



CARCINOGENESE EXPERIMENTAL NA BEXIGA URINÁRIA DE RATOS SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO AO TABACO



José Alexandre Colli Neto; André Del Negro; José Hélio Zen Jr.; Amilcar Castro de Mattos; Priscila Zubioli; Alfio José Tincani;

Laboratório de Cirurgia Experimental, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, CEP 13083-887, Campinas, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

TABAGISMO

O tabagismo está associado a várias doenças, sendo responsável por aproximadamente 5 milhões de mortes ao ano no mundo e cerca de 200.000 no Brasil.¹ É considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2003) a maior causa de morte evitável. (Castro *et al.*, 2007) Muitas doenças são provocadas pelo hábito de fumar e isto se deve porque as patologias relacionadas ao tabaco costumam demorar algum tempo para serem notadas, o que tem estimulado certa negligência em relação aos seus riscos.

Se as tendências atuais forem seguidas, em 2030, a mortalidade chegará a 10 milhões de pessoas, sendo que metade dos indivíduos estará em idade produtiva. No caso do câncer de pulmão, tal hábito aumenta em 22 vezes as chances de óbito em comparação aos não fumantes. Além disso, 90% dos casos de câncer de pulmão estão ligados ao uso do cigarro. (Spada *et al.*, 2006)

Muitos estudos provaram que o uso do tabaco pode causar diversas doenças diferentes, dentre elas problemas cardiovasculares, câncer do trato aerodigestivo superior e doenças crônicas obstrutivas do pulmão. Dentre as mortes por problemas cardiovasculares, 45% dos infartos de miocárdio são causados pelo uso do tabaco. Grande parte dos enfisemas pulmonares (85%), dos acidentes vasculares cerebrais (25%) e das mortes por câncer (30%) está ligada ao hábito de fumar.² Dos casos de morte por câncer, só relacionado ao câncer de pulmão, 87% são fumantes. Quanto a doenças cardiovasculares, o hábito aumenta em 70% as chances de complicações. Mulheres que fumam 40 ou mais cigarros por dia têm uma probabilidade 74% maior de morrer de câncer de mama. Além disso, bebês de mulheres fumantes podem apresentar mais doenças do que as de não fumantes.³

Dentre as substâncias químicas que compõem o cigarro temos a nicotina, cotidina, carboxihemoglobina, tiocinato, cádmio, chumbo, benzopirina, arsênico, beta-naftilamina, benzina e amônia. Dentre os gases emitidos temos o monóxido de carbono, acetaldeído, metanol e óxidos de nitrogênio. A nicotina está associada ao baixo-peso de recém-natos e à infertilidade. (Fonseca *et al.*, 2001) A associação de tais substâncias tem mostrado que fumantes costumam ser mais extrovertidos, tensos, ansiosos, depressivos, impulsivos e com mais traços de neuroticismo, psicoticismo, hostilidade, tendências a comportamentos anti-sociais, não-convencionais, de risco, busca de novidades e indícios de distúrbios do humor em comparação a não-fumantes e ex-fumantes. (Rondina *et al.*, 2005)

Embora os resultados obtidos em muitas pesquisas envolvam uma taxa de amostragem significativa, tais dados podem ser contestados. Para que se tenha uma maior certeza quanto aos resultados, deveria ser feita uma pesquisa com maior abrangência sócio-geográfico-cultural.

CÂNCER DE BEXIGA

O câncer de bexiga é uma neoplasia que costuma se desenvolver a partir das células transicionais do urotélio. Dos casos diagnosticados, 90% são carcinomas de células transicionais (nas três camadas externas do órgão) e, dentre eles, 75% são superficiais. Apenas 5 a 8% dos casos são do tipo carcinoma de células escamosas (espinocelular) que podem invadir camadas mais profundas e apenas 2% são adenocarcinomas, que apresentam maior potencial local de invasão local. É o segundo tipo mais comum de câncer na região genital. Em casos mais avançados podem invadir a parede externa da bexiga e atingir outros órgãos. Como o epitélio que recobre a bexiga e parte da uretra é o mesmo, os tumores que se desenvolvem nessas estruturas têm características muito semelhantes. (Martín *et al.*, 2004) Para reduzir o risco de morte pela doença, o diagnóstico precoce é muito importante.⁴

O carcinoma de bexiga é uma neoplasia de baixa frequência. Esse tipo de tumor tende a crescer rapidamente, de maneira invasiva sendo, inclusive, recorrente. (Salido *et al.*, 2004) Tal neoplasia é três vezes mais comum em homens que em mulheres, e essa origem da diferença entre os sexos é desconhecida. (Boorjian *et al.*, 2004). É uma patologia multifocal e diversas teorias tentam explicar esse comportamento. Os índices de recorrência são de 40 a 80% em dois anos após tratamentos convencionais. Estudos citogenéticos têm levado à conclusão de que tumores sincrônicos ou metacrônicos de bexiga são derivados de focos de micrometástases que migrariam de um sítio de origem (teoria monoclonal). (Dornelas *et al.*, 2006) A invasão de vasos linfáticos e sanguíneos na lâmina própria, o elevado grau do tumor e a multifocalidade são fatores tradicionalmente explorados como responsáveis pela maior agressividade nas lesões superficiais. (Boorjian *et al.*, 2004)

Evidências mostram que as disfunções cancerígenas do trato urinário estão diretamente relacionadas com a isquemia e hipóxia da musculatura lisa vesical (Bratslavsky *et al.*, 2003).

Dentre os sintomas temos a hematúria, dor abdominal baixa, irritação da bexiga, febre e perda de peso.

O tratamento se baseia na combinação de cirurgia, radioterapia, quimioterapia e/ou imunoterapia.

ARELAÇÃO DO CÂNCER DE BEXIGA COM O CIGARRO

A literatura não possui dados ou estudos que confirmem relação do câncer de bexiga com o hábito de fumar. Contudo, muitos dos dados sobre o assunto são usados a partir desses poucos relatos.

Sabe-se que o tabagismo é o maior fator de risco para o câncer de bexiga, embora só a metade dos pacientes com câncer de bexiga seja fumante. Os fumantes têm um risco de câncer de bexiga de duas a quatro vezes maior que os não-fumantes.⁵

O EFEITO DO TABACO EM COBAIAS

Todas as fases da reprodução humana são afetadas pelo tabagismo. Tal efeito se evidencia desde a gametogênese à lactação e, inclusive, no crescimento intra-uterino (Lieberman *et al.*, 1994).

No caso dos animais A gestação é afetada pelo contato com a nicotina, já que se tem liberação de catecolaminas, que resulta em vasoconstrição materna e fetal crônica. Com isso, temos um quadro de hipóxia fetal (Lymeropoulou *et al.*, 1996).

Pode-se observar, também, redução do ganho ponderal, ou até mesmo perda de peso após o contato com a nicotina (Schechter *et al.*, 1976). Além disso, a falta da substância levou a um ganho de peso ou equiparação aos animais controle. A relação do tabagismo com o peso corporal está relacionada à ação anorética da nicotina, a diferença na qualidade e quantidade dos alimentos ingeridos pelos fumantes e com o aumento da taxa metabólica, com maior gasto pelos fumantes (Mello *et al.*, 2006).

Animais submetidos à Terazosina tiveram os efeitos deletérios, causados pela nicotina, diminuídos. Tal substância propicia o a necrose em retallo cutâneo desses animais, dentre outros fatores devido a vasoconstrição (Fonseca *et al.*, 2004).

A liberação de dopamina nos circuitos mesolímbocorticais é estimulada pelo uso da nicotina em animais. Com isso, tem-se um aumento da atividade neurofisiológica dos neurônios dopaminérgicos nas áreas tegmentares ventrais, assim como uma regulação direta nas áreas de proteção. Frente a isso, constatou-se lesões no trato dopaminérgico mesencefálico em animais expostos a nicotina (Arriaga *et al.*, 2007).

Sendo assim, fica claro que a nicotina é nociva ao organismo de animais. Por isso, a relação do uso de tal substância com neoplasias em bexigas é de grande importância, frente ao seu acometimento generalizado no organismo.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As atividades foram desenvolvidas conforme cronograma proposto tendo sido aprovada pelo comitê de ética em experimentação animal. A fase piloto foi supervisionada pelos orientadores durante duas semanas, iniciando as simulações programadas da exposição à fumaça.

No início da exposição à fumaça, substituiu-se o sistema para um de maior efetividade na queima dos cigarros com maior sensibilização dos animais à simulação do tabagismo.

O novo sistema (Anexo 1, imagens 1, 2, 3 e 4) é composto por um tanque de ar comprimidos que pressuriza a câmara através de um conduto de ar "A". Dentro da câmara é colocado o cigarro já aceso com a extremidade do filtro conectada ao conduto de ar "B" que leva a fumaça diretamente à câmara de exposição, obtendo-se um significativo aumento na quantidade de fumaça produzida e inalada pelos animais (Anexo 1, Imagem 3).

A aferição da concentração de monóxido de carbono dentro da câmara de exposição foi realizada em dias aleatórios com o aparelho ToxiPro[®], da empresa Biosystems.

Na primeira semana de exposição, três animais morreram por intoxicação devido ao monóxido de carbono, contudo os mesmos foram substituídos e tiveram o mesmo tempo de exposição. Optou-se então pela diminuição da exposição à fumaça, dando continuidade ao tratamento com apenas oito cigarros por dia.

Após a alteração da exposição, não se perdeu mais nenhum animal. Nesse meio tempo foram realizadas hemoximetrias de animais para controle e checagem da efetividade da simulação de tabagismo, com resultados descritos abaixo.

Dando seguimento ao cronograma foi realizada a dissecação dos animais eutanasiados, sendo realizada a fixação e a elaboração dos blocos de parafina seguida de confecção das lâminas que foram encaminhadas à patologista.

MATERIAIS E MÉTODOS

Quarenta ratos machos jovens da raça Wistar pesando entre 300 e 400g, escolhidos aleatoriamente, serão estudados. Os animais serão acondicionados em gaiolas revestidas com maravalha e mantidos no Núcleo de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da UNICAMP. Água será oferecida *ad libitum* para todos os animais.

Cada animal receberá uma numeração própria, marcada com caneta hidrográfica na cauda.

Os animais serão divididos em dois grupos.

O **grupo I** (caixas 1, 2, 3 e 4) composto por vinte animais submetidos cinco vezes por semana à inalação de fumaça de cigarro por exposição direta em câmara de fumaça.

O **grupo II** (caixas 7 e 8) composto por dez animais submetidos cinco vezes por semana à aplicação de água filtrada na via aérea superior, servindo como grupo controle deste estudo.

A aplicação, no grupo II será feita com pincel comum número 1 de cerdas macias, usando-se afastadores atraumáticos para exposição direta da mucosa da via aérea superior dos ratos.

Não houve necessidade de anestesia, pois o procedimento não causou maior desconforto para os animais.

Amostras sanguíneas serão coletadas periodicamente para análise em um hemoxímetro.

Os animais serão submetidos a aplicações seriadas por período de seis meses, durante os quais receberão dieta com ração padrão e seus pesos serão monitorados mensalmente.

Após o período de exposição, os ratos serão eutanasiados por prolongamento anestésico com hidrato de cloral endovenoso em dose letal de dois mililitros (2ml) por quilograma de peso.

Os espécimes para estudo serão obtidos a partir de dissecação da mucosa de risco, removendo-se as peças *in toto*, isto é, semelhante ao procedimento cirúrgico realizado em humanos.

Os espécimes serão fixados em formalina por 24 horas e, em seguida, armazenados em solução de álcool 70%.

Cortes seriados serão preparados em lâminas a partir dos espécimes corados com hematoxilina e eosina e fixados em parafina.

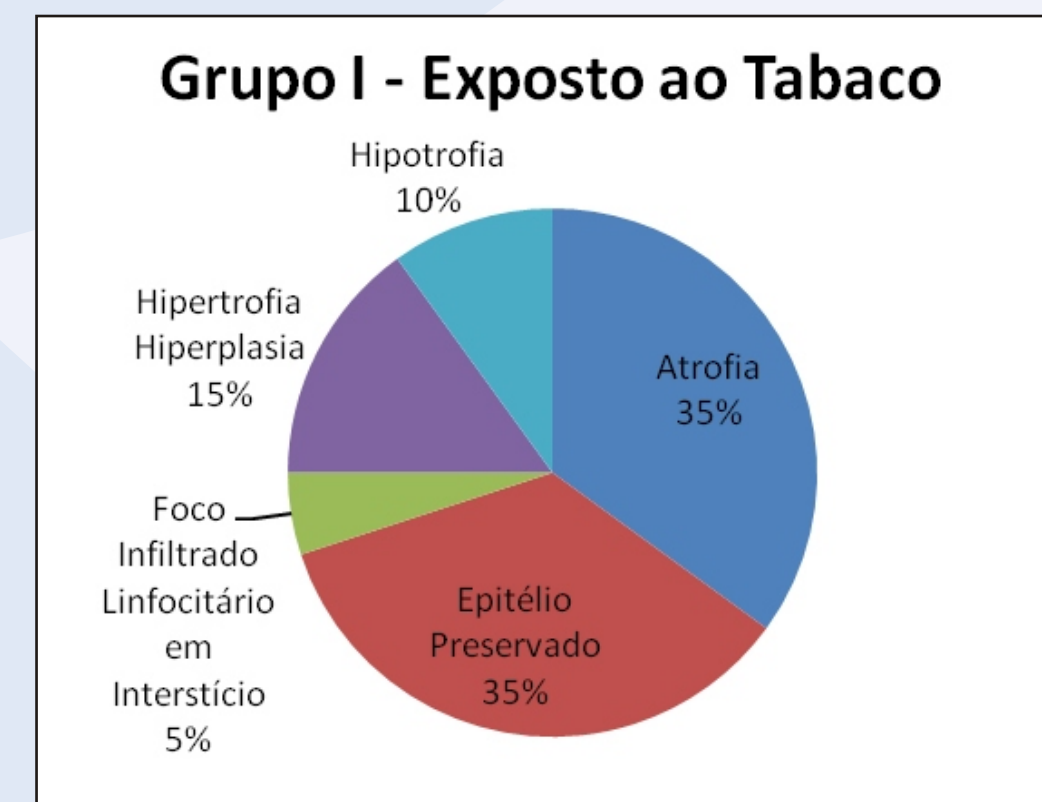
Posteriormente serão analisados por patologista experiente de forma cega, que avaliará a incidência, extensão e grau de invasão das neoplasias malignas quando presentes.

O experimento avaliará a ação dos agentes carcinógenos presentes no tabaco sobre a mucosa da bexiga.

RESULTADOS

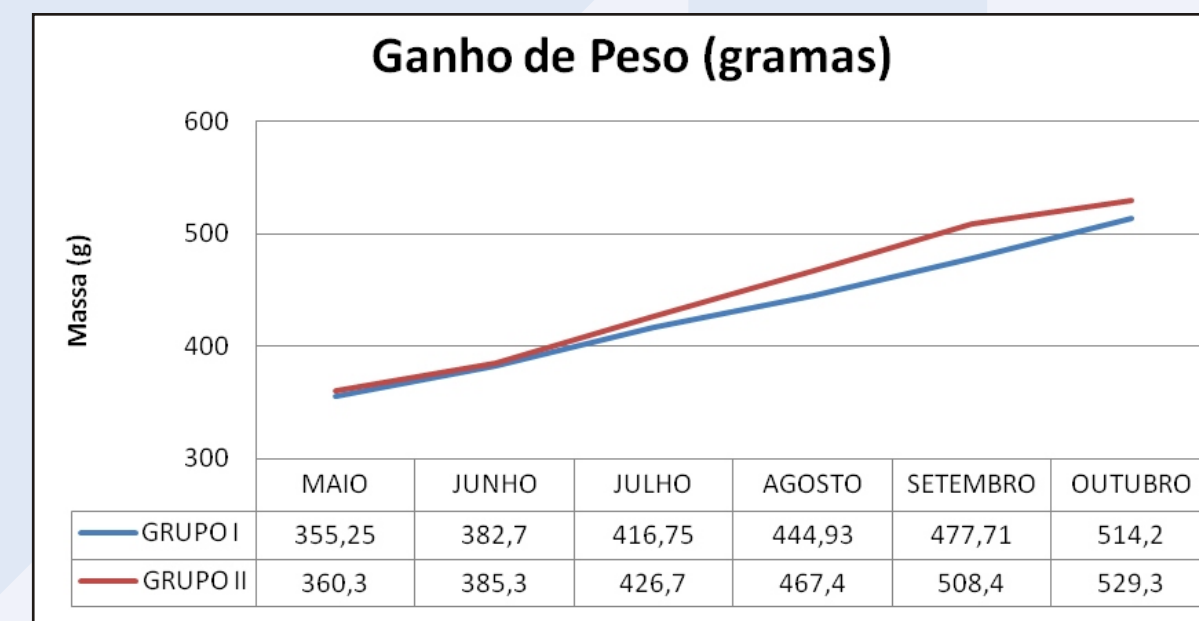
Os resultados da histologia revelaram atrofia, hipoplasia e hiperplasia associada com hipertrofia do epitélio da bexiga urinária dos animais analisados. Em alguns casos, tais resultados apresentaram hipertrofia moderada da camada muscular do órgão. Tais alterações não se mostraram acentuadas em nenhum dos parâmetros, mostrando que as alterações encontradas estão dentro do esperado. Isso, porque a técnica de preparo das lâminas pode causar a atrofia e as alterações de trofia e plasia são esperadas ao longo da vida do animal. Tal fato pode ser evidenciado na análise do grupo controle.

Nesse grupo, 50% das amostras apresentaram atrofia e o restante hipertrofia com hiperplasia do epitélio da bexiga sem alterações grosseiras. Tendo isso em vista, a distribuição das amostras ficou da seguinte forma:



Em relação às massas dos animais podemos perceber um maior ganho de peso do GRUPO II (controle) em relação ao GRUPO I de 14,3 g, em média. Tal ganho não mostra discrepância suficiente para se dizer que a exposição ao fumo foi determinante nessa diferença.

Contudo, ao analisarmos o exame de sangue, podemos perceber um aumento significativo nos índices de HbCO para os animais expostos a 10 minutos à fumaça. Tal fato pode ser notado, também para a metahemoglobina para o mesmo índice.



DISCUSSÃO

A atividade foi desenvolvida no prazo proposto, sendo um trimestre de treinamento, dois de exposição dos animais ao tabaco e o último para análise dos dados. A experimentação animal foi desenvolvida com o compromisso de cumprir uma rotina para diminuir as interferências externas. Para isso, o horário de exposição ao tabaco foi seguido com pontualidade e assiduidade. A manipulação dos animais foi realizada com higiene e pelas mesmas pessoas. Assim como o controle do sistema que injetava a fumaça do cigarro na câmara de exposição.

O experimento mostrou que não houveram indícios significativos para se afirmar que a exposição ao tabaco predisponha a neoplasia em bexiga urinária. Contudo, deve-se levar em consideração a forma como foi realizada, já que há alguns parâmetros suscetíveis à alteração, tais como: concentração da fumaça a que os animais foram expostos, número de dias de exposição e tempo de exposição diária. Sendo assim, não se pode afirmar que a exposição à fumaça do cigarro não é danosa à bexiga urinária.

DIFICULDADES

Conforme descrito, faríamos o uso do aparelho ToxiPro[®] da empresa Biosystems para dosar a concentração de dióxido de carbono à que os animais foram expostos. Todavia, esse aparelho notificava uma mensagem de erro por não conseguir realizar tal medida. Tal fato inviabilizava uma análise adequada da concentração dos gases na câmara em que os ratos ficam em exposição, o que pode prejudicar o resultado do trabalho. Isso, porque se a concentração não for adequada, os animais podem ser intoxicados e morrerem prematuramente. Contudo, ao passar dos 6 meses não houveram mais perdas, já que ao invés de utilizar dez cigarros por dia passou-se a utilizar oito.

Dessa forma, o comportamento dos animais se mostrou mais ativo durante a exposição, diferente do que ocorria durante a exposição inicial. Com a falta do recurso de avaliação da concentração do ar, o trabalho pode ter problemas para cumprir o prazo, se a concentração for extremamente tóxica a ponto de levar alguns animais à óbito.

PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE OU DESDOBRAMENTO DO TRABALHO

O presente trabalho foi concluído, ao mesmo tempo, do trabalho de doutoramento do Dr. André Del Negro.



Imagem 1 - Detalhe: Câmara pressurizada de queima do cigarro.



Imagem 2 - Fluxo de fumaça obtido com 10 litros/min de fluxo de ar comprimido.

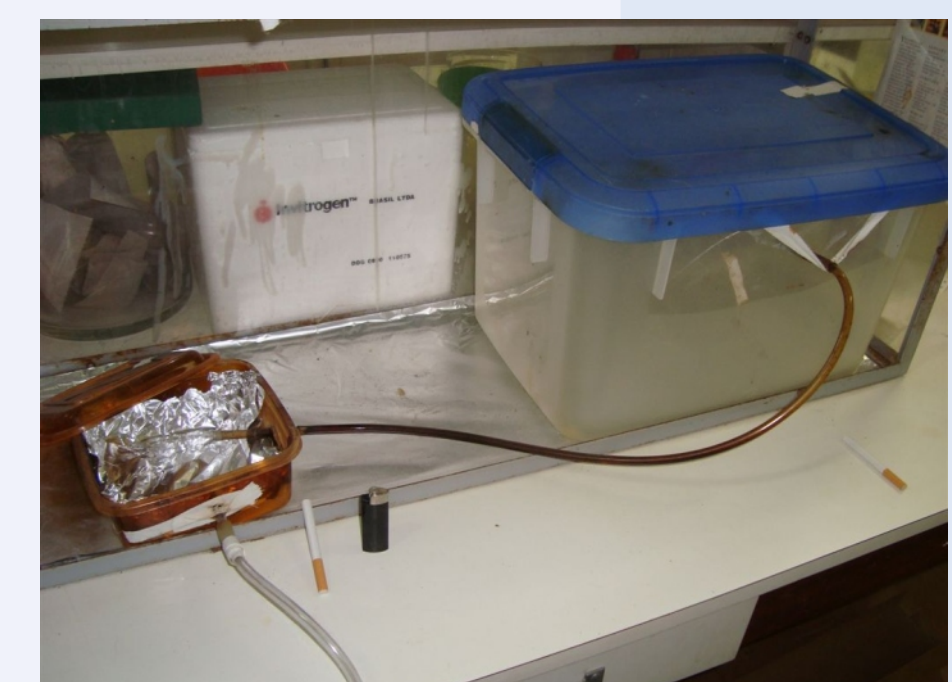


Imagem 3 - Detalhe de: Câmara pressurizada e câmara de exposição

BIBLIOGRAFIA

- 1- Arriaga EE, Bautista OP, Venegas AR, Sansores RH. Efecto del daño de vías dopaminérgicas mesencefálicas en la conducta adictiva al tabaco. 2007; 20(1)
- 2 - Boorjian S, Ugras S, Mongan NP, Gudas LJ, You X, Tickoo SK, Scherr DS. Androgen receptor expression is inversely correlated with pathologic tumor stage in bladder cancer. Int. Braz J Urol 2004; 30(6)
- 3 - Bratslavsky G, Kogan BA, Matsumoto S, Asan AR, Levin RM. Reperfusion injury of the rat bladder is worse than ischemia. Int. Braz J Urol. 2003; 29(5)
- 4 - Castro MdAg, Oliveira MdAs, Moraes JFD de, Miguel AC, Araújo RB. Qualidade de vida e gravidade da dependência de tabaco. Revista de Psiquiatria Clínica 2007; 34(2)
- 5 - Dornelas CA, Almeida PRCds, Nascimento GLDc, Lima EB, Moraes MO. Experimental model of Walker 256 carcinosarcoma in rats bladder. Acta Cir. Bras. 2006; 21(1)
- 6 - Fonseca AMda, Junqueira PMdaA, Poljak JOM, Rev. Assoc. Med. Bras. 2001; 47(3)
- 7 - Fonseca AV, Ferreira LM, Gomes HC, Peracino S. Terazosina e propranolol como bloqueadores do efeito deletério da nicotina em um retallo cutâneo randômico, no rato. Acta Cirurgica Brasileira. 2004; 19(3)
- 8 - Garcia NA, Garin JAL, Morales Edel, Sánchez DC, Gall OB, Gelabert A. Cistectomy in superficial bladder tumours: Analysis of criterion include and prediction factors. Actas Urol Esp 2003; 27(5)
- 9 - Lieberman E, Gremy J, Lang JM, Cohan AP. Low birthweight at term and the timing of fetal exposure to maternal smoking. Am J Public Health. 1994; 84(7):1127-31
- 10 - Lymeropoulou A, Hainaut F, Crimal PM, Durand JL, Locatelli C, Malson C. Tabac et grossesse: recherche d'une corrélation cotinine/mes et Drooper. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris). 1996; 25(8):824-7
- 11 - Martin JAP, Velázquez MAR, Baños JLG, Gómez MC, Rodríguez RH, Schaan JdeV, Edreira AR, Castriello AH, Izquierdo FR, Tubet CA. Upper urinary tract tumours. Actas Urol Esp 2004; 28(1)
- 12 - Mello RB, Okay TS, Botelho C. Influência da exposição a fumaça lateral do cigarro sobre o ganho de peso e o consumo alimentar de ratas gestantes: análise do peso e do comprimento dos filhotes ao nascimento. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. 2006; 28(3)
- 13 - Spada C, Tzvetzger A, Souza MA. Prevalência do tabagismo em doadores de sangue da região serrana de Santa Catarina - Brasil. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 2006; 28(1)
- 14 - Rondina RdC, Gorayeb R, Botelho C, Silva AMG da. Um estudo comparativo entre características de personalidade de universitários fumantes, ex-fumantes e não-fumantes 2005; 27(2)
- 15 - Salido EA, Sorias PT, Espejo MAP, Corchero JR, Lopez RAM, Outeirino JMP. Carcinoma vesical: análisis de nuestra serie y revisión de la literatura. Actas Urol Esp 2004; 28(4)
- 16 - Schechter MD, Cook PG. Nicotine-induced weight loss in rats without an effect on appetite. Eur J Pharmacol. 1976; 38(1):63-9
- 1 - <http://www.inca.gov.br/tabagismo/framset.asp?Item=dadosnum&link=brasil.htm> Acessado em: 14/12/2007
- 2 - <http://www.inca.gov.br/englis/tobacco/programatate.pdf> Acessado em: 22/11/2007
- 3 - <http://www.aneas.org/toxicos/fumo.html> Acessado em: 22/11/2007
- 4 - http://www.bladder-cancer-info.com/guide_04.html.asp?gId=O:0:1&a=a&assoc=Google&keyword=bladder-cancer&gclid=CWw_SdRtCFQdAeZTWS6 Acessado em: 17/12/2007
- 5 - <http://www.policlin.com.br/drpoli/085> Acessado em: 17/12/2007

