experimentais. Os valores de CO estão expressos no Anexo II.



No exame microscópico dos órgãos internos das cavidades abdominal e torácica, apenas um camundongo do grupo 3 (só uretana) apresentou uma metástase em linfonodo pulmonar e um camundongo do grupo 2 (cigarro + uretana) apresentou pielonefrite crônica nos rins. No restante dos animais não se observou nenhuma metástase ou outra alteração em órgãos além dos pulmões.

### **3.1 Análise histológica**

#### **3.1.1 Contagem de nódulos e hiperplasias**

No grupo G1 (só cigarro), foi achado apenas um nódulo pulmonar em apenas um camundongo e três animais com uma hiperplasia cada.

O número de hiperplasias e nódulos observados na microscopia estão apresentados no Anexo IV. Para não perder nenhuma lesão, foram realizados três níveis de cortes histológicos de cada pulmão. Entretanto, observou-se que pelo pequeno tamanho e espessura dos pulmões, o número de lesões presentes em cada nível não se modificou.

As tabelas 1 e 2 mostram respectivamente os valores referentes à quantificação de nódulos e hiperplasias dos grupos estudados. As significâncias são mostradas pelas letras, onde grupos com a mesma letra apresentam o mesmo comportamento estatístico.

**TABELA 1: NÚMERO DE NÓDULOS**

Dados obtidos da contagem microscópica do número de nódulos pulmonares nos animais dos grupos experimentais

grupo	***	média	mediana	****	aiq*	significância
	n			dp		estatística**
g1	23	0,043	0	0	0	a
g2	20	5,1	5	2,59	3,75	b
g3	19	6,89	7	2,54	2	c
g4	15	3,8	4	2,4	3	b
g5	8	1,5	1	1,31	2,75	b
g6	8	1,5	1	1,31	2,75	b
g8	9	3,22	1	3,87	6	bc
g7	9	2	2	1,5	2	b
g10	12	3,17	2,5	2,69	3	b
g11	9	4,22	4	4,02	6,5	bc

\*aiq = amplitude interquartílica (3ºquartil – 1ºquartil) - **valor-p<0,0005**

\*\*Grupos com a mesma letra apresentam o mesmo comportamento estatístico

\*\*\*Número de animais

\*\*\*\* Desvio padrão

GRUPO 1 (G1)- controle só cigarro

GRUPO 2 (G2)- uretana + cigarro

GRUPO 3 (G3)- só uretana

GRUPO 4 (G4)- beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 5 (G5)- beta caroteno 0,05 + uretana + cigarro

GRUPO 6 (G6)- beta caroteno 0,005% + uretana + cigarro

GRUPO 8 (G8)- beta caroteno 0,25% + uretana

GRUPO 7 (G7)- alfa tocoferol 0,25% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 10 (G10)- alfa tocoferol 0,05% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 11 (G11)- alfa tocoferol 0,005% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

**TABELA 2: NÚMERO DE HIPERPLASIAS**

Dados obtidos da contagem microscópica do número de hiperplasias pulmonares nos animais dos grupos experimentais

grupo	***	média	mediana	****	aiq*	significância estatística**
	n			dp		
g1	23	0,13	0	-	0	a
g2	20	0,8	1	0,77	1	b
g3	19	1,63	1	1,71	1	b
g4	15	0,33	0	0,72	0	a
g5	8	1,25	0	0,35	0	a
g6	8	0,25	0	0,46	0,75	a
g8	9	0,56	0	0,73	1	a
g7	9	0,44	0	0,73	1	a
g10	12	1	1	0,85	2	b
g11	9	0,56	0	1,01	1	b

\*aiq = amplitude interquartílica (3ºquartil – 1ºquartil) - **valor-p<0,0005**

\*\*Grupos com a mesma letra apresentam o mesmo comportamento estatístico

\*\*\*Número de animais

\*\*\*\* Desvio padrão

GRUPO 1 (G1)- controle só cigarro

GRUPO 2 (G2)- uretana + cigarro

GRUPO 3 (G3)- só uretana

GRUPO 4 (G4)- beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 5 (G5)- beta caroteno 0,05 + uretana + cigarro

GRUPO 6 (G6)- beta caroteno 0,005% + uretana + cigarro

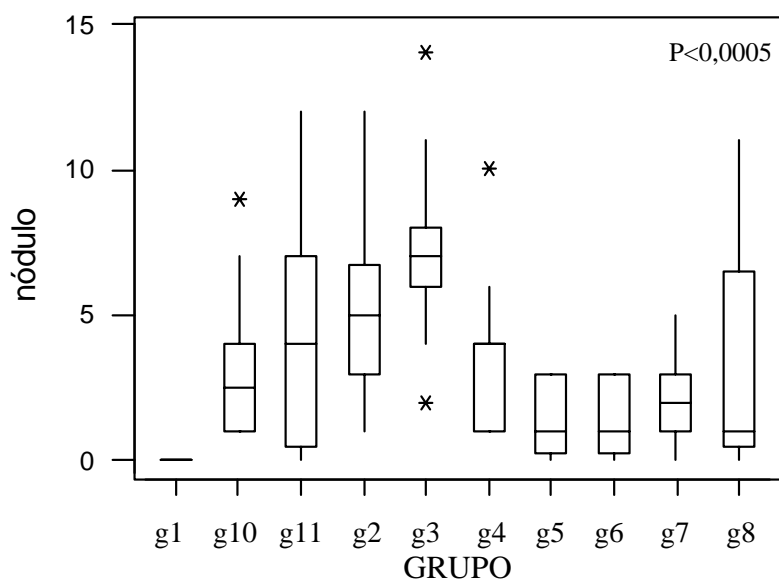
GRUPO 8 (G8)- beta caroteno 0,25% + uretana

GRUPO 7 (G7)- alfa tocoferol 0,25% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 10 (G10)- alfa tocoferol 0,05% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

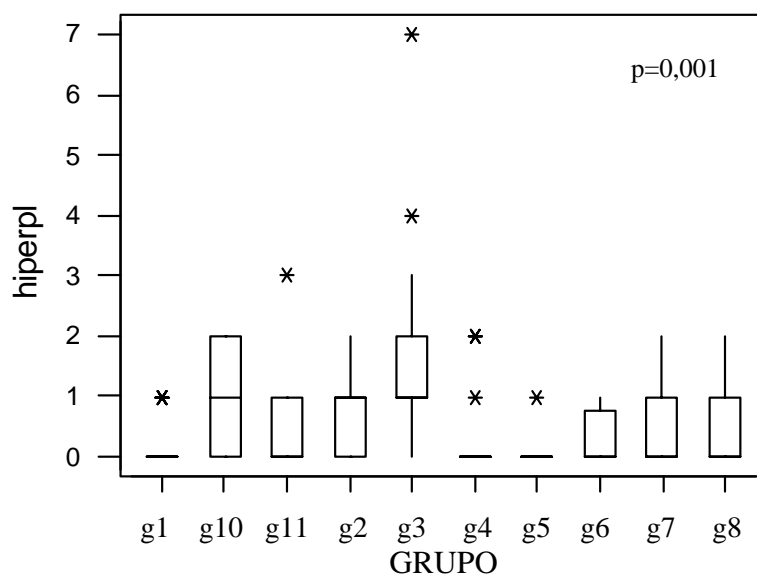
GRUPO 11 (G11)- alfa tocoferol 0,005% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

As figuras 9 e 10 ilustram os resultados da análise histológica quanto ao número de nódulos e hiperplasias de todos os grupos experimentais.



**FIGURA 9: NÚMERO DE NÓDULOS**

Representação gráfica do tipo “box-plot”. Contagem microscópica do número de nódulos por grupo.



**FIGURA 10: NÚMERO DE HIPERPLASIAS**

Representação gráfica do tipo “box-plot”. Contagem microscópica do número de hiperplasias por grupo.

A análise estatística entre os grupos mostrou que:

- No grupo 2 (uretana+cigarro) o número de nódulos foi estatisticamente menor ( $p=0,03$ ), quando comparado com o grupo 3 (só uretana). Em relação ao número de hiperplasias, também foi aplicado o teste estatístico, mas não houve diferença significativa.
- O grupo com dieta de Beta-caroteno a 0,25% mais uretana sem ser exposto à fumaça do cigarro (G8) não tem diferença significativa quanto ao número de nódulos comparado com o grupo que recebeu a mesma concentração de beta-caroteno e uretana e que foi exposto à fumaça do cigarro(G4), porém o número de hiperplasias com a presença do cigarro (G4) diminuiu ( $p=0,045$ ).
- Os grupos G5 e G6 com dietas inferiores de Beta-caroteno (concentrações de 0,05 e 0,005% respectivamente) se mostraram estatisticamente iguais, porém apresentaram diferença significativa ( $p=0,004$ ) com menor número de nódulos quando comparados ao grupo com concentração de 0,25% (G4). O número de hiperplasias não apresentou diferença significativa entre estes grupos.
- Os animais que receberam dieta com suplementação de Beta-caroteno em concentração de 0,25% associada à uretana sem a exposição do cigarro (grupo G8) apresentaram diminuição significativa do número de nódulos ( $p=0,013$ ) e hiperplasias ( $p=0,05$ ) quando comparados aos animais do grupo que recebeu o mesmo tratamento porém sem o suplemento de Beta-caroteno (grupo G3 – só uretana).
- Os animais que receberam dieta com suplementação de Beta-caroteno em concentração de 0,05% e foram expostos ao cigarro (grupo G5) apresentaram diminuição significativa do número de nódulos ( $p<0,001$ ) e hiperplasias

( $p < 0,026$ ) quando comparados aos animais do grupo que recebeu o mesmo tratamento porém sem o suplemento de Beta-caroteno (grupo G2 – uretana + cigarro), porém o grupo G4 que recebeu a dieta com suplementação de Beta-caroteno em concentração de 0,25% e foi exposto à fumaça do cigarro não mostrou-se estatisticamente diferente do grupo G2.

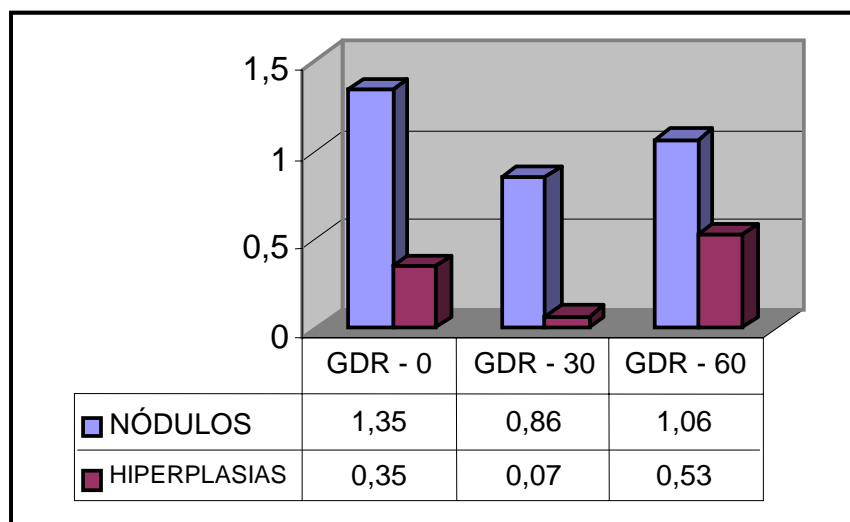
- Os animais dos grupos G5 e G6 que receberam dieta com menores concentrações de Beta-caroteno (0,05 e 0,005% respectivamente) são semelhantes quanto ao número de nódulos e ambos apresentaram uma diminuição significativa quando comparados ao grupo G2 que recebeu o mesmo tratamento porém sem a dieta suplementar de Beta-caroteno ( $p < 0,001$ ). Quanto ao número de hiperplasias, os grupos G6 (Beta-caroteno em concentração de 0,005%) e G2 (uretana + cigarro) não apresentaram diferença significativa.
- As três doses de alfa-tocoferol (0,25, 0,05 e 0,005%) não apresentaram diferenças entre si, tanto para nódulos quanto para hiperplasias (G7, G10 e G11).
- O grupo G10 (Alfa-tocoferol 0,05% + Beta-caroteno 0,25% + cigarro + uretana) apresentou-se com menor número de hiperplasias quando comparado ao grupo com o mesmo tratamento exceto quanto ao Alfa-tocoferol (G4 - Beta-caroteno 0,25% + cigarro + uretana ) ( $p = 0,014$ ); porém não apresentou diferença significativa quanto ao número de nódulos.
- O mesmo grupo G10 apresentou menor número de nódulos comparado ao grupo G2 (cigarro + uretana) e que recebeu dieta sem suplemento de Beta-caroteno e de Alfa-tocoferol; porém os dois grupos são semelhante quanto ao número de hiperplasias.

### **ESTUDO DOSE RESPOSTA 1:**

Os dados relativos aos grupos GDR0, GDR-30 e GDR60 observados na microscopia quanto ao número de hiperplasias e nódulos estão apresentados no Anexo IV.

A análise estatística não mostrou diferença significativa entre o número de nódulos ou de hiperplasias (valor  $p=0,782$  e  $0,083$ , respectivamente).

A figura 11 mostra a média do número de nódulos e hiperplasias verificados nos animais dos grupos GDR-0, GDR-30 e GDR-60.



GRUPO GDR 0 – só uretana (60 dias)

GRUPO GDR 30 – uretana + cigarro (30 dias)

GRUPO GDR 60 - uretana + cigarro (60 dias)

**FIGURA 11: NÓDULOS E HIPERPLASIAS – ESTUDO DOSE-RESPOSTA 1**

Média do número de nódulos e hiperplasias verificados nos animais dos grupos GDR-0, GDR-30 e GDR-60.

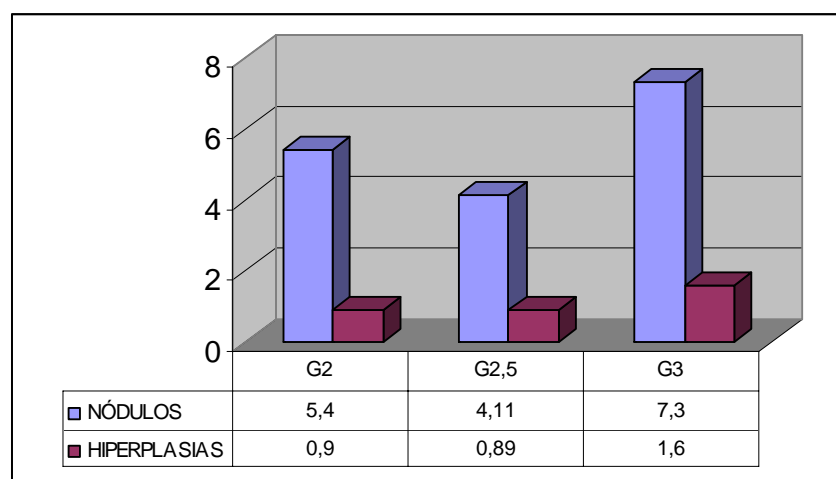
Como os camundongos ficaram sob exposição ao cigarro apenas por dois meses, optou-se por aumentar o período de estudo, pois as lesões pulmonares nesse modelo aumentam com o tempo<sup>(57)</sup>.

## **ESTUDO DOSE RESPOSTA 2:**

Os dados relativos aos grupos G2, GDR2,5 e G3 observados na microscopia quanto ao número de hiperplasias e nódulos estão apresentados no Anexo IV.

O grupo G2,5 mostrou o mesmo comportamento que o grupo 2 (uretana e cigarro), sendo estatisticamente diferente do grupo só de uretana (G3) quanto ao número de nódulos ( $p=0,016$ ), porém não há evidência de diferença significativa quanto ao tempo de exposição ao cigarro.

As figuras 12 e 13 ilustram os resultados da análise histológica quanto ao número de nódulos e hiperplasias verificados nos animais dos grupos G2, GDR2,5 e G3.



GRUPO 2 (G2)- uretana + cigarro (120 dias)

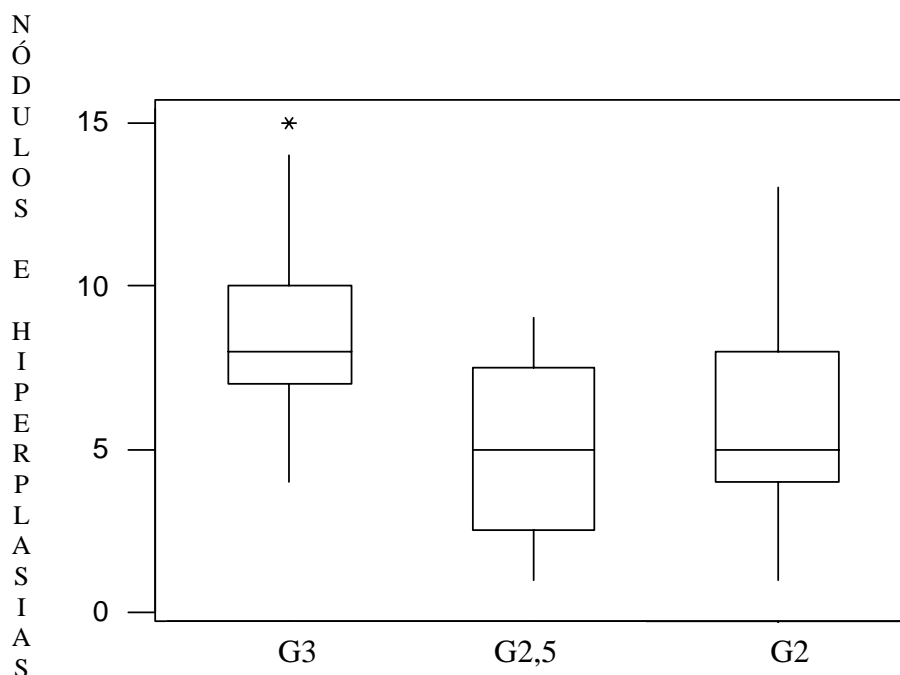
GRUPO GDR 2,5 – uretana + cigarro (60 dias) + observação (60 dias)

GRUPO 3 (G3)- só uretana (120 dias)

### **FIGURA 12: NÓDULOS E HIPERPLASIAS – ESTUDO DOSE-RESPOSTA 2**

Média do número de nódulos e hiperplasias verificados nos animais dos grupos G2, GDR-2,5 e G3. ( $p = 0,016$  para nódulos). Não há evidência de diferença significativa quanto ao tempo de exposição ao cigarro.





**FIGURA 13: NÓDULOS E HIPERPLASIAS – ESTUDO DOSE-RESPOSTA 2**

Representação gráfica do tipo “box-plot”. Contagem microscópica da soma de nódulos e hiperplasias dos grupos G2, G2,5 e G3.

A análise estatística nos dois estudos dose-resposta mostrou que:

- O estudo dose-resposta 1 (grupos GDR-0, GDR-30 e GDR-60) não mostrou diferença significativa entre o número de nódulos ou de hiperplasias (valor  $p=0,782$  e  $0,083$ , respectivamente).
- O estudo dose-resposta 2 (grupos G2, G2,5 e G3) mostrou que o grupo G2,5 e o grupo G2 (uretana e cigarro) apresentaram o mesmo comportamento estatístico, sendo ambos estatisticamente diferentes do grupo só de uretana (G3) quanto ao número de nódulos ( $p=0,016$ ), porém não há evidência de diferença significativa quanto ao tempo de exposição ao cigarro.

## **3.2 Análise morfométrica**

### **3.2.1 Área dos nódulos**

Os resultados das áreas dos nódulos foi submetida à análise estatística, divididos em: **1- maior área, 2- menor área, 3- soma das áreas e 4- média das áreas** em cinco animais dos grupos G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G10 e G11. Os valores individuais são apresentados no Anexo V.

A tabela 3 mostra os valores referentes às áreas dos nódulos dos grupos estudados.

**TABELA 3 – ÁREA DOS NÓDULOS PULMONARES**

Valores em  $\mu\text{m}^2$  relativos a menor área, maior área, média das áreas e soma das áreas. submetidos à análise estatística

grupo	**N	Menor área		Maior área		Média áreas		Soma áreas	
		mediana	*aiq	mediana	*aiq	mediana	*aiq	mediana	*aiq
g2	5	42779	57778	353007	371723	147229	165553	444776	778080
g3	5	57351	112141	663076	772992	333495	233699	1427045	1332040
g4	5	96522	113580	1219692	8483844	456993	3067365	2284963	8074457
g5	5	83579	39224	381808	2446552	255384	911772	766152	2903051
g6	5	65226	121963	716616	1657860	369622	784805	1589722	1708790
g8	5	154864	238342	557275	4011184	424374	1168139	812017	7910857
g7	5	158838	347457	510514	478119	334676	424407	916165	893579
g10	5	131968	125583	721652	453718	418859	225198	1675436	1475721
g11	5	98009	295531	623039	1208330	369880	682119	1849400	3480457

\*aiq = amplitude interquartilica (3ºquartil – 1ºquartil)

\*\*N = Número de animais

GRUPO 1 (G1)- controle só cigarro

GRUPO 2 (G2)- uretana + cigarro

GRUPO 3 (G3)- só uretana

GRUPO 4 (G4)- beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 5 (G5)- beta caroteno 0,05 + uretana + cigarro

GRUPO 6 (G6)- beta caroteno 0,005% + uretana + cigarro

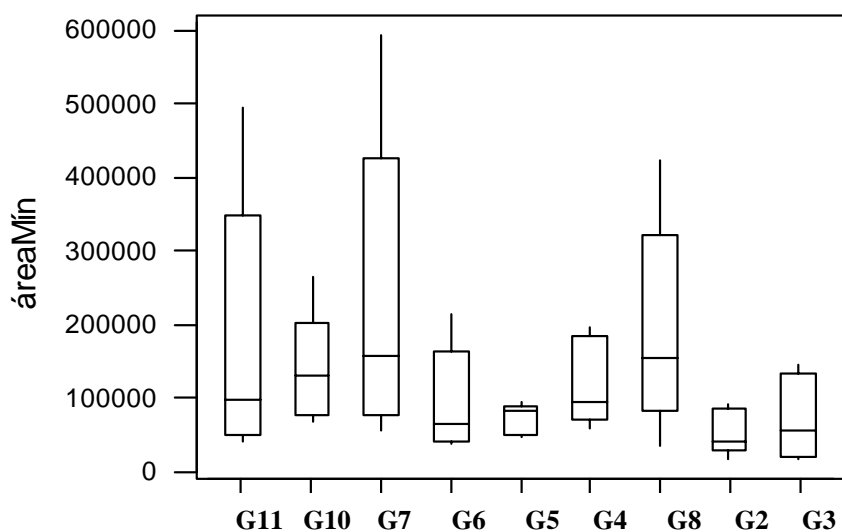
GRUPO 8 (G8)- beta caroteno 0,25% + uretana

GRUPO 7 (G7)- alfa tocoferol 0,25% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 10 (G10)- alfa tocoferol 0,05% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 11 (G11)- alfa tocoferol 0,005% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

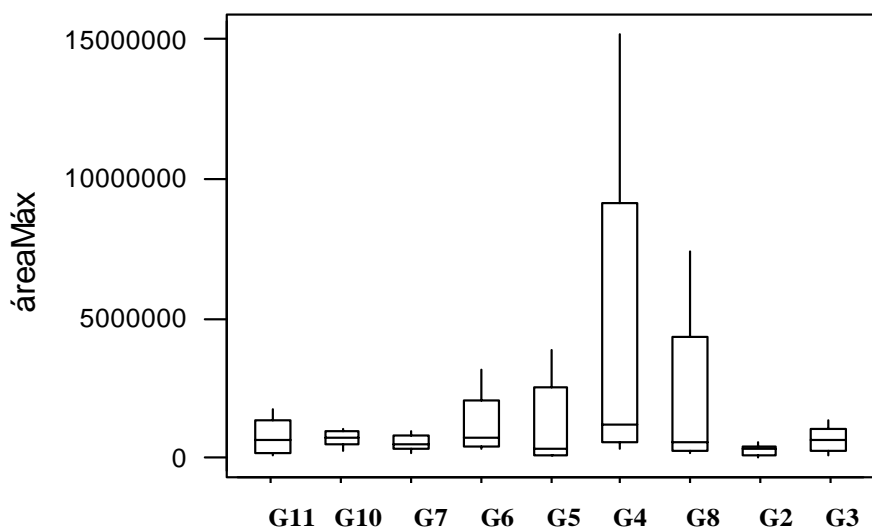
As figuras 14, 15, 16 e 17 ilustram os resultados da área dos nódulos dos grupos estudados.



**FIGURA 14: MENOR ÁREA**

Representação gráfica do tipo “box-plot”.

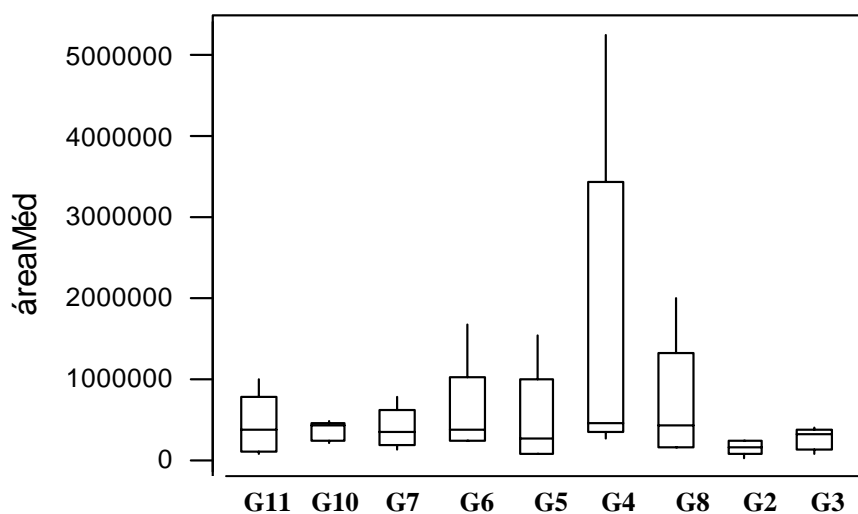
O grupo G2 (uretana + cigarro) mostrou-se menor que G4 (beta-caroteno 0,25% + uretana + cigarro) ( $p=0,03$ ) e G8 (beta-caroteno 0,25% + uretana ) ( $p=0,047$ ).



**FIGURA 15: MAIOR ÁREA**

Representação gráfica do tipo “box-plot”.

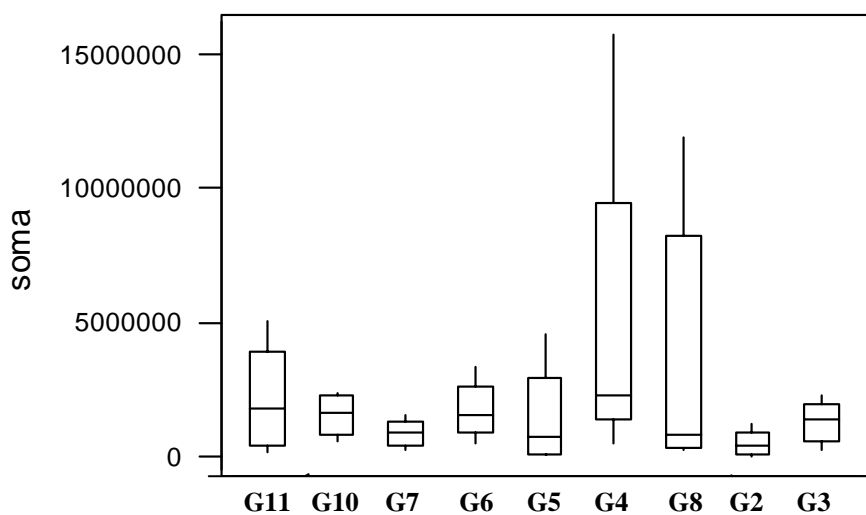
O grupo G2 (uretana + cigarro) mostrou-se menor que G4 (beta-caroteno 0,25% + uretana + cigarro) ( $p=0,03$ ).



**FIGURA 16: MÉDIA DAS ÁREAS**

Representação gráfica do tipo “box-plot”.

Os grupos G4 (beta-caroteno 0,25% + uretana + cigarro) e G8 (beta-caroteno 0,25% + uretana) apresentaram maior média das áreas que G2 (uretana + cigarro) e G3 (só uretana) ( $p=0,028$ ).



**FIGURA 17: SOMA DAS ÁREAS**

Representação gráfica do tipo “box-plot”.

O grupo G2 (uretana + cigarro) apresentou a soma das áreas menor que os grupos G4 (beta-caroteno 0,25% + uretana + cigarro) ( $p=0,018$ ) e G3 (só uretana) ( $p=0,047$ ).

A análise estatística das áreas dos nódulos mostrou que:

- Houve diferença estatisticamente significante na soma da área de tumor, tendo se mostrado significativamente maior ( $p=0,047$ ) a soma das áreas dos nódulos dos animais do grupo G3 (só uretana) em relação ao grupo G2 (uretana e cigarro).
- O grupo com dieta de Beta-caroteno a 0,25% mais uretana sem ser exposto à fumaça do cigarro (G8) não tem diferença significativa comparado com o grupo que recebeu a mesma concentração de beta-caroteno e uretana e que foi exposto à fumaça do cigarro(G4), porém apresentam maiores médias de área comparados aos grupos G2 e G3 (uretana com e sem cigarro respectivamente). ( $p=0,028$ ).
- Há evidência de que a dieta com Beta-caroteno a 0,25% aumente a área dos nódulos. O grupo com dieta de Beta-caroteno a 0,25% mais uretana e cigarro (G4) mostrou-se maior que o grupo com uretana e cigarro sem a dieta de Beta-caroteno (G2) quanto a média, soma, menor e maior área ( $p=0,006$ ;  $p=0,018$ ;  $p=0,03$  e  $p=0,03$  respectivamente).
- O grupo com dieta de Beta-caroteno a 0,25% mais uretana sem ser exposto à fumaça do cigarro (G8) mostrou-se maior que o grupo com uretana e cigarro sem a dieta de Beta-caroteno (G2) quanto à menor área ( $p=0,047$ ).

### 3.2.2 Contagem de pontos

A tabela 4, e a figura 18 mostram a fração nuclear (F.nuc), fração estromal (F.est), fração citoplasmática (F.cit) e a relação núcleo- citoplasma (N/C)). Os dados foram analisados e submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney. As significâncias são mostradas pelas letras, onde grupos com a mesma letra apresentam o mesmo comportamento estatístico.

**TABELA 4 – MORFOMETRIA - CONTAGEM DOS PONTOS**

Dados obtidos para a morfometria pela técnica de contagem de pontos - fração nuclear (F.nuc), fração estromal (F.est) e a relação núcleo- citoplasma (N/C).

grupo	*** n	fração nuclear		relação núcleo- citoplasma		fração estromal		Significância estatística**
		mediana	aiq*	mediana	aiq*	mediana	aiq*	
g2	5	0,55	0,13	1,20	0,62	0,10	0,04	a
g3	5	0,57	0,03	1,34	0,17	0,04	0,03	b
g4	5	0,49	0,06	0,99	0,27	0,05	0,05	b
g5	3	0,51	0,10	1,11	0,38	0,33	0,31	ac
g7	3	0,58	0,17	1,42	1,41	0,38	0,09	c
g10	5	0,51	0,14	1,07	0,64	0,06	0,08	ab
valor-p		0,061		0,075		0,011		

\*aiq = amplitude interquartílica (3ºquartil – 1ºquartil)

\*\* Grupos com a mesma letra apresentam o mesmo comportamento estatístico.

\*\*\* n = número de animais

GRUPO 2 (G2)- uretana + cigarro

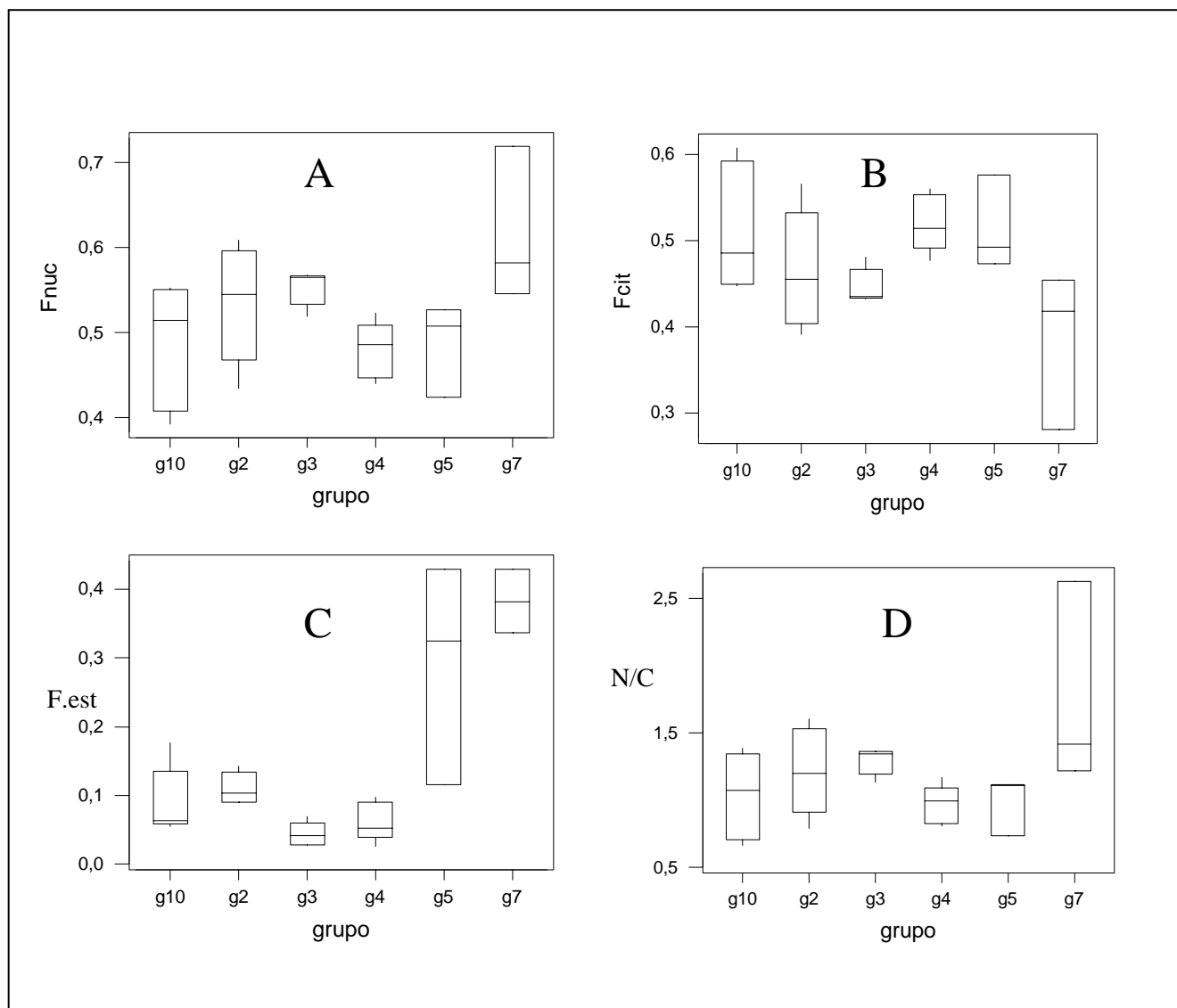
GRUPO 3 (G3)- só uretana

GRUPO 4 (G4)- beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 5 (G5)- beta caroteno 0,05 + uretana + cigarro

GRUPO 7 (G7)- alfa tocoferol 0,25% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 10 (G10)- alfa tocoferol 0,05% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro



GRUPO 2 (G2)- uretana + cigarro

GRUPO 3 (G3)- só uretana

GRUPO 4 (G4)- beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 5 (G5)- beta caroteno 0,05 + uretana + cigarro

GRUPO 7 (G7)- alfa tocoferol 0,25% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 10 (G10)- alfa tocoferol 0,05% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

### FIGURA 18: MORFOMETRIA – CONTAGEM DE PONTOS

Representação gráfica do tipo “box-plot”. Valores relativos à contagem de pontos. (A) - fração nuclear (Fnuc), (B) - fração citoplasmática (Fcit), (C) - fração estromal (F.est) e (D) - relação núcleo- citoplasma (N/C). A fração estromal dos grupos G3 e G4 foram menores que os grupos G2, G5 e G7 ( $p=0,011$ ), e a do grupo G7 foi maior que os grupos G2 e G10 ( $p=0,011$ ). A fração nuclear do grupo G5 foi menor que o grupo G7 ( $p=0,04$ ).



A análise estatística da contagem de pontos mostrou que:

- A fração estromal dos grupos G3 (só uretana) e G4 (beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro) apresentaram o mesmo comportamento estatístico, porém foram menores que os grupos G2 (uretana e cigarro), G5 (beta caroteno 0,05 + uretana + cigarro) e G7 (alfa tocoferol 0,25% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro) ( $p=0,011$ ).
- Nos grupos com dieta de Alfa tocoferol, a fração estromal mostrou-se significativamente menor no grupo G10 (alfa tocoferol 0,05% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro) comparada ao do grupo G7 (alfa tocoferol 0,25% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro) ( $p=0,011$ ).
- O grupo G7 (alfa tocoferol 0,25% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro) também mostrou-se com a fração estromal maior que o grupo G2 (uretana + cigarro). ( $p=0,011$ ).
- Fração nuclear foi menor no grupo G5 (Beta-caroteno 0,05% + cigarro + uretana) quando comparada com o grupo G7 (Alfa-tocoferol 0,25% + Beta-caroteno 0,25% + cigarro + uretana) ( $p=0,040$ ).

## 4 DISCUSSÃO

Várias hipóteses têm sido levantadas na tentativa de explicar os efeitos negativos da suplementação com beta-caroteno (isolado ou associado à vitamina E), no estudo ATBC, bem como do carotenóide administrado em conjunto com a vitamina A, no estudo CARET, na prevenção primária de câncer<sup>(17)</sup>.

Discute-se que os indivíduos, ao início dos estudos ATBC e CARET, estavam com idade "avançada" e apresentavam história de exposição prolongada à fumaça do tabaco ou ao asbesto, provavelmente se encontrando em fase adiantada do processo de promoção da carcinogênese<sup>(59)</sup>. Desse modo, o beta-caroteno poderia estar sendo administrado tardiamente no processo, uma vez que o carotenóide parece ser efetivo quando suplementado antes ou durante os estágios iniciais da carcinogênese<sup>(60, 61)</sup>. Além disso, quando administrado em excesso ou em quantidades bem acima daquelas normalmente ingeridas pelas populações saudáveis, essa substância pode agir como pró-oxidante, ocasionando efeitos tóxicos, inclusive potencializando o estado oxidativo crônico presente nos pulmões de tabagistas inveterados<sup>(30, 35)</sup>. Vale acrescentar que nesses estudos, as doses administradas do carotenóide representavam no mínimo dez vezes o consumo habitual dos indivíduos estudados<sup>(17)</sup>.

No presente estudo, avaliou-se os efeitos da associação do beta-caroteno, alfa-tocoferol e do fumo após a administração de uretana, ou seja, os animais receberam a uretana e, somente a partir deste ponto, é que foram realizados os protocolos desta associação, de acordo com cada grupo em questão. Tal fato se torna importante de ser enfatizado, visto que o processo de carcinogênese já se encontrava em andamento, dificultando a ação preventiva destas substâncias contra o câncer de pulmão.

Em vários relatos de estudos epidemiológicos observacionais e de estudos em modelos animais, indica-se que o beta-caroteno pode exercer efeito protetor contra o câncer, em populações saudáveis, e em combinação com substâncias antioxidantes, se ingerido em quantidades mais fisiológicas, conforme encontrado em uma dieta rica em frutas e hortaliças<sup>(62)</sup>. Esse fato foi confirmado em nosso experimento, visto que as doses menores de beta-caroteno apresentaram melhores resultados quanto sua ação antitumoral.

Outro fator importante é que a ação protetora do beta-caroteno em combinação com outras substâncias, dentre elas o alfa-tocoferol, torna-se mais efetiva, pois esses nutrientes podem interagir no ambiente celular e potencializar a defesa antioxidante<sup>(63)</sup> resultando, por exemplo, em proteção contra dano oxidativo no DNA<sup>(21, 22, 23)</sup>. Além disso, a ação sinérgica destas substâncias antioxidantes na quimioprevenção de câncer já foi demonstrada em modelo *in vivo* de carcinogênese<sup>(64)</sup>. Tal associação também foi realizada em nosso experimento, gerando resultados que condizem com estas afirmações.

#### **4.1 Efeito do cigarro na evolução dos tumores induzidos por uretana**

Nenhuma outra medida teria tanto impacto na redução da incidência do câncer como a eliminação total do tabagismo. Tal fato geraria prevenção de 54% do câncer de esôfago, de 71% do câncer de pulmão e de 86% do câncer de laringe<sup>(65)</sup>.

A análise dos resultados da primeira parte do trabalho - maior número de nódulos encontrados na microscopia, menor fração estromal e maior soma da área de

tumor do grupo G3 (só uretana) comparadas ao grupo G2 (uretana+cigarro) - atribuíram ao cigarro um fator protetor na evolução de tumores induzidos por uretana.

Devido a estes resultados inesperados, pois o mais provável seria que o cigarro atuasse como um agente potencializador no processo de carcinogênese causado pela uretana, verificou-se a possibilidade de erros no experimento, desde o material e métodos utilizados, até a análise das lâminas. Além da possibilidade de que esse resultado poderia ter sido obtido por falha na contagem microscópica dos nódulos, solucionada com os cortes seriados, também poderia ter ocorrido troca das caixas dos camundongos no momento do sacrifício. Tal hipótese foi descartada, pois no grupo G2 (uretana+cigarro) observou-se alterações pulmonares histológicas como macrófagos com pigmento acastanhado, confirmando a inalação de cigarro, o que não foi observado nos pulmões do outro grupo. Não havia em nenhum dos grupos inflamação pulmonar, apenas reação granulomatosa do tipo corpo estranho secundária à inalação de serragem, presentes em todos os grupos. Em relação a uretana, como foi aplicada no mesmo dia em ambos os grupos, descartou-se a possibilidade de diferenças quanto à concentração ou qualidade do carcinógeno ou perda do efeito farmacológico por sensibilidade à luz.

Como não foram encontradas falhas metodológicas, decidiu-se então avaliar se o cigarro realmente protege ou retarda o câncer de pulmão nesse modelo, talvez por uma interação com a uretana. Para isso, iniciou-se um estudo tipo dose-resposta com grupos formados por camundongos induzidos por uretana e expostos a diferentes períodos com fumaça de cigarro (0, 30, e 60 dias), e sacrificados após dois meses. Com isso, esperar-se-ia que, se o cigarro realmente se comportasse como um fator protetor do

câncer de pulmão causado por uretana, à medida que os grupos fossem mais expostos à fumaça de cigarro apresentariam uma quantidade menor de nódulos.

A análise desses grupos não mostrou diferença estatística entre o número de nódulos ou de hiperplasia, apenas uma aparente tendência ao grupo GDR0 ter mais nódulos do que o GDR60. Como os camundongos ficaram sob exposição apenas por dois meses, aumentou-se o período de estudo, pois as lesões pulmonares nesse modelo aumentam com o tempo<sup>(57)</sup>. Iniciou-se então outro estudo dose-resposta, com mais um grupo de animais com uretana, por 4 meses, com exposição de 2 meses ao cigarro (“GDR2,5”), para termos no final um grupo de uretana sem exposição ao cigarro (“G3”), um com 4 meses de exposição (“G2”), e este novo, intermediário, perfazendo um experimento de dose-resposta com intervalo maior. Entretanto, verificou-se o mesmo comportamento nos grupo G2 (uretana e cigarro) e GDR2,5, ambos estatisticamente diferentes do grupo só de uretana (G3) quanto ao número de nódulos, porém sem demonstrar uma curva do tipo dose-resposta.

Algum outro fator desconhecido pode ter interferido em nossos resultados e também ter interagido com o beta-caroteno e o alfa-tocoferol. Embora se discuta o efeito inibidor do cigarro em alguns tipos de doenças como Chron e Leiomiomas uterinos, a associação do fumo passivo com o câncer de pulmão está mais do que estabelecida<sup>(3, 5, 9, 11, 66, 67)</sup>.

Vários fatores podem ter interferido, desde a alta concentração do monóxido de carbono (CO) encontrada nas nossas câmaras de fumo durante o experimento (cerca de 500 ppm) à possibilidade de ação inibitória secundária a hipóxia tecidual.

Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente, o limite de tolerância ao CO é de até nove partes por milhão, sendo que valores de 15, 30, 40 e 50 ppm indicam Níveis de Atenção, Alerta, Emergência e Crítico respectivamente<sup>(68)</sup>.

A queima de um cigarro produz monóxido de carbono e dezenas de outros produtos tóxicos responsáveis pela alteração da oxigenação dos tecidos, além de liberar nicotina<sup>(9)</sup>, gerando broncoconstrição e conseqüente aumento da resistência à ventilação pulmonar, diminuindo assim o consumo de O<sub>2</sub> e a atividade da enzima adenosina-trifosfatase dos macrófagos alveolares<sup>(7)</sup>. Sabe-se que a hipóxia é um inibidor do crescimento neoplásico<sup>(69)</sup>, embora segundo alguns autores ela também possa estimular o desenvolvimento de metástases<sup>(70)</sup>.

Outra possibilidade seria a de ação competitiva da uretana com o cigarro no mesmo local ao nível do DNA. Sabe-se que a uretana é um composto genotóxico, com ligação covalente ao DNA da célula<sup>(49)</sup>, capaz de induzir a carcinogênese pelo aumento da produção de espécimes de radicais livres e pela depuração do DNA por seus metabólitos<sup>(50)</sup>, além de inibir ou reduzir a atividade de enzimas reparadoras de danos ao DNA<sup>(51)</sup>.

O estudo da expressão gênica e da ação de antioxidantes, resposta imune e citocinas tem sido realizado, inclusive em modelos experimentais semelhantes<sup>(71)</sup>. Entretanto, não foram encontrados relatos na literatura que pudesse corroborar alguma dessas hipóteses ligadas ao CO e ao cigarro.

A inibição dos tumores induzidos pela uretana também pode ser atribuída ao estresse, conforme relatado por Stinn e colaboradores<sup>(72)</sup>, onde ratos

tratados com uretana apresentaram uma diminuição de 25% quando submetidos à limitação de alimento e do fumo. Os autores sugerem uma inibição induzida pelo estresse na evolução dos tumores de pulmão neste modelo, acompanhada por um aumento da corticosterona circulante. No nosso trabalho, durante a exposição dos animais à fumaça do cigarro, podemos supor que a alta concentração de CO, observada pela agitação dos animais na tentativa de proteger os olhos com as patas dianteiras, mantendo-se agrupados nos cantos da câmara de fumo, além de outros fatores como a manipulação e o ruído, poderiam ter provocado estresse que justifique a atribuição dada ao cigarro como um fator protetor na evolução de tumores induzidos por uretana. Entretanto, este é um dos primeiros trabalhos encontrados na literatura mostrando essa relação do estresse, fumo e câncer. Existem inúmeros trabalhos experimentais com cigarro que não obtiveram resultados semelhantes. Seria necessário maiores estudos avaliando essa possibilidade.

### **A teoria da hormese:**

Hormese foi definida como um relacionamento de dose-resposta em que há uma ativação biológica em doses baixas mas uma inibição em doses elevadas, ou vice-versa, tendo por resultado uma curva em forma de U, J ou uma dose-resposta em forma de U invertida, ou seja, uma resposta bifásica da dose-resposta em que um produto químico exerce efeito oposto dependendo da dose<sup>(73)</sup>.

Os efeitos da Hormese foram estudados por mais de duas décadas e muitos elementos tóxicos mostraram benefícios com exposição em baixas concentrações. Segundo Fukushima<sup>(73)</sup>, muitos agentes parecem estimular o metabolismo em concentrações baixas mas inibir em doses mais elevadas. Esta idéia

forneceu uma explanação toxicológica para o desenvolvimento de idéias homeopáticas, sendo então associada como modalidade de prevenção terapêutica. Os efeitos Horméticos foram observados nos níveis de exposição baixos baseados no teste padrão da dose-resposta, indicando que pode realmente haver um risco reduzido de efeitos tóxicos nos níveis de exposição baixos.

Segundo Calabrese & Blain<sup>(74)</sup>, este efeito pode ser relacionado com uma base de dados com critérios evolutivos para (1) identificar casos prováveis de hormese com a intenção de avaliar as características quantitativas da resposta de dose hormética; (2) para avaliar a hipótese hormética de acordo com o modelo, o “*ponto final*” e a natureza biológica do produto químico e dos agentes físicos que induzem respostas horméticas; (3) para avaliar os aspectos históricos da pesquisa toxicológica e as várias características da resposta de dose hormética; (4) e para criar um recurso para avaliar uma variedade de hipóteses e/ou perguntas toxicológicas. Segundo os autores, dentre os critérios de entrada, estão valores com 10% da resposta (isto é, U invertido) ao menos em uma dose quando se espera crescimento, ou em uma depressão de 3% (isto é, uma curva J) na resposta quando se espera uma estimulação (por exemplo o câncer). Os critérios da curva J na dose-resposta foram estruturados para serem proporcionalmente similares àqueles da resposta de dose invertida da curva U. A razão para os valores diferentes entre o U invertido e a dose-resposta da curva J é de que os limites máximos de estimulação da resposta para as duas curvas podem aumentar em termos absolutos por 300%, 100% a 400% para o U invertido, quando a curva em forma de J pode diminuir 100% a 0.0%. Se os critérios de seleção de 10% ou de 3% não forem satisfeitos, a resposta da dose pode ser incorporada na base de dados se conseguir o significado estatístico para testar a hipótese.



Neste trabalho, os resultados atribuíram ao cigarro um fator protetor ao desenvolvimento do câncer induzido pela uretana, o que aparentemente na dose utilizada, poderia ser uma resposta hormética. Os dois estudos tipo dose-resposta realizados não puderam atribuir um efeito protetor dose-dependente, o que justifica novos estudos com doses maiores buscando o “*ponto final*” de inversão nos resultados. Este estudo já se encontra em desenvolvimento, e seus resultados poderão em muito colaborar para esta discussão.

#### **4.2 Efeitos do beta-caroteno e do alfa-tocoferol no processo de carcinogênese pulmonar**

Ao avaliar os efeitos do beta-caroteno e do alfa-tocoferol no processo de carcinogênese pulmonar, obtivemos resultados interessantes e comparáveis com a literatura.

Embora o beta caroteno tenha inibido a formação de nódulos, quando utilizado em dose alta (0,25%) teve efeito menor do que em doses mais baixas (0,05 e 0,005%).

A suplementação de beta-caroteno em concentração de 0,25% sem a exposição dos animais ao cigarro mostrou-se com menor número de nódulos e hiperplasias quando comparados aos animais do grupo que recebeu o mesmo tratamento, porém sem o suplemento de beta-caroteno.

Com a presença da fumaça do cigarro, as duas doses menores de beta-caroteno se mostraram estatisticamente semelhantes, porém com menor número de nódulos quando comparados ao grupo com concentração de 0,25%. Estes resultados

atribuem ao beta-caroteno um efeito protetor, demonstrado em diferentes modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*<sup>(18, 30, 31)</sup>, principalmente em menores concentrações<sup>(17)</sup>. Isto ocorre porque o beta caroteno pode agir como parte do sistema de defesa antioxidante do organismo humano, quando presente em quantidade fisiológica e sob determinadas condições intracelulares, como por exemplo, à pressões parciais fisiológicas de oxigênio<sup>(18, 33)</sup>.

Os animais que receberam dieta com suplementação de beta-caroteno em concentração de 0,05% e foram expostos ao cigarro apresentaram diminuição significativa do número de nódulos e hiperplasias quando comparados aos animais do grupo que recebeu o mesmo tratamento sem o suplemento de beta-caroteno, porém o grupo com suplementação de beta-caroteno em concentração de 0,25% associado à fumaça do cigarro não mostrou-se estatisticamente diferente deste grupo, o que reforça o dado de maior efeito protetor do beta-caroteno em quantidades fisiológicas. Porém, isso contraria o exposto por Silva & Naves<sup>(17)</sup>, no qual relatam que, em altas concentrações e à pressões parciais de oxigênio elevadas, os mesmos podem funcionar como agentes oxidantes, contribuindo para a formação de radicais livres<sup>(34, 35, 36)</sup> e serem responsáveis pelos efeitos adversos eventualmente resultantes do uso abusivo dessas substâncias. Em nosso trabalho, o que evidenciou esta adversidade nos dados é que a dieta com beta-caroteno a 0,25% aumente a área dos nódulos, demonstrada pela maior área no grupo com dieta de beta-caroteno a 0,25% mais uretana e cigarro (G4) comparada com o grupo sem a dieta Beta-caroteno (G2 - uretana e cigarro), além é claro do fato que os grupos estavam em regime de hipoxemia.

A exposição à fumaça do cigarro não alterou o número de nódulos quando na presença de dieta com beta-caroteno a 0,25%, porém o número de hiperplasias com a presença do cigarro diminuiu. Além disso, observou-se pela análise morfométrica que a fração estromal dos grupos G3 (só uretana) e G4 (beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro) apresentaram o mesmo comportamento estatístico, porém foram menores que os grupos G2 (uretana e cigarro) e G5 (beta caroteno 0,05% + uretana + cigarro), o mesmo efeito de diminuição da fração estromal observado em estudos anteriores quanto ao efeito promotor da poluição atmosférica<sup>(57)</sup>. Esses resultados corroboram com muitos estudos que demonstram a diminuição do efeito antioxidante do beta-caroteno quando associado ao fumo<sup>(75, 76, 77)</sup>, e quanto ao efeito deletério de seu uso em altas doses<sup>(78)</sup>.

Obermuller-Jevic<sup>(79)</sup> entretanto, não relatou nenhuma alteração da progressão da neoplasia utilizando as mesmas doses de beta-caroteno por nós utilizadas, mas esse pesquisador observou uma piora das lesões com o uso do cigarro. Existem ainda trabalhos que não demonstram alterações com o uso de beta-caroteno na progressão de neoplasia pulmonar, apenas nos carcinomas de pele<sup>(80)</sup>, ou ainda inibição de neoplasias em diversos modelos com altas doses dessa substância<sup>(81, 82)</sup>.

Quanto ao alfa-tocoferol, Woodson e colaboradores<sup>(83)</sup> relataram uma diminuição do câncer em indivíduos não fumantes que utilizaram essa vitamina, assim como foi demonstrada a ação antagonista ao efeito pró-oxidante do beta-caroteno em cultura de células<sup>(84)</sup>. O efeito protetor dos retinóides em relação ao fumo foi testado por outros autores<sup>(78, 85)</sup>.

Em nosso trabalho, um dado importante foi o de que, pela análise morfométrica, a fração estromal dos grupos G3 (só uretana) e G4 (beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro) foi menor que a do grupo G7 (alfa tocoferol 0,25% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro). Além disso, no grupo com suplementação de beta-caroteno 0,25% associado ao alfa-tocoferol 0,05% (G10) foi constatado menor número de nódulos comparado ao grupo G2 (cigarro + uretana). Como o grupo G2 foi estatisticamente semelhante ao grupo G4 (cigarro + uretana + beta-caroteno 0,25%), a inclusão desta concentração de alfa-tocoferol mostrou-se com efeito protetor. A fração estromal menor seria um indicador indireto de uma maior agressividade do tumor, assim como o aumento da relação núcleo-citoplasma, uma maior fração nuclear e uma menor fração citoplasmática.

Tal efeito foi descrito por Silva & Naves<sup>(17)</sup>, no qual classifica o alfa-tocoferol como altamente antioxidante e extremamente ativo<sup>(18, 19, 32)</sup>. Wang<sup>(4)</sup> sugere que a exposição ao cigarro diminui o nível de antioxidantes como o alfa-tocoferol no pulmão e que a oxidação do beta-caroteno pelo fumo diminuiu de 42% a 70% quando o alfa-tocoferol foi usado concomitantemente com o beta-caroteno. No estudo de Duthie e colaboradores<sup>(47)</sup>, a suplementação da dieta de fumantes e não-fumantes com uma mistura de vitamina C, beta-caroteno e vitamina E resultou em uma redução estatisticamente significante de danos por oxidação endógena de DNA de linfócitos. Contrariamente, nos estudos CARET e ATBC, não foram observados efeitos favoráveis do alfa-tocoferol à redução de incidência de câncer de pulmão ou na taxa de mortalidade devida à essa doença, assim como também não obtiveram resultados estatisticamente significantes de uma interação entre o alfa-tocoferol e o beta-caroteno com relação à diminuição da incidência de câncer de pulmão.

Nos grupos com dieta de alfa-tocoferol, a fração estromal mostrou-se significativamente maior no grupo G7 (alfa-tocoferol 0,25% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro) comparada à do grupo G10 (alfa-tocoferol 0,05% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro), demonstrando ter a dose mais alta maior efeito protetor, o que também foi observado quando comparado ao grupo G2 (cigarro e uretana), mostrando-se significativamente maior sua fração estromal.

Outro dado interessante é o de que a fração nuclear foi menor no grupo G5 (Beta-caroteno 0,05% + cigarro + uretana) comparada com o grupo G7 (Alfa-tocoferol 0,25% + Beta-caroteno 0,25% + cigarro + uretana), o que reforça novamente o dado de maior efeito protetor do beta-caroteno em quantidades fisiológicas<sup>(17)</sup> mesmo na presença do alfa-tocoferol, ou seja, aparentemente houve maior efeito protetor com dose menor de beta-caroteno do que com doses maiores mesmo associada ao alfa-tocoferol.

### **Considerações finais:**

O nosso trabalho trouxe algumas respostas e gerou muitas outras perguntas. Quanto ao nosso principal objetivo, da avaliação dos efeitos do beta-caroteno e do alfa-tocoferol, torna-se evidente a necessidade de, em outros estudos, utilizar o alfa-tocoferol sozinho ou com doses menores de beta-caroteno para verificar mais profundamente o seu papel.

Quanto ao fato dos resultados terem atribuído ao cigarro um fator protetor na evolução de tumores induzidos por uretana, a hipótese mais provável é a do efeito hipoxemiante associado ao efeito tóxico do monóxido de carbono, que podem ter influenciando em nossos resultados. Desta forma, também torna-se fundamental estudar

essa possibilidade, utilizando-se a mesma câmara de fumo, porém com o uso de CO ao invés do cigarro. Esta hipótese já está sendo testada em novo trabalho, e seus resultados poderão em muito colaborar para esta discussão. Além disso, conforme mencionado anteriormente, outra possibilidade, a do efeito de hormese, também está sendo testada. A teoria da interação entre a uretana, o fumo e até mesmo o CO a nível molecular, também seria interessante estudar. Entretanto, a complexidade e a dificuldade de testar as inúmeras possibilidades dessas interações nos impede de fazê-la neste momento.

---

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados conduzem às conclusões que se seguem:

1. A exposição ao fumo passivo gera um fator protetor na evolução de tumores induzidos por uretana em camundongos, como pôde ser observado no maior número de nódulos encontrados na microscopia, menor fração estromal e maior soma da área de tumor.
2. Não há evidência de que o efeito do fumo passivo sobre a taxa de desenvolvimento e progressão dos tumores induzidos por uretana em camundongos seja dose-dependente nos protocolos utilizados.
3. A suplementação de beta-caroteno na dose de 0,25% sem estar associada ao fumo passivo gera um fator protetor na evolução de tumores induzidos por uretana em camundongos.
4. A suplementação de beta-caroteno associada ao fumo passivo gera um fator protetor na evolução de tumores induzidos por uretana em camundongos, porém quando utilizado em dose alta (0,25%) tem efeito menor do que em doses mais baixas (0,05 e 0,005%)

- 
5. A exposição à fumaça do cigarro não altera o número de nódulos induzidos por uretana em camundongos quando na presença de dieta com beta-caroteno a 0,25%, porém o número de hiperplasias com a presença do cigarro diminui.
  
  6. A suplementação de beta-caroteno a 0,25% associada ao fumo passivo aumenta a área dos nódulos induzidos por uretana em camundongos, porém em doses menores (0,05 e 0,005%) não interferem no seu tamanho.
  
  7. A suplementação de beta-caroteno na dose de 0,25% associada ao fumo passivo acelera o processo de carcinogênese pulmonar, como pôde ser observado pela diminuição da fração estromal nos tumores induzidos por uretana, o que não ocorreu com as doses menores (0,05 e 0,005%) ou quando associado ao alfa-tocoferol a 0,25%.
  
  8. A associação do alfa-tocoferol ao beta-caroteno 0,25% e ao fumo passivo gera um fator protetor na evolução de tumores induzidos por uretana em camundongos, o que pôde ser constatado no menor número de nódulos e na maior fração estromal, principalmente na dose 0,25%, que demonstrou ter maior efeito protetor.
  
  9. Não houve diferença em relação às diferentes doses de alfa-tocoferol.



---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OPAS-2003. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/mostrant.cfm?codigodest>>. Acesso em: 18 jan. 2006.
2. INCA-2005. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=340](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=340)>. Acesso em: 18 jan. 2006.
3. INCA-2006. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link>>. Acesso em: 18 jan. 2006.
4. WANG XD, LIU C, BRONSEN R, et al. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *Journal of National Cancer Institute* 1999; 91: 60-66.
5. JARDIM JR, OLIVEIRA JCA, Tabagismo. Disponível em: <<http://www.pneumoatual.com.br/2003>>. Acesso em: 18 jan. 2006.
6. HENNINGFIELD JE, KEENAN RM. Nicotine delivery kinetics and abuse liability. *J Consult Clin Psychol* 1993; 61: 743-50.
7. MEDEIROS AC, ROCHA KFB, FILHO AMD, NETO TA, AZEVÊDO IM. Lesões pulmonares provocadas pela nicotina por via subcutânea em ratos. *Acta Cir Brás*, São Paulo, 2003; 18 Supl 1.
8. ROWELL PP, HURST EE, MARLOWE C, BENNET BD. Oral administration of nicotine: its uptake and distribution after chronic administration to mice. *J Pharmacol Methodol* 1983; 9: 249-61.

- 
9. MARQUES ACPR, CAMPANA A, GIGLIOTTI AP, LOURENÇO MT, FERREIRA MP, LARANJEIRA R. Consenso sobre o tratamento da dependência de nicotina. *Rev Bras Psiquiatr*, São Paulo, 2001; 23.
  
  10. INCA-1996. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id)>. Acesso em: 18 jan. 2006.
  
  11. FURUKAWA F, NISHIKAWA A, KASAHARA K, LEE I, WAKABAYASHI K, TAKAHASHI M, et al. Inhibition by b-carotene of upper respiratory tumorigenesis in hamsters receiving diethylnitrosamine followed by cigarette smoke exposure. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 154-61.
  
  12. HAINAUT P, PFEIFER GP. Patterns of p53 G→T traversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA- damage by tobacco smoke. *Carcinogenesis* 2001; 22: 367-74.
  
  13. WITSCHI H. Successful and not so successful chemoprevention of tobacco smoke-induced lung tumors. *Experimental Lung Research* 2000; 26: 743-55.
  
  14. HECHT SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1194-210.
  
  15. OLSON JA. Vitamins: the tortuous path from needs to fantasies. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, 1994; 124: 1771-6.
  
  16. HATHCOCK JN. Vitamins and minerals: efficacy and safety. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, 1997;.66: 427-37.
  
  17. SILVA CRM, NAVES MMV. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. *Rev Nutr*, Campinas, 2001; 14.

- 
18. ROCK CL, JACOB RA, BOWEN PE. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*, Chicago, 1996; 96: 693-702.
  19. STAHL W, SIES H. Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes*, New York, 1997; 46 Supl 2: 14-8.
  20. CERUTTI PA. Oxy-radicals and cancer. *Lancet*, London, 1994; 344: 862-3.
  21. ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*, Amsterdam, 1996; 350: 103-8.
  22. COZZI R, RICORDY R, AGLITTI T, GATTA V, PERTICONE P, De SALVIA R. Ascorbic acid and beta-carotene as modulators of oxidative damage. *Carcinogenesis*, London, 1997; 18: 223-8.
  23. POOL-ZOBEL BL, BUB A, MÜLLER H, WOLLOWSKI I, RECHKEMMER G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, London, 1997; 18: 1847-50.
  24. BONNE CW, KELLOFF GJ, MALONE WE. Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. *Cancer Research*, Philadelphia, 1990; 50: 2-9.
  25. SPORN MB, ROBERTS AB. What is a retinoid? *Ciba Foundation Symposium*, London, 1985; 113: 1-5.
  26. LOTAN R. Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB Journal*, Bethesda, 1996; 10: 1031-9.

- 
27. OLSON JA. Provitamin A function of carotenoids: the conversion of beta-carotene into vitamin A. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, 1989; 119: 105-8.
  
  28. MANGELS AR, HOLDEN JM, BEECHER GR, FORMAN MR, LANZA E. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evolution of analytic data. *Journal of the American Dietetic Association*, Chicago, 1993; 93: 284-96.
  
  29. GODOY HT, RODRIGUEZ-AMAYA DB. Occurrence of *cis*-isomers of provitamin A in Brazilian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, 1994; 42: 1306-13.
  
  30. NAVES MMV, MORENO FS. Beta Carotene and cancer chemoprevention: from epidemiological associations to cellular mechanisms of action. *Nutrition Research*, New York, 1998; 18: 1807-24.
  
  31. NAVES, MMV, MORENO FS. Comunicações intercelulares com conexinas: importância na carcinogênese e papel modulador dos carotenóides. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, 2000; 36: 1-11.
  
  32. NIKI E. Alfa-Tocopherol. In: CADENAS E, PACKER L. (ed.). *Handbook of antioxidants*. New York : Marcel Dekker, 1996. p. 3-25.
  
  33. BURTON GW, INGOLD KU. Beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, Washington DC, 1984; 224: 569-73.
  
  34. HERBERT V. Prooxidant effects of antioxidant vitamins. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, 1996; 126: 1197-200.
  
  35. PALOZZA P. Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems. *Nutrition Reviews*, New York, 1998; 56: 257-65.

- 
36. PODMORE ID, GRIFFITHS HR, HERBERT KE, MISTRY N, MISTRY P, LUNEC J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*, London, 1998; 392: 559.
  
  37. OLSON JA. Benefits and liabilities of vitamin A and carotenoids. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, 1996; 126 Supl 4: 1208-12.
  
  38. MATHEWS-ROTH MM. Carotenoids and cancer prevention: experimental and epidemiological studies. *Pure and Applied Chemistry*, London, 1985; 57: 717-22.
  
  39. BLOT WJ, LI JY, TAYLOR PR, GUOW, DAWSEY S, WANG GQ, et al. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *Journal of the National Cancer Institute*, Bethesda, 1993; 85: 1483-91.
  
  40. HENNEKENS CH, BURING JE, MANSON JE, STAMPFER M, ROSNER B, COOK NR, et al. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence malignant neoplasms and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*, London, 1996; 334: 1145-9.
  
  41. ALBANES D, HEINONEN OP, TAYLOR PR, VIRTAMO J, EDWARDS BK, RAUTALAHTI M, et al. Alpha- tocopherol and beta- carotene supplements and lung cancer prevention study: effects of base-line characteristics and study compliance. *Journal of National Cancer Institute* 1996; 88: 1560-70.
  
  42. OMENN GS, GOODMAN GE, THORNQUIT MD, BALMES J, CULLEN MR, GLASS A, et al. Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the beta-carotene and retinol efficacy trial. *Journal of National Cancer Institute* 1996; 88: 1550-9.
  
  43. Alpha tocopherol, beta-carotene cancer prevention study group. The effect of vitamin E and bete-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N Engl J Med* 1994; 88: 1560-70.

- 
44. OMENN GS, GOODMAN GE, THORNQUIST MD, BALMES J, CULLEN MR, GLASS A, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Eng J Med* 1996; 334: 1150-5.
45. HERCBERG S, GALAN P, PREZIOSI P, ROUSSEL AM, ARNAUD, J., RICHARD MJ, et al. Background and rationale behind the SUVIMAX study, a prevention trial using nutritional doses of a combination of antioxidant vitamins and minerals to reduce cardiovascular diseases and cancers. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, Bern, 1998; 68: 3-20.
46. PREZIOSI P, GALAN P, HERBETH B, VALEIX P, ROUSSEL AM, MALVY D, et al. Effects of supplementation with a combination of antioxidant vitamins and trace elements, at nutritional doses, on biochemical indicators markers of the antioxidant system in adult subjects. *Journal of the American College of Nutrition*, New York, 1998; 17: 244-9.
47. DUTHIE SJ, MA A, ROSS MA, COLLINS AR. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Research* 1996; 56: 1291-5.
48. ANDRADE-SOBRINHO LG, BOSCOLO M, LIMA-NETO BS, FRANCO DW. Carbamato de etila em bebidas alcoólicas (cachaça, tiquira, uísque e grapa). *Quim Nova* 2002; 25: 1074-7.
49. ZIMMERLI B, SCHLATTER J. Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mutat Res* 1991; 259: 325-50.
50. SAKANO K, OIKAWA S, HIRAKU Y, KAWANISHI S, Metabolism of carcinogenic urethane to nitric oxide is involved in oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 703-14.
51. PETRONZELLI F, RICCIO A, MARKHAM GD, SEEHOLZER SH, GENUARDI M, KARBOWSKI M, et al. Investigation of the substrate spectrum of the human

- mismatch-specific DNA N-glycosylase MED1 (MBD4): fundamental role of the catalytic domain., *J Cell Physiol* 2000; 185: 473-80.
52. BERENBLUM I, BEN-ISHAI D, HARAN-GHERA N, LAPIDOT A, SIMON E, TRAININ N. Skin initiating action and lung carcinogenesis by derivatives of urethane (ethyl carbamate) and related compounds. *Biochemical Pharmacology* 1959; 2: 168-76.
53. TRAININ N, PRECERUTTI A, LAW LW. Trends in carcinogenesis by urethane administered to newborn mice of different strains. *Nature* 1964; 202: 305-6.
54. MIRVISH SS. The carcinogenic action and metabolism of urethane and N-Hydroxyurethane. *Advances Cancer Res* 1968; 11: 1-36.
55. SHIMKIN MB. Pulmonary tumors in experimental animals. *Advances Cancer Res* 1955; 3: 223-67.
56. REYMÃO MSF, CURY PM, LICHTENFELS AJFC, LEMOS CN, BATTLEHNER CN, CONCEIÇÃO GMS, et al. Urban air pollution enhances the formation of urethane-induced lung tumors in mice. *Environmental Research* 1997; 74: 150-8.
57. CURY PM, LICHTENFELS AJFC, REYMÃO MSF, CONCEIÇÃO GMS, CAPELOZZI VL, SALDIVA PHN. Urban levels of air pollution modifies the progression of urethane-induced lung tumors in mice. *Pathol Res Prat.* 2000; 196: 627-33.
58. GUNDERSEN HJG, BENDTSEN TF, KORBO L, MARCUSSEN N, MOLLER A, NIELSEN K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APM.S* 1988; 96: 379-94.
59. DE LUCA LM, ROSS SA. Beta-carotene increases lung cancer incidence in cigarette smokers. *Nutrition Reviews*, New York, 1996; 54: 178-80.

- 
60. MORENO FS, RIZZI MBSL, DAGLI MLZ, PENTEADO MCV. Inhibitory effects of  $\beta$ -carotene on preneoplastic lesions induced in Wistar rats by the resistant hepatocyte model. *Carcinogenesis*, London, 1991; 12: 1817-22.
61. RIZZI MBSL, DAGLI MLZ, JORDÃO JR AA, PENTEADO MVC, MORENO FS.  $\beta$ -Carotene inhibits persistent and stimulates remodeling  $\gamma$ GT-positive preneoplastic lesions during early promotion of hepatocarcinogenesis. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, Bern, 1997; 67: 415-22.
62. NAVES MMV. Beta-caroteno e câncer. *Revista de Nutrição*, Campinas, 1998; 11: 99-115.
63. NIKI E, NOGUCHI N, TSUCHIHASHI H, GOTOH N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and  $\beta$ -carotene. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, 1995; 62 Supl 6: 1322-26.
64. SHKLAR G, SCHWARTZ J, TRICKLER D, CHEVERIE SR. The effectiveness of a mixture of  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -tocopherol, glutathione, and ascorbic acid for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, Philadelphia, 1993; 20: 145-51.
65. MENEZES AMB, HORTA BL, OLIVEIRA ALB, KAUFMANN RAC, DUQUIA R, DINIZ A, et al. Risco de câncer de pulmão, laringe e esôfago atribuível ao fumo. *Rev Saúde Pública*, São Paulo, 2002; 36.
66. TRÉDANIEL J, BOFFETTA P, SARACCI R, HIRSCH A. Exposure to environmental tobacco smoke and risk of lung cancer: the epidemiological evidence. *Eur Respir J* 1994; 7: 1877-88.
67. OPAS–2002. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/mostrant.cfm?dest=151>>. Acesso em: 18 jan. 2006.



- 
68. CETESB. Índice e padrões de qualidade. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/ar\\_indice\\_padroes.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/ar_indice_padroes.asp)>. Acesso em: 04 abr. 2006.
69. PAUL SA, SIMONS JW, MABJEESH NJ. HIF at the crossroads between ischemia and carcinogenesis. *J Cell Physiol* 2004; 200: 20-30.
70. ZHANG, HILL RP. Hypoxia enhances metastatic efficiency by up-regulating Mdm2 in KHT cells and increasing resistance to apoptosis. *Cancer Res* 2004; 15: 4180-9.
71. KEITH RL, MILLER YE, HUDISH TM, GIROD CE, SOTTO-SANTIAGO S, FRANKLIN WA, et al. Pulmonary prostacyclin synthase overexpression chemoprevents tobacco smoke lung carcinogenesis in mice. *Cancer Res* 2004; 15: 5897-904.
72. STINN W, TEREDESAI A, KUHLE P, KNORR-WITTMANN C, KINDT R, COGGINS C, et al. Mechanisms involved in A/J mouse lung tumorigenesis induced by inhalation of an environmental tobacco smoke surrogate. *Inhal Toxicol* 2005; 17: 263-76.
73. FUKUSHIMA S, KINOSHITA A, PUATANACHOKCHAI R, KUSHIDA M, WANIBUCHI H, MORIMURA K. Hormesis and dose-response-mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis* 2005: 1835-45.
74. CALABRESE EJ, BLAIN R. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 202: 289-301.
75. DIETRICH M, BLOCK G, NORKUS EP, HUDES M, TRABER MG, CROSS CE, et al. Smoking and exposure to environmental tobacco smoke decrease some plasma antioxidants and increase gamma-tocopherol in vivo after adjustment for dietary antioxidant intakes. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 160-6.

- 
76. GOOGMAN GE , SCHAFFER S, OMENN GS, CHEN C, KING I. The association between lung and prostate cancer risk, and serum micronutrients: results and lessons learned from beta-carotene and retinol efficacy trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 518-26.
77. POLIDORI MC, MECOCCHI P, STAHL W, SIES H. Cigarette smoking cessation increases plasma level of several antioxidant micronutrients and improves resistance towards oxidative challenge. *Br J Nutr* 2003; 90: 147-50.
78. KARP DD, TSAO AS, KIM ES. Nonsmall cells lung cancer: chemoprevention studies. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 15: 405-20.
79. OBERMUELLER-JEVIC UC, ESPIRITU I, CORBACHO AM, COSS CE, WITSCHI H. Lung tumor development in mice exposed to tobacco smoke and fed beta-carotene diets. *Toxicol Sci* 2002; 69: 23-29.
80. WOLF G. The effect of beta-carotene on lung and skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1263-5.
81. ALEKSANDROV VA, BESPALOV VG, PETROV AS, AVTUSHENKO SS, The inhibitory effect of water-soluble and liposomal beta-carotene on various models of carcinogenesis. *Vopr Onkol* 1998; 44: 79-85.
82. CONAWAY CC., JIAO D, KELLOFF GJ, STEELE VE, RIVENSON A, CHUNG FL. Chemopreventive potencial of fumaric acid, N-acetylcysteine, N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and beta-carotene for tobacco-nitrosamine-induced lung tumors in A/J mice. *Cancer Lett* 1998; 124: 85-93.
83. WOODSON K, TANGREA JA, BARRETT MJ, VIRTAMO J, TAYLOR PR, ALBANES D. Serum alpha-tocopherol and subsequent risk of lung cancer mong male smokers. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1738-43.

84. PEROCCO P, MAZZULLO M, BROCCOLI M, ROCCHI P, FERRERI AM, PAOLINI M. Inhibitory activity of vitamin E and alpha-naphthoflavone on beta-carotene-enhanced transformation of BALB/c 3T3 cells by benzo(a)pyrene and cigarette-smoke condensate. *Mutat Res* 2000; 465: 151-8.
85. ARORA A, WILLHITE CA, LIEBLER DC. Interactions of beta-carotene and cigarette smoke in human bronchial epithelial cells. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1173-8.

# ANEXOS



**ANEXO I:**  
**MÉDIAS PESO / CAMUNDONGOS (g)**

<b>GRUPO</b>	<b>n</b>	<b>início</b>	<b>1º mês</b>	<b>2º mês</b>	<b>3º mês</b>	<b>SACRIFÍCIO</b>
G1	23	49,58	50,14	50,08	51,08	52,08
G2	20	37,00	44,5	47,75	49,00	50,25
G3	19	35,5	45,00	50,00	51,00	51,9
G4	15	37,00	45,00	46,00	50,00	50,53
G5	8	29,44	43,75	43,75	46,12	49,23
G6	8	27,22	45,00	45,62	50,66	50,66
G7	9	30,00	40,00	44,44	46,66	48,22
G8	9	34,00	49,00	52,62	56,66	56,83
G10	12	27,14	41,83	43,33	47,5	46,66
G11	9	37,27	42,22	48,88	52,22	53,33

**Média de peso/camundongo (g)**

GRUPO 1 (G1)- controle só cigarro

GRUPO 2 (G2)- uretana + cigarro

GRUPO 3 (G3)- só uretana

GRUPO 4 (G4)- beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 5 (G5)- beta caroteno 0,05 + uretana + cigarro

GRUPO 6 (G6)- beta caroteno 0,005% + uretana + cigarro

GRUPO 8 (G8)- beta caroteno 0,25% + uretana

GRUPO 7 (G7)- alfa tocoferol 0,25% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 10 (G10)- alfa tocoferol 0,05% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 11 (G11)- alfa tocoferol 0,005% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

**ANEXO II:**  
**VALORES MÉDIOS SEMANAIS DE CO**

<b>SEMANA</b>	<b>GRUPO G1</b>	<b>GRUPO G2</b>
1 <sup>a</sup>	610,00	629,00
2 <sup>a</sup>	579,00	601,00
3 <sup>a</sup>	569,00	565,00
4 <sup>a</sup>	559,00	548,00
5 <sup>a</sup>	544,00	537,00
6 <sup>a</sup>	542,00	549,00
7 <sup>a</sup>	519,50	490,00
8 <sup>a</sup>	467,00	463,00
9 <sup>a</sup>	633,50	454,00
10 <sup>a</sup>	598,00	448,00
11 <sup>a</sup>	567,00	549,00
12 <sup>a</sup>	553,00	515,50
13 <sup>a</sup>	546,00	613,00
14 <sup>a</sup>	554,00	646,00
15 <sup>a</sup>	507,00	584,00
16 <sup>a</sup>	521,50	590,00
<b>MÉDIA</b>	<b>554,00</b>	<b>549,00</b>

Valores médios semanais de CO (ppm)

**ANEXO III:**  
**CONSUMO DE RAÇÃO**

**GRUPO 4 (G4)- BETA CAROTENO 0,25% + URETANA + CIGARRO**

<b>semana</b>	<b>nº animais</b>	<b>consumo média geral (g)</b>	<b>consumo média individual (g)</b>
1	16	77,9	4,86
2	16	95,35	5,96
3	16	89,43	5,59
4	16	86,06	5,38
5	15	76,99	5,13
6	15	67,35	4,49
7	15	71,25	4,75
8	15	76,42	5,09
9	15	85,71	5,71
10	15	76,66	5,11
11	15	57,5	3,83
12	15	61,8	4,12
13	15	63,49	4,23
14	15	62,14	4,14
15	15	64,42	4,29
16	15	73,71	4,91
<b>MÉDIA</b>		<b>74,13</b>	<b>4,85</b>

**GRUPO 5 (G5)- BETA CAROTENO 0,05% + URETANA + CIGARRO**

<b>semana</b>	<b>nº animais</b>	<b>consumo média geral (g)</b>	<b>consumo média individual (g)</b>
1	9	*	*
2	9	34,14	3,79
3	9	*	*
4	9	35,57	3,95
5	8	26,71	3,33
6	8	25,28	3,16
7	8	26,85	3,35
8	8	29	3,62
9	8	33,57	4,19
10	8	38,85	4,85
11	8	29,85	3,73
12	8	28,57	3,57
13	8	29	3,62
14	8	25,66	3,2
15	8	*	*
16	8	31,55	3,94
<b>MÉDIA</b>		<b>30,35</b>	<b>3,71</b>

\* valores não registrados



**GRUPO 6 (G6)- BETA CAROTENO 0,005% + URETANA + CIGARRO**

<b>semana</b>	<b>nº animais</b>	<b>consumo média geral (g)</b>	<b>consumo média individual (g)</b>
1	9	*	*
2	9	31,71	3,52
3	9	41	4,55
4	9	46,14	5,12
5	9	37,42	4,15
6	9	29,71	3,3
7	8	28,28	3,53
8	8	44,85	5,6
9	8	31,71	3,96
10	8	20,85	2,6
11	8	28	3,5
12	8	32	4
13	8	34,14	4,26
14	8	37,14	4,64
15	8	27,42	3,42
16	8	32,28	4,03
<b>MÉDIA</b>		<b>33,51</b>	<b>4,012</b>

\* valores não registrados

**GRUPO 7 (G7)- ALFA TOCOFEROL 0,25% + BETA CAROTENO 0,25% + URETANA  
+ CIGARRO**

<b>semana</b>	<b>n° animais</b>	<b>consumo média geral (g)</b>	<b>consumo média individual (g)</b>
1	8	*	*
2	9	32,28	3,58
3	9	44,14	4,9
4	9	35,57	3,95
5	9	35,57	3,95
6	9	38,71	4,3
7	9	37,28	4,14
8	9	35,71	3,96
9	9	38,14	4,23
10	9	34,28	3,8
11	9	38,14	4,23
12	9	33,42	3,71
13	9	33,71	3,74
14	9	33,14	3,68
15	9	40,71	4,52
16	9	37,14	4,12
<b>MÉDIA</b>		<b>36,52</b>	<b>4,05</b>

\* valores não registrados

**GRUPO 8 (G8)- BETA CAROTENO 0,25% + URETANA**

<b>semana</b>	<b>nº animais</b>	<b>consumo média geral (g)</b>	<b>consumo média individual (g)</b>
1	10	28,85	2,88
2	10	45,28	4,52
3	10	51,14	5,11
4	10	57,42	6,38
5	9	*	*
6	9	48,85	5,42
7	9	*	*
8	9	41,75	4,63
9	9	*	*
10	9	*	*
11	9	*	*
12	9	*	*
13	9	*	*
14	9	*	*
15	9	*	*
16	9	54,6	6,0
<b>MÉDIA</b>		<b>46,84</b>	<b>4,99</b>

\* valores não registrados

**GRUPO 10 (G10)- ALFA TOCOFEROL 0,05% + BETA CAROTENO 0,25% +  
URETANA + CIGARRO**

<b>semana</b>	<b>nº animais</b>	<b>consumo média geral (g)</b>	<b>consumo média individual (g)</b>
1	12	*	*
2	12	*	*
3	12	*	*
4	12	*	*
5	12	43,42	3,1
6	12	63,14	5,26
7	12	68,33	5,69
8	12	61,28	5,01
9	12	60,66	5,05
10	12	65,16	5,43
11	12	62,71	5,22
12	12	54	4,5
13	12	51	4,25
14	12	49,57	4,13
15	12	50,71	4,22
16	12	52	4,33
<b>MÉDIA</b>		<b>56,83</b>	<b>4,68</b>

\* valores não registrados

**GRUPO 11 (G11)- ALFA TOCOFEROL 0,005% + BETA CAROTENO 0,25% +  
URETANA + CIGARRO**

<b>semana</b>	<b>nº animais</b>	<b>consumo média geral (g)</b>	<b>consumo média individual (g)</b>
1	9	*	*
2	9	*	*
3	9	*	*
4	9	49,42	5,49
5	9	55,85	6,2
6	9	55,14	6,12
7	9	*	*
8	9	*	*
9	9	*	*
10	9	58,85	6,53
11	9	*	*
12	9	48,57	5,39
13	9	47,33	5,25
14	9	43,28	4,8
15	9	42,71	4,74
16	9	45,25	5,02
<b>MÉDIA</b>		<b>49,55</b>	<b>5,5</b>

\* valores não registrados

**ANEXO IV**  
**NÚMERO DE NÓDULOS E HIPERPLASIAS**

Microscopia																				
ANIMAL	G1		G2		G3		G4		G5		G6		G7		G8		G10		G11	
	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H
1	0	0	1	0	7	1	3	0	3	0	3	1	2	2	0	1	4	1	2	0
2	0	0	4	1	8	3	2	2	0	0	0	0	1	1	6	0	1	1	12	3
3	0	1	4	1	6	3	0	0	0	0	0	0	2	0	2	1	9	2	8	0
4	0	0	4	0	5	4	0	1	1	0	1	1	3	0	1	0	4	2	6	1
5	0	0	6	1	6	1	3	0	1	0	1	0	0	0	7	0	4	1	5	0
6	0	0	6	2	5	2	1	0	3	1	3	0	3	0	1	0	1	0	4	0
7	0	0	5	0	8	1	3	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	2	0	1
8	0	0	12	1	7	1	3	0	3	0	3	0	5	0	11	1	1	0	0	0
9	0	0	3	0	2	2	3	0	-	-	-	-	1	1	0	2	4	1	1	0
10	0	0	2	2	8	2	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	-	-
11	0	0	2	1	6	0	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	-	-
12	0	1	3	0	7	0	6	0	-	-	-	-	-	-	-	-	7	2	-	-
13	0	1	8	2	11	1	5	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	0	0	3	1	4	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	0	0	7	1	6	0	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	0	0	7	1	7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	1	0	6	2	8	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	0	0	6	0	14	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	0	0	5	0	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	0	0	8	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>MÉDIA</b>	<b>0,043</b>	<b>0,13</b>	<b>5,4</b>	<b>0,9</b>	<b>7,3</b>	<b>1,6</b>	<b>2,6</b>	<b>0,33</b>	<b>1,5</b>	<b>0,125</b>	<b>1,5</b>	<b>0,25</b>	<b>2</b>	<b>0,44</b>	<b>3,22</b>	<b>0,55</b>	<b>3,16</b>	<b>1</b>	<b>4,2</b>	<b>0,55</b>

\*H- Hiperplasia

\*N – Nódulo

GRUPO 1 (G1)- controle só cigarro

GRUPO 2 (G2)- uretana + cigarro

GRUPO 3 (G3)- só uretana

GRUPO 4 (G4)- beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 5 (G5)- beta caroteno 0,05 + uretana + cigarro

GRUPO 6 (G6)- beta caroteno 0,005% + uretana + cigarro

GRUPO 8 (G8)- beta caroteno 0,25% + uretana

GRUPO 7 (G7)- alfa tocoferol 0,25% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 10 (G10)- alfa tocoferol 0,05% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

GRUPO 11 (G11)- alfa tocoferol 0,005% + beta caroteno 0,25% + uretana + cigarro

**NÚMERO DE NÓDULOS E HIPERPLASIAS**  
**ESTUDO DOSE RESPOSTA**

Animal	Microscopia											
	ESTUDO DOSE RESPOSTA 2						ESTUDO DOSE RESPOSTA 1					
	G2		GDR2,5		G3		GDR 0		GDR 30		GDR 60	
	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H	N	H
1	1	0	3	0	7	1	1	1	1	0	0	0
2	4	1	3	0	8	3	3	1	1	0	0	0
3	4	1	7	1	6	3	4	0	0	0	2	2
4	4	0	5	2	5	4	1	0	1	0	2	1
5	6	1	1	0	6	1	3	1	0	0	2	0
6	6	2	4	1	5	2	2	0	0	0	1	0
7	5	0	3	4	8	1	1	0	2	0	0	0
8	12	1	2	0	7	1	0	0	0	0	2	1
9	3	0	9	0	2	2	0	0	3	0	1	1
10	2	2	-	-	8	2	0	0	1	0	3	2
11	2	1	-	-	6	0	0	2	0	0	1	0
12	3	0	-	-	7	0	3	0	1	0	0	0
13	8	2	-	-	11	1	1	0	1	0	0	1
14	3	1	-	-	4	1	3	0	1	1	0	0
15	7	1	-	-	6	0	0	0	0	0	4	1
16	7	1	-	-	7	1	0	1	-	-	0	0
17	6	2	-	-	8	7	1	0	-	-	0	0
18	6	0	-	-	14	0	-	-	-	-	-	-
19	5	0	-	-	6	1	-	-	-	-	-	-
20	8	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>MÉDIA</b>	<b>5,4</b>	<b>0,9</b>	<b>4,11</b>	<b>0,89</b>	<b>2,6</b>	<b>0,33</b>	<b>1,35</b>	<b>0,35</b>	<b>0,86</b>	<b>0,07</b>	<b>1,06</b>	<b>0,53</b>

\*H- Hiperplasia

\*N – Nódulo

GRUPO GDR 0 – só uretana (60 dias)

GRUPO GDR 30 – uretana + cigarro (30 dias)

GRUPO GDR 60 - uretana + cigarro (60 dias)

GRUPO 2 (G2)- uretana + cigarro (120 dias)

GRUPO GDR 2,5 – uretana + cigarro (60 dias) + observação (60 dias)

GRUPO 3 (G3)- só uretana (120 dias)

**ANEXO V**  
**ÁREA DOS NÓDULOS**

**GRUPO 2 (CIGARRO + URETANA)**

<b>Animal</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Nódulo 1	17379,85	129193,7	153626,5	353007,2	356006,7
Nódulo 2	-	62472,18	82460,59	91768,55	47818,15
Nódulo 3	-	355957,9	-	-	42778,74
Nódulo 4	-	41292,49	-	-	215613,5
Nódulo 5	-	-	-	-	558494,1

Área dos nódulos ( $\mu\text{m}^2$ )

**GRUPO 3 (SÓ URETANA)**

<b>Animal</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Nódulo 1	1336272	166310	436348,1	126858,7	17680,23
Nódulo 2	25008,38	121463,2	746660,6	254339,3	138667,9
Nódulo 3	43853,07	663075,8	260338,4	57351,01	98271,6
Nódulo 4	168139	476195,7	441296,6	152208,5	-
Nódulo 5	-	-	145508,3	398280,7	-
Nódulo 6	-	-	146867,9	-	-
Nódulo 7	-	-	157445,5	-	-

Área dos nódulos ( $\mu\text{m}^2$ )

**GRUPO 4 (BETA CAROTENO 0,25% + URETANA + CIGARRO)**

<b>Animal</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Nódulo 1	174436,8	185746,1	83950,62	317171,2	15172108
Nódulo 2	3025655	60820	298350,9	197494,3	96521,87
Nódulo 3	-	411053,2	583514	-	476266,2
Nódulo 4	-	407651,3	912903,5	-	-
Nódulo 5	-	1219692	402688,6	-	-

Área dos nódulos ( $\mu\text{m}^2$ )



**GRUPO 5 (G5)- BETA CAROTENO 0,05 + URETANA + CIGARRO**

<b>Animal</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Nódulo 1	3901106	83578,72	84156,09	47303,76	1159732
Nódulo 2	595592,1	-	-	381807,7	165774,7
Nódulo 3	96613,32	-	-	337040,1	55018,26

Área dos nódulos ( $\mu\text{m}^2$ )**GRUPO 6 (G6)- BETA CAROTENO 0,005% + URETANA + CIGARRO**

<b>Animal</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Nódulo 1	313946	525505,3	3133102	115525,7	111177,4
Nódulo 2	47396,19	325139,5	214146,5	370774,5	388678,6
Nódulo 3	511763,5	38350,63	-	-	204129,2
Nódulo 4	716616,4	279719,6	-	-	1078897
Nódulo 5	-	122761,8	-	-	65225,87

Área dos nódulos ( $\mu\text{m}^2$ )**GRUPO 7 (G7)- ALFA TOCOFEROL 0,25% + BETA CAROTENO 0,25% + URETANA + CIGARRO**

<b>Animal</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Nódulo 1	510513,6	660563,9	945276,6	181021,7	213249,7
Nódulo 2	158837,9	255601,3	593342,5	97550,94	218386,2
Nódulo 3	-	-	-	-	56479,24
Nódulo 4	-	-	-	-	239767,4
Nódulo 5	-	-	-	-	468581

Área dos nódulos ( $\mu\text{m}^2$ )

**GRUPO 8 (G8)- BETA CAROTENO 0,25% + URETANA**

<b>Animal</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Nódulo 1	557274,8	128831,2	339881,1	424374,3	984660,9
Nódulo 2	78179,55	167376	478451,5	-	215682,4
Nódulo 3	36029,41	-	217170,3	-	154863,5
Nódulo 4	100884,3	-	1225036	-	7389082
Nódulo 5	39649,17	-	436055,5	-	391580,6
Nódulo 6	-	-	987658	-	2775302
Nódulo 7	-	-	946872	-	-

Área dos nódulos ( $\mu\text{m}^2$ )**GRUPO 10 (G10)- ALFA TOCOFEROL 0,05% + BETA CAROTENO 0,25% + URETANA + CIGARRO**

<b>Animal</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Nódulo 1	420417,6	410687,4	1070392	721652,2	290797,1
Nódulo 2	585660,7	265319,3	69064,78	104007	216076,8
Nódulo 3	831708,6	703868,3	409870,4	86809,94	131967,7
Nódulo 4	374894	323237,3	126108,8	181795,5	-
Nódulo 5	141722,3	627032,5	-	-	-

Área dos nódulos ( $\mu\text{m}^2$ )**GRUPO 11 (G11)- ALFA TOCOFEROL 0,005% + BETA CAROTENO 0,25% + URETANA + CIGARRO**

<b>Animal</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Nódulo 1	482225,3	359756,1	1760786	158073,5	83343,91
Nódulo 2	322669,6	928645	1625557	99832,34	64875,05
Nódulo 3	623039,2	98009,45	577497,3	302521	61361,01
Nódulo 4	223094	345282,7	583947,6	44350,25	-
Nódulo 5	198372,2	1041738	495814,7	41763,74	-

Área dos nódulos ( $\mu\text{m}^2$ )

**ANEXO VI**  
**ANÁLISE MORFOMÉTRICA – CONTAGEM DE PONTOS**

**GRUPO G2 (URETANA+ CIGARRO)**

<b>Animal</b>	<b>%núcl</b>	<b>%cito</b>	<b>%estr</b>	<b>Fração nuclear</b>	<b>Fração citoplasmática</b>	<b>Relação núcleo/citoplasma</b>	<b>Fração estromal</b>
G2R3	50	41,66	8,33	0,54	0,45	1,2	0,09
G2R6	54,02	34,26	11,71	0,61	0,39	1,6	0,14
G2R9	52,98	37,81	9,2	0,58	0,41	1,45	0,1
G2R12	38,94	50,27	10,77	0,43	0,56	0,79	0,12
G2R15	45,9	46,03	8,06	0,5	0,45	1,03	0,09

**GRUPO G3 (SÓ URETANA)**

<b>Animal</b>	<b>%núcl</b>	<b>%cito</b>	<b>%estr</b>	<b>Fração nuclear</b>	<b>Fração citoplasmática</b>	<b>Relação núcleo/citoplasma</b>	<b>Fração estromal</b>
G3R3	52,89	40,92	6,17	0,56	0,43	1,34	0,07
G3R6	49,80	46,33	3,86	0,52	0,48	1,13	0,041
G3R10	54,15	41,26	4,58	0,56	0,43	1,36	0,049
G3R12	54,88	42,25	2,86	0,56	0,43	1,36	0,03
G3R15	53,37	44,08	2,54	0,55	0,45	1,25	0,026

**GRUPO G4 (BETA-CAROTENO 0,25% + CIGARRO + URETANA)**

<b>Animal</b>	<b>%núcl</b>	<b>%cito</b>	<b>%estr</b>	<b>Fração nuclear</b>	<b>Fração citoplasmática</b>	<b>Relação núcleo/citoplasma</b>	<b>Fração estromal</b>
G4R7	42,97	52,19	4,83	0,45	0,54	0,84	0,05
G4R8	42,97	54,53	2,49	0,44	0,56	0,81	0,02
G4R10	45,17	47,43	7,38	0,48	0,51	0,99	0,08
G4R12	45,37	46,5	8,12	0,49	0,5	1,01	0,09
G4R13	49,89	45,36	4,74	0,52	0,47	1,17	0,05

**GRUPO G5 (BETA-CAROTENO 0,05% + CIGARRO + URETANA)**

<b>Animal</b>	<b>%núcl</b>	<b>%cito</b>	<b>%estr</b>	<b>Fração nuclear</b>	<b>Fração citoplasmática</b>	<b>Relação núcleo/citoplasma</b>	<b>Fração estromal</b>
G5R1	45,77	44,2	10,02	0,5	0,49	1,11	0,11
G5R4	36,89	33,06	30,04	0,52	0,47	1,11	0,42
G5R5	32,02	43,44	24,53	0,42	0,57	0,73	0,32

**GRUPO G7 (ALFA-TOCOFEROL 0,25% + BETA-CAROTENO 0,25% + CIGARRO + URETANA)**

<b>Animal</b>	<b>%núcl</b>	<b>%cito</b>	<b>%estr</b>	<b>Fração nuclear</b>	<b>Fração citoplasmática</b>	<b>Relação núcleo/citoplasma</b>	<b>Fração estromal</b>
G7R1	44,5	31,3	24,19	0,58	0,41	1,41	0,33
G7R3	50,32	19,65	30,02	0,72	0,28	2,63	0,43
G7R6	39,48	32,99	27,52	0,54	0,45	1,21	0,38

**GRUPO G10 (ALFA-TOCOFEROL 0,05% + BETA-CAROTENO 0,25% + CIGARRO + URETANA)**

<b>Animal</b>	<b>%núcl</b>	<b>%cito</b>	<b>%estr</b>	<b>Fração nuclear</b>	<b>Fração citoplasmática</b>	<b>Relação núcleo/citoplasma</b>	<b>Fração estromal</b>
G10R3	47,35	38,39	14,25	0,55	0,44	1,3	0,17
G10R4	47,19	44,66	8,14	0,51	0,48	1,07	0,09
G10R5	40,22	54,73	5,04	0,42	0,57	0,74	0,05
G10R9	36,91	57,45	5,63	0,39	0,6	0,66	0,06
G10R12	51,63	42,6	5,76	0,55	0,45	1,38	0,06