

BALDOMERO ANTONIO KATO DA SILVA

**ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE APOPTOSE PÓS
INJEÇÃO INTRAPULMONAR DE BENZO[A]PIRENO EM
RATOS *WISTAR***

**CAMPO GRANDE – MS
2011**

BALDOMERO ANTONIO KATO DA SILVA

**ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE APOPTOSE PÓS
INJEÇÃO INTRAPULMONAR DE BENZO[A]PIRENO EM
RATOS *WISTAR***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos

**CAMPO GRANDE – MS
2011**

“O câncer é a tristeza das células”

Jayme Ovalle

**À minha esposa, Ana Rachel, por tudo que representa em “nossa vida”
(singular proposital)...**

Aos meus pais e irmãs, pelas intermináveis lições...

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por permitir-nos usar alguns grãos de sua sabedoria.

“O professor medíocre conta. O bom professor explica. O professor superior demonstra. O grande professor inspira” (William Arthur Ward).

Meus melhores agradecimentos ao **Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos** – orientador deste trabalho, que a seu modo soube instigar questionamentos e, sobretudo, inspirar continuamente a investigação científica.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, pela incalculável contribuição intelectual.

À **Profa. Dra. Iandara Schettert Silva**, pelas intervenções sempre pertinentes. Meu respeito e admiração por todo aprendizado proporcionado.

Ao “irmão” **Daniel Martins Pereira**, pela amizade, presença e auxílio constantes nos momentos mais importantes desta jornada.

A todos colegas de trabalho, pelo apoio e incentivo contínuos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Caracterização do grupo Análise Histológica – HE.....	32
Figura 02: Quantificação de células em apoptose em um campo digitalizado com o software Image ProPlus 4.5.9.29 para o grupo Controle 16 semanas.....	32
Figura 03: Quantificação de células em apoptose em um campo digitalizado com o software Image ProPlus 4.5.9.29 para o grupo 80 mg/kg 16 semanas.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS

B[a]P – Benzo[a]pireno

DNA – Ácido desoxirribonucléico

HAP – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

HE – Hematoxilina e Eosina

MOPM – Permeabilização da Membrana Externa Mitocondrial

TUNEL – TdT mediated dUTP nick end labeling

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	
2.1. CÂNCER DE PULMÃO.....	04
2.1.1. Epidemiologia.....	05
2.1.2. Patogênese.....	06
2.1.3. Diagnóstico.....	08
2.1.4. Tratamento.....	10
2.2. BENZO[A]PIRENO.....	13
2.3. APOPTOSE.....	16
2.4. BIOMARCADORES.....	22
3. OBJETIVOS	
3.1 OBJETIVO GERAL.....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4. MÉTODO	
4.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	28
4.1.1. Preparo Histológico – TUNEL.....	30
4.1.2. Avaliação da Apoptose.....	31
4.1.3 Análise Estatística.....	33
5. RESULTADOS.....	34
6. DISCUSSÃO.....	39
7. CONCLUSÃO.....	43
8. REFERÊNCIAS.....	44

RESUMO

Objetivo: Avaliar a influência da instilação intrapulmonar de Benzo[a]pireno na apoptose pulmonar de ratos *Wistar*. **Métodos:** *Rattus norvegicus albinus*, linhagem *Wistar* machos foram submetidos à instilação intra-pulmonar da diluição em álcool 70% de Benzo[a]pireno (B[a]P). Foram formados três grupos experimentais com 08 animais cada: Grupo Controle (álcool 70%); Grupo B[a]P 40 mg/kg; e Grupo B[a]P 80mg/kg, submetidos a eutanásia 16 e 18 semanas após o procedimento experimental. As secções pulmonares foram processadas pelo método TUNEL e submetidas à análise histomorfométrica para quantificação do número de células apoptóticas. **Resultados:** Após 16 semanas, a média do número de células apoptóticas do grupo controle ($19,3 \pm 3,2$) mostrou-se maior que o grupo 40mg/Kg ($11,8 \pm 1,9$; $p < 0,01$) e 80mg/Kg ($7,0 \pm 1,4$; $p < 0,01$). Diferença significativa foi também observada entre os grupos 40mg/Kg e 80mg/Kg ($p < 0,05$). Após 18 semanas, a média do número de células apoptóticas do grupo controle ($18,0 \pm 2,2$) mostrou-se maior que o grupo 40mg/Kg ($8,8 \pm 1,7$; $p < 0,01$) e 80mg/Kg ($5,5 \pm 1,3$; $p < 0,01$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos 40 e 80mg/Kg (ns). **Conclusão:** A instilação intrapulmonar de Benzo[a]pireno induziu diminuição significativa da atividade apoptótica em tecido pulmonar.

Descritores: Apoptose. Benzo[a]pireno. Carcinogênese. Neoplasias Pulmonares.

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the influence of pulmonary instillation of Benzo[a]pyrene in lung apoptosis of *Wistar* rats. **Methods:** *Male Rattus norvegicus albinus*, *Wistar* lineage was carried through an intra-pulmonary instillation of the Benzo[a]pyrene (B[a]P) dilution in alcohol 70%. Three experimental groups had been formed with 08 animals each: Control Group (Alcohol 70%); B[a]P Group 40 mg/kg; e B[a]P Group 80mg/kg, submitted to euthanasia 16 and 18 weeks after the experimental procedure. The pulmonary sections had been processed by TUNEL method and submitted to the histomorphometric analysis to quantify the apoptotic cell number. **Results:** After 16 weeks, mean of apoptotic cells number in control group (19.3 ± 3.2) was greater than 40mg/Kg group (11.8 ± 1.9 ; $p < 0.01$) and 80mg/Kg group (7.0 ± 1.4 ; $p < 0.01$). Significant difference also observed between 40mg/Kg and 80mg/Kg ($p < 0.05$). After 18 weeks, mean of apoptotic cells number in control group (18.0 ± 2.2) was greater than 40mg/Kg group (8.8 ± 1.7 ; $p < 0.01$) and 80mg/Kg group (5.5 ± 1.3 ; $p < 0.01$). Significant difference wasn't observed between 40mg/Kg and 80mg/Kg (ns). **Conclusion:** Intra-pulmonary instillation of Benzo[a]pyrene induces significant decrease of apoptotic activity in lung tissue.

Key words: Apoptosis. Benzo[a]pyrene. Carcinogenesis. Lung Neoplasms.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão é um dos mais prevalentes tipos de câncer no mundo, e sua mortalidade tem permanecido elevada há muitos anos. A ausência de sintomas nas fases iniciais faz com que a maioria dos pacientes seja diagnosticada em fase metastática da doença, tornando a pesquisa de instrumentos para diagnóstico precoce um grande desafio para otimização da abordagem terapêutica deste tipo de câncer.

Constitui a neoplasia de maior mortalidade nos dias atuais. Segundo o Instituto Nacional de Câncer, apresenta um aumento de 2% ao ano na sua incidência mundial e soma anualmente cerca de 1,2 milhões de novos casos. (BARROS et al., 2006; SANGRAJRANG et. al., 2003)

A maior parte dos casos acomete indivíduos entre 50 e 70 anos de idade e, embora fosse inicialmente uma doença epidêmica entre homens em nações industrializadas, o câncer de pulmão tornou-se uma doença cada vez mais comum entre as mulheres, devido principalmente a aceleração no consumo do tabaco e à difusão do tabagismo na população feminina. Além do tabagismo, outros fatores tradicionalmente aceitos são: presença de doença pulmonar preexistente, exposição ocupacional (asbesto, urânio, cromo, agentes alquilantes, entre outros), história familiar de câncer de pulmão e neoplasia pulmonar prévia. (GUERRA, GALLO, MENDONÇA, 2005, LOPES-GONZALES et. al., 2004, World Health Organization, 2002)

O acúmulo de alterações que ocorrem de forma espontânea ou induzida na estrutura ou expressão de determinados genes tem um papel importante no desenvolvimento do câncer. Essas mutações genéticas ocorrem continuamente e são reparadas pelo mecanismo de defesa celular, que exerce controle sobre o crescimento, a latência e a apoptose celular. A presença de falhas no mecanismo de defesa, herdadas ou geradas por mutações, possibilita a reprodução de clones de células resistentes à indução para a fase de latência, ou à apoptose e ao controle de crescimento, podendo dar origem ao desenvolvimento de neoplasias. (MIRANDA et al., 2003, FONG et al., 2003)

A poluição ambiental e o hábito tabágico são as principais fontes de inalação dos agentes carcinogênicos, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, produtos de combustão incompleta de matéria orgânica difundidos no ambiente. O benzo[a]pireno (B[a]P) é um hidrocarboneto aromático policíclico com extenso poder carcinogênico reconhecido.(AGEN et al., 2001)

O benzo[a]pireno é um elemento químico encontrado no tabaco cuja relação com o desenvolvimento do câncer tem sido mostrada em diversos estudos. Sua concentração ocorre normalmente entre 20 e 40 ng/cigarro e pode levar à formação do tumor por mecanismos multifatoriais. Após iniciadas as reações à sua presença, o B[a]P reage preferencialmente com a ligação guanina nos códons 157, 248 e 273 do gene p53 das células normais do epitélio bronquial, e esta reação tem sido identificada como um ponto chave na mutagênese do câncer de pulmão. (AGEN et al., 2001)

Os efeitos mutagênicos e carcinogênicos do B[a]P tem sido bem documentado em humanos, animais e células sistêmicas de mamíferos. No geral, está entre os mais potentes agentes cancerígenos experimentais conhecidos, levando à formação de metabólitos ativos que causam importantes danos ao DNA. (PEI et al., 1999)

A apoptose ou morte celular programada é um processo altamente organizado para eliminar as células danificadas ou anormais, e ocorre em várias situações fisiológicas e patológicas, representando um mecanismo comum de reposição celular e remodelação tecidual, estando grandemente envolvida na manutenção da homeostase em organismos multicelulares. (TARAPHDAR, ROY, BHATTACHARYA, 2001; CARNEVALI et al., 2003)

Em função da desregulação da apoptose no câncer, estudos que definam o potencial de marcação da apoptose como um fator prognóstico ou preditivo no câncer merecem especial atenção. Adicionalmente, contribui para a cacinogênese pela criação de um ambiente permissivo à instabilidade genética e acumulação de mutações, promovendo resistência à destruição imunológica e levando à desobediência de pontos no ciclo celular que normalmente induziriam à apoptose. (WALASZEK, HANAUSEK, 2000)

A busca por marcadores séricos ou teciduais que permitam o diagnóstico precoce do câncer de pulmão é uma aspiração antiga. Os marcadores tumorais deveriam ser, em tese, produtos tumorais que fossem detectados antes mesmo do desenvolvimento macroscópico do tumor, permitindo a intervenção médica antes do processo de invasão tumoral, angiogênese e disseminação metastática. Ao longo das últimas décadas, vários marcadores tumorais foram descritos e estudados, porém nenhum deles conseguiu alcançar os objetivos propostos, ou seja, detecção precoce e precisa do tumor. (PACHECO, PASCHOAL, CARVALHO, 2002)

A despeito das implicações da relação entre apoptose e câncer, a significância da apoptose como um indicador biológico das neoplasias, especialmente como um fator prognóstico, ainda não está bem estabelecida. Muitas investigações prévias conduzem a resultados contraditórios. Alguns estudos demonstram que altos níveis de apoptose representam um prognóstico ruim, outros demonstram que alta ocorrência de apoptose levam a um bom prognóstico, e outros não demonstram relação da apoptose com o prognóstico do câncer. (TANAKA et al., 1999)

Biomarcadores que definam o grau de risco de pacientes com câncer de pulmão ou nódulos pulmonares poderiam aumentar a capacidade de diagnóstico, complementando os estudos de imagem e reduzindo o tempo de conclusão diagnóstica para as neoplasias pulmonares. (PATZ et al., 2007)

Com base na clara necessidade de estabelecimento da identificação de biomarcadores que possam prover mecanismos diagnósticos e prognósticos do câncer de pulmão, propôs-se este estudo, intencionando-se analisar o grau de apoptose e sua variação secundárias às alterações teciduais induzidas por substância conhecidamente carcinogênica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CÂNCER DE PULMÃO

O câncer de pulmão é considerado a mais comum doença maligna e uma crescente causa global de óbitos. Atualmente o adenocarcinoma é o tipo histológico mais comum em ambos os sexos, raças e todas as faixas etárias, e a despeito dos significantes avanços ocorridos nas últimas décadas no tratamento do câncer de pulmão, a sobrevida dos pacientes persiste pequena. (SHAN et al., 2006; TOH et al., 2007)

Os dois principais tipos histológicos diferenciados do câncer de pulmão são: carcinoma de pequenas células e carcinomas de células não pequenas. O carcinoma de células não pequenas representa cerca de 85% dos casos de câncer de pulmão e apresenta vários subtipos histológicos diferentes, sendo os mais importantes: carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células. (ROSELL et al., 2005; TARON et al., 2005; MILLER et al., 2004)

O prognóstico para ambos os tipos é pobre, sendo a sobrevida global por cinco anos para pacientes com carcinoma de pequenas células em estágio limitado é cerca de 20% e para pacientes com estágio extenso é menor que 1%. Em carcinomas de células não pequenas, a sobrevida global por cinco anos de pacientes em estágio IA é 67% e para pacientes em estágio IIA cai para 55%. Em pacientes no estágio IIIA da doença, apenas 23% sobrevivem por cinco anos após a cirurgia, enquanto em pacientes em estágio IV a sobrevida é menor que 1%. (ROSELL et al., 2005; DOUILLARD et al., 2007)

A classificação do câncer de pulmão baseada em critérios clínicos e histopatológicos tem poder limitado de predição de cura e sobrevivência, e maior esforço deve ser feito na determinação de métodos que possibilitem controle do câncer de pulmão utilizando características moleculares para

caracterização dos tumores e provimento de predição mais acurada do prognóstico e tratamento apropriado. (WANG et al., 2009)

Esforços para aumentar esta sobrevida tem sido fortemente envidados na quimioprevenção, objetivando reduzir a incidência e mortalidade do câncer de pulmão. Atualmente o estadiamento do câncer de pulmão é considerado o mais simples fator prognóstico para predição de sobrevida do paciente. Outros fatores prognósticos potencialmente importantes para o câncer de pulmão incluem perda de peso, estado da funcionalidade, idade e gênero. (GRAY et al., 2007; LEE et al., 2007)

2.1.1. Epidemiologia

O câncer de pulmão continua sendo o tipo de neoplasia maligna com o maior número de mortes em todo o mundo quando são considerados os dois sexos. Aproximadamente 1,2 milhões de novos casos são diagnosticados a cada ano no mundo inteiro, e cerca de 1,1 milhões de pessoas morrem a cada ano pela doença. (SILVA et al., 2008; LYNCH et al., 2004)

Dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Câncer demonstram que o câncer de pulmão é o mais comum de todos os tumores malignos do mundo, apresentando um aumento de 2% ao ano na sua incidência mundial. Em áreas industrializadas observa-se um maior risco de desenvolvimento de câncer de pulmão quando compara-se à população em geral, com presumível envolvimento de substâncias como benzopireno, alcatrão, carbono, benzol, cromo e níquel suspensos na poeira, e outras substâncias carcinogênicas modificadas. (BARROS et al., 2006; MOORE et al., 2009)

A maior parte dos casos acomete indivíduos entre 50 e 70 anos de idade e, embora fosse inicialmente uma doença epidêmica entre homens em nações industrializadas, o câncer de pulmão tornou-se uma doença cada vez mais comum entre as mulheres. O principal fator de risco é o tabagismo, que aumenta o risco de desenvolvimento de neoplasia pulmonar de 10 a 30 vezes.

Outros fatores tradicionalmente aceitos são: presença de doença pulmonar preexistente, exposição ocupacional, história familiar de câncer de pulmão e neoplasia pulmonar prévia. (BARROS et al., 2006)

2.1.2. Patogênese

A principal etiologia do câncer de pulmão é a exposição à fumaça do cigarro. Na Europa e Estados Unidos o câncer de pulmão em pacientes que nunca fumaram é raro (<10% dos casos) e muitos casos nos Estados Unidos são atualmente relatados por ex-tabagistas. Em não fumantes, o câncer de pulmão pode ser causado por gases tóxicos, asbestos ou fatores genéticos. (PAEZ et al., 2004; PAO et al., 2005; NELSON et al., 1999)

Embora a causa predominante do câncer de pulmão seja amplamente conhecida (tabagismo), existem outras causas que somadas ao hábito tabágico incrementam grandemente o risco. A lista de causas ocupacionais do câncer de pulmão em humanos também inclui arsênico, asbestos, cromatos, éter clorometílico, níquel, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, gás radon e outros agentes, dentre eles os carcinogênicos gerados pela queima de combustíveis, grandemente presente em áreas urbanas. (ALBERG, FORD, SAMET, 2007)

Não obstante a observação da predominância de causas ambientais, existe uma substancial variação individual na susceptibilidade aos carcinogênicos respiratórios. O risco para a doença pode ser considerado pela interrelação entre dois fatores: (1) exposição a agente etiológico (ou protetivo), e (2) susceptibilidade individual a este agente. (ALBERG, FORD, SAMET, 2007)

O processo da carcinogênese era descrito, até pouco tempo, como uma progressão ordenada da célula através de três estágios específicos: a iniciação pela exposição a agentes genotóxicos; a promoção tumoral causada pelos agentes que estimulam a célula a se proliferar e se expandir de forma clonal,

produzindo um tumor benigno e a progressão, na qual o acúmulo de danos genéticos adicionais levam à expansão de células iniciadas do tumor benigno o torna maligno. O modelo atualizado pressupõe que o câncer resulta do acúmulo de alterações na estrutura ou expressão de certos genes vitais por mecanismos variados, como mutação pontual induzida pelos aductos de DNA, amplificação gênica, translocação, perda cromossômica, recombinação somática, conversão gênica ou metilação do DNA. No centro deste modelo estariam os oncogenes e os genes supressores de tumor que codificam proteínas importantes para a regulação e controle do ciclo celular. (SANTOS et al., 2008; WANG et al., 2009)

Anormalidade genéticas nas vias de ação do fator de crescimento tem sido identificadas em muitas neoplasias, incluindo câncer de pulmão. Essas mutações resultam em hiperativação do fator de crescimento. Adicionalmente, a expressão anormal do fator de crescimento pelas células cancerígenas desencadeia um processo que promove liberação do fator de crescimento por outras células do estroma tumoral, promovendo processos como a angiogênese tumoral. Um evento importante no desenvolvimento do câncer de pulmão é a perda do controle normal da proliferação celular, causando crescimento excessivo de células anormais. (HODKSON, McKINON, SETHI, 2008)

Fisiologicamente, a proliferação das células do epitélio brônquico é requerida para repor células perdidas no lúmen e para reparar danos epiteliais causados por fatores ambientais. Espécies reativas de oxigênio geradas durante o processo inflamatório podem causar dano no DNA e consequentemente desencadear ou acelerar um processo de carcinogênese. (GRAY et al., 2007)

Aceita-se que a patogênese do câncer de pulmão envolva o acúmulo de várias anormalidade moleculares. Estas alterações levam à aquisição de características celulares que podem ser classificadas em seis eventos funcionais: (a) a auto-suficiência de crescimento, devido às mutações no proto-oncogene; (b) insensibilidade à atividade anti-proliferativa, resultante de mutações que afetem os genes supressores tumorais; (c) desregulação da

apoptose pelo aumento da atividade antiapoptótica ou redução da regulação molecular pró-apoptótica; (d) potencial replicativo ilimitado devido à ativação da telomerase; (e) angiogênese sustentada; (f) capacidade de invasão tecidual e disseminação a locais distantes (metástase). (PANOV, 2005)

O câncer agrega um conjunto de doenças que resultam de uma série de alterações no DNA em uma única célula ou clone da mesma levando a perda da função normal, crescimento aberrante ou descontrolado e, com frequência, a metástases. Vários genes, frequentemente mutados ou perdidos, têm sido identificados e entre eles estão alguns proto-oncogenes e genes supressores de tumor, cujas funções incluem a indução da proliferação celular em situações específicas e a interrupção da proliferação em células danificadas, respectivamente. O padrão de perdas ou mutações é complexo, mas na maioria dos tumores esse evento ocorre em pelo menos um proto-oncogene e um ou mais genes supressores de tumor na célula em questão, resultando em uma proliferação celular descontrolada. (ALBERG, FORD, SAMET, 2007)

2.1.3. Diagnóstico

Os mais comuns sintomas do câncer de pulmão são indisposição, perda de peso e dispnéia. O diagnóstico histológico ou citológico do câncer de pulmão é usualmente obtido pela broncoscopia ou biópsia aspirativa com agulha. (HAN et al., 2005)

A principal razão para a elevada taxa de mortalidade em pacientes com câncer de pulmão é o fato de que os mesmos são diagnosticados em um estágio avançado da doença, quando o tratamento raramente resulta em sucesso. (PHILLIPS et al, 2007)

Pacientes diagnosticados quando o tumor é ainda confinado a um local primário tem melhores perspectivas de sobrevida: cinco anos após o diagnóstico, enquanto que menos de 5% de pacientes com câncer em estágio

avanzado sobrevivem, comparado com 60 a 80% dos pacientes com a doença em estágio inicial. (PHILLIPS et al, 2007)

Os métodos diagnósticos disponíveis para câncer de pulmão, incluindo os imaginológicos e citológicos de escarro são frequentemente de fraca sensibilidade e especificidade na detecção da doença em estágios iniciais. Apenas 16% dos casos de câncer de pulmão são descobertos antes da doença tornar-se avançada. (WANG et al., 2009)

O recente desenvolvimento de tecnologias de imagem baseada em varredura, como tomografia computadorizada em espiral, tomografia por emissão de pósitrons, broncoscopia virtual, broncoscopia por autofluorescência e microscopia confocal igualmente não mostrou diferença no desfecho final da doença. (PHILLIPS et al, 2007)

A possível razão para isto é que critérios morfológicos usados em imagens não são suficientemente sensíveis durante a fase pré-maligna do desenvolvimento do câncer, especialmente nas pequenas células, cujo desenvolvimento pode ocorrer sem alterações morfológicas reconhecíveis como lesões pré-neoplásicas. (PHILLIPS et al, 2007)

O conhecimento das alterações genéticas e protéicas tem sido tema das abordagens moleculares da carcinogênese pulmonar na últimas décadas. Entretanto, desde 1970 a alta taxa de mortalidade (80 a 85%) não mostrou melhora considerável. A ineficácia das ferramentas diagnósticas em estágios iniciais e a deficiência terapêutica em estágios avançados da doença são as duas maiores razões. (WANG et al., 2009)

A sobrevivência de pacientes com câncer de pulmão, especialmente de pequenas células, requer detecção precoce e tratamento efetivo. Embora os estudos clínicos prévios de detecção precoce usando citologia do escarro e radiografia torácica levem ao diagnóstico mais brevemente, não se observou decréscimo da mortalidade após sua instituição. (PHILLIPS et al, 2007)

A maior parte dos diagnósticos é firmada quando a doença já se encontra avançada localmente e/ou disseminada, uma vez que tumores iniciais não costumam produzir sintomas que justifiquem investigação. Isto indica que

medidas de detecção precoce são particularmente importantes, uma vez que a ressecção cirúrgica, que se constitui na única abordagem terapêutica que oferece cura potencial, é efetiva somente em estádios clínicos precoces. (BARROS et al., 2006)

Como forma de incrementar a detecção precoce, a abordagem molecular poderia ser utilizada como complemento dos estudos de imagem. Anormalidade moleculares correlacionam-se com aspectos de comportamento evolutivo do câncer de pulmão, e são muitas vezes mais sensíveis na detecção de lesões malignas na fase pré-clínica do que tumores macroscópicos revelados por imagens. (PHILLIPS et al, 2007)

2.1.4. Tratamento

O tratamento do câncer de pulmão depende do tipo histológico, estágio da doença e estado geral do paciente. Para carcinomas de pequenas células, a quimioterapia representa o principal tratamento, pois este tipo de câncer de pulmão é usualmente metastático e a cirurgia é raramente indicada. A quimioterapia mais comumente utilizada em carcinomas de pequenas células é a combinação de cisplatina e etoposida. A resposta à quimioterapia é superior a 90% em pacientes com doença de extensão limitada, e 50 a 60% em pacientes com doença extensa. Em pacientes com doença limitada, radioterapia torácica é realizada concomitantemente à quimioterapia, e irradiação cranial profilática é recomendada em pacientes que obtém resposta sistêmica ao tratamento, pois as metástases cerebrais representam um comum e importante sítio de recorrência em pacientes com carcinomas de pequenas células. (ASANO et al., 2006)

A quimioterapia, antes um tratamento de exceção no carcinoma broncogênico, é hoje em dia utilizado na maior parte dos pacientes com doença não ressecável (principalmente estádios IIIB e IV), os quais podem constituir até 80 a 85% dos casos novos. A sua utilização como tratamento neo-adjuvante no estágio IIIA ampliou ainda mais o uso dos quimioterápicos. Apesar do desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos, com melhores

perfis de tolerância e toxicidade, pouco se alterou em termos de mortalidade em relação aos esquemas clássicos baseados em platina. (PACHECO, PASCHOAL, CARVALHO, 2002)

As modalidades aceitas para tratamento do câncer envolvem cirurgias, radiação e drogas, isoladamente ou combinadas. Agentes quimioterápicos podem freqüentemente desencadear remissão temporária dos sintomas, prolongamento da vida e ocasionalmente, a cura. Uma droga antineoplásica de sucesso deveria matar ou incapacitar as células cancerígenas sem causar dano excessivo às células normais. Esta situação ideal é possível pela indução da apoptose em células neoplásicas, pois o tempo de vida tanto de células normais quanto de cancerígenas é significativamente afetado pela magnitude da apoptose. Portanto, modular a apoptose pode ser útil no manejo terapêutico ou prevenção do câncer. A síntese ou modificação das drogas conhecidas continuam sendo um importante objeto de pesquisa. (TARAPHDAR, ROY, BHATTACHARYA, 2001)

Em estágios iniciais do carcinoma de células não pequenas, a cirurgia é a modalidade terapêutica mais importante, entretanto apenas aproximadamente 20 a 30% dos pacientes são diagnosticados em um estágio de tumor ressecável (estágio I-III). Em carcinomas de células não pequenas avançados, pacientes em bom estado (0-1) recebem quimioterapia baseada em platina como tratamento básico, e a resposta parcial pode ser observada em 30 a 40% dos casos. (ENDO et al., 2005)

Resposta completa é muito rara em casos avançados de carcinoma de células não pequenas. O regime terapêutico utiliza cisplatina ou carboplatina, em combinação com gencitabina, paclitaxel, docetaxel, etoposida ou vinorelbina. A quimioterapia e radioterapia podem também serem usadas como terapias neo adjuvantes na intenção de reduzir o tamanho do tumor antes da cirurgia ou uma terapia adjuvante para aumento do prognóstico pós operatório. (JANNE et al., 2006; KOSAKA et al., 2004)

O uso de terapias neo adjuvantes e quimioterapia tem mostrado aumento na sobrevida dos pacientes. Não obstante os avanços nas modalidades combinadas e demais terapêuticas para o câncer de pulmão, o

prognóstico permanece pobre e muitos efeitos colaterais tem sido frequentemente observados. (MARCHETTI et al., 2005; MARCHETTI, FELICIONI, BUTTITTA, 2006)

A base teórica da quimioprevenção considera a teoria multifásica da carcinogênese, que pode ser usada para explicar o processo da carcinogênese pulmonar. Baseia-se no fato que a progressão das células do epitélio brônquico para uma lesão maligna envolve um processo multifásico com numerosas modificações morfológicas e moleculares, com progressão do epitélio brônquico para hiperplasia, metaplasia, displasia e carcinoma in situ, evoluindo para carcinoma invasivo. (GRAY et al., 2007)

2.2. BENZO[A]PIRENO

Os HAP carcinogênicos são conhecidos como agentes carcinogênicos completos, pois podem induzir tumores em tecido epidérmico sem a necessidade de intervenções adicionais, e seu uso na produção de tumores de pulmão experimentais em animais é relatado na literatura desde a década de 50, e foram os primeiros componentes puros de composição conhecida identificados como indutores de câncer em modelos experimentais. (RUBIN, 2001)

Após a ativação metabólica, os carcinogênicos químicos exógenos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos interagem com o DNA formando lesões que podem ser convertidas em mutações durante o processo de replicação, desencadeando transformação maligna. Por exemplo, o benzopireno pode ser oxidado pelo citocromo p450 para produzir epóxido, um elemento eletrofílico muito reativo que pode se fixar a regiões nucleofílicas do DNA, resultando na formação de adutos de DNA. (XU et al., 2007)

Além disso, a queima de combustíveis fósseis produz uma série de substâncias nocivas à saúde humana, incluindo partículas de monóxido de carbono, óxidos de nitrogênio, óxido de enxofre, formaldeído, matéria orgânica e hidrocarbonetos policíclicos, incluindo agentes carcinogênicos como o benzopireno. Adicionalmente, as substâncias contidas no cigarro (nicotina, hidrocianato, formaldeído, acroleína) são conhecidas por causar dano ciliar, que promove e prolonga a atividade das substâncias carcinogênicas igualmente inaladas durante hábito tabágico (benzopireno e dibenzoantraceno). (ELLEGE et al., 2010; NOWACZYK, NOWAK, GLINSKA-SUCHOCKA, 2009)

O benzo[a]pireno é um elemento químico encontrado no tabaco cuja relação com o desenvolvimento do câncer tem sido mostrada em diversos estudos. Sua concentração ocorre normalmente entre 20 e 40 ng/cigarro e pode levar à formação do tumor por mecanismos multifatoriais. Após iniciadas as reações à sua presença, o B[a]P reage preferencialmente com a ligação guanina nos códons 157, 248 e 273 do gene p53 das células normais do

epitélio bronquial, e esta reação tem sido identificada como um ponto chave na mutagênese do câncer de pulmão. (AGEN et al., 2001)

O benzopireno é um hidrocarboneto aromático policíclico comum, e um agente tóxico ambiental presente na emissão de gases veiculares, fumaça de cigarro, algumas comidas e poluentes ocupacionais. O benzopireno ativa vias de transdução múltiplas e afeta diretamente a transcrição através dos receptores de hidrocarbonetos aromáticos. (SADIKOVIC et al., 2008)

O benzo[a]pireno é comumente encontrado em produtos contaminantes advindos da queima de combustíveis fósseis, especialmente carvão mineral, bem como nos produtos de exaustão de motores de combustão interna. É capaz de produzir uma ampla variedade de lesões tóxicas, incluindo a carcinogênese em modelos experimentais. (GARRY et al., 2003)

É o composto hidrocarboneto aromático policíclico mais estudado atualmente. Devido à relativamente alta concentração ambiental e seu alto nível de toxicidade, resultando em maior impacto na saúde que qualquer outro hidrocarboneto aromático policíclico identificado no ambiente, o benzopireno é muitas vezes selecionado como um substituto de outros hidrocarbonetos no desenvolvimento de estudos experimentais. (Toronto Agency of Public Health, 1998; SADIKOVIC et al., 2008)

A evidência de dano genético produzido pelo benzopireno inclui as mutações genéticas, formação e fixação de adutos de DNA, quebras na cadeia do DNA, alterações cromossômicas, formação de micronúcleos, síntese não programada de DNA e troca de cromátides irmãs. Estes efeitos são observados em células bacterianas e eucarióticas, em culturas de células humanas e em estudos in vivo em animais. (California Environmental Protection Agency, 2010)

Nos últimos anos, diversos estudos envolvendo modelos animais de câncer de pulmão utilizando B[a]P têm sido descritos, e a influência do método de indução e da dose utilizada é observada como um importante componente na carcinogênese pulmonar. (MEUISSSEN, BERNIS, 2005)

O benzopireno tem sido estudado em vários bioensaios de câncer em diferentes animais de laboratório (ratos, camundongos e hamsters), para os

quais a substância foi administrada por via oral, via percutânea, via inalatória de partículas, instilação intratraqueal ou intrabronquial e injeção. (California Environmental Protection Agency, 2010)

A instilação intratraqueal de benzopireno em hamsters e ratos resulta em aumento de tumores na árvore respiratória. A injeção subcutânea de benzopireno induz sarcomas localizados em ratos, hamster e camundongos. A injeção intraperitoneal em camundongos e ratos resulta em tumores localizados nos camundongos e tumores mamários e uterinos em ratos. A implantação intrabronquial resultam em tumores localizados em ratos. Camundongos recém nascidos que recebam o benzopireno por injeção subcutânea ou intraperitoneal desenvolvem tumores hepáticos e pulmonares. (California Environmental Protection Agency, 2010)

Os metabólitos celulares do benzopireno exercem uma gama de efeitos tóxicos e epigenéticos, que incluem a diminuição global na metilação do DNA e inibição da DNA metiltransferase in vitro. Adicionalmente, o benzopireno diol epóxido desencadeia aumento da metilação de citocinas, sugerindo um papel dos metabólitos do benzopireno na desregulação genética celular. (SADIKOVIC et al., 2008)

Harrigan et al. (2004) realizaram injeção intra-pulmonar de B[a]P dissolvido em acetona nas doses de 10 e 50 mg/kg em ratos *Sprague-Dawley*. Vinte e quatro e quarenta e oito horas após a injeção, os ratos foram sacrificados e a adesão do B[a]P ao DNA no tecido pulmonar analisada. Os resultados mostraram que os níveis de adesão do carcinogênico ao DNA foram menores após 48 horas que nas 24 horas, indicando reação metabólica com eliminação de parte do B[a]P nos animais estudados.

Garçon et al. (2001a) demonstraram que após instilação intra-traqueal de B[a]P (3mg) ou B[a]P (3mg) associado a Fe₂O₃ observou-se peroxidação lipídica e inativação da superóxido dismutase (uma enzima anti-oxidativa), indicando que esta associação resulta em maior formação de tumores pulmonares em roedores quando comparada à instilação do B[a]P isoladamente.

2.3. APOPTOSE

O termo apoptose foi idealizado em 1972 por Kerr et al., para descrever uma manifestação morfológica de morte celular envolvendo condensação nuclear. Desde esta época, o termo tem sido frequentemente utilizado na descrição geral de qualquer processo de morte celular programada. (HENSON, TUDER, 2008)

Apoptose é um programa seletivo de morte celular promovido ou suprimido por genes específicos. Eventos morfológicos e moleculares ativam estes elementos regulatórios, levando à fragmentação internucleossomal do DNA, degeneração das estruturas citoplasmáticas e nucleares e formação dos corpos apoptóticos de membrana, que são englobados por macrófagos teciduais. Recentemente, o conhecimento de vários genes do ciclo celular, proto-oncogenes, genes supressores tumorais e genes promotores da morte celular, mostrou importante relação dos mesmos no crescimento, diferenciação e apoptose celular, bem como na progressão tumoral. (BELIZÁRIO, 1999)

Apoptose ou morte programada da célula é um processo de regulação genética no qual uma série de mudanças morfológicas como condensação do núcleo e cromatina, formação de bolhas na membrana celular e de corpos apoptóticos no interior da célula, resultando em morte celular. (HUSARI, et al., 2006)

A morte celular programada é um mecanismo de deleção de células desconhecidas ou danificadas na manutenção da homeostase tecidual. Consequentemente este processo manifesta-se durante o desenvolvimento, remodelação celular, inflamação e injúria tecidual. De fato, a morte celular programada ocorre todo o tempo no organismo dos mamíferos, particularmente evidente na constante remoção (e substituição) de células dentro do compartimento hematopoiético. (HENSON, TUDER, 2008)

A apoptose celular tem papel essencial na homeostase e manutenção do equilíbrio entre a sobrevivência e morte celular. Existem duas vias principais de deflagração da apoptose. Uma é a via direta de ligação do receptor para a

cascata da caspase, que ativa a morte celular. A ligação com este receptor dispara o recrutamento de formas precursoras da capase-8, complexos indutores da morte celular. A outra via é desencadeada por estímulos como drogas, radiação, agentes infecciosos e espécies reativas de oxigênio iniciadas na mitocôndria. (KUWANO, 2007)

Os mecanismos pelos quais a apoptose é induzida e regulada em diferentes células tem recebido grande atenção investigativa. Em termos simples, vias extrínsecas (por sinalização dos receptores de membrana e mediação pela capase 8) ou intrínsecas (envolvendo as mitocôndrias e mediada através da capase 9) levam a ativação de capases “executoras” (capases 3 e 7) que iniciam as múltiplas alterações na célula, incluindo as alterações nucleares. (HENSON, TUDER, 2008)

Os corpos apoptóticos são retomados pelos macrófagos ou células semelhantes, presumivelmente permitindo a manutenção dos componentes celulares e evitando a resposta inflamatória. A apoptose é um processo ativo que frequentemente requer nova síntese protéica. Inicialmente quando o processo inicia-se, a célula perde características de uma entidade morfológica em aproximadamente uma a duas horas. (SCAVO et al., 1998)

A apoptose tem importante papel nas doenças pulmonares. Primeiro, a falência na remoção de células indesejáveis pela apoptose prolonga a inflamação pela liberação de conteúdos tóxicos e atraso no processo de reparo. Células apoptóticas podem ser rapidamente reconhecidas e digeridas pelos fagócitos antes de liberarem seu conteúdo tóxico. Segundo, a apoptose excessiva pode levar a inflamação e consequentemente à fibrose pulmonar. (KWANO, 2007)

A apoptose tem sido relacionada a uma ampla variedade de condições patológicas. O aumento da apoptose é associado a doenças isquêmicas agudas, doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, diabetes e hepatite, e a diminuição da apoptose está envolvida no câncer e doenças auto-imunes. (BRAJUSKOVIC, 2005).

É uma forma de morte celular claramente distinta da necrose, sendo um fenômeno fisiológico que ocorre espontaneamente no processo do crescimento tecidual normal, e tem se mostrado fortemente associada aos tumores malignos, pois as anormalidades no processo de apoptose promovem transformações que contribuem à proliferação tumoral. A apoptose pode ser induzida por agentes antineoplásicos e irradiação, e anormalidades de alguns genes que regulam a apoptose tem sido reportadas nas alterações de sensibilidade de células tumorais à quimioterapia ou radioterapia. (TANAKA et al., 1999)

Apoptose é uma forma de morte celular que ocorre sob situações fisiológicas e patológicas severas, e representa um mecanismo comum de reparação celular, remodelação tecidual e remoção de células danificadas. Pode ocorrer espontaneamente ou em resposta a um estímulo específico, como estresse por calor, radiações, esteróides ou estresse oxidativo. Em função da implicação do estresse oxidativo e da apoptose em numerosos processos, incluindo envelhecimento, inflamação e carcinogênese, a hipótese da relação entre esses dois processos é considerada razoável, e o mecanismo pelo qual a oxidação pode modular as vias apoptóticas tem sido alvo de vários estudos. (CARNEVALLI, 2003)

A apoptose é considerada um fenômeno muito importante na patogênese do câncer. Vários oncogenes e anti-oncogenes comumente desregulados no câncer são envolvidos no controle na apoptose. A diminuição da função normal desses genes, levando a aumento da resistência celular à apoptose, é considerada uma fase importante no desenvolvimento neoplásico. A desregulação da apoptose é uma característica freqüente das células malignas, e representa um significativo obstáculo na terapêutica do câncer humano. (SHAN et al., 2006; GOSH, CROCKER, MORRIS, 2001)

O acúmulo de células neoplásicas pode ser resultado de aumento na proliferação e/ou redução da morte celular. A eliminação ineficiente das células neoplásicas pode ser uma consequência de alterações no mecanismo de apoptose. (KAUFMANN, GORES, 2000)

A alteração genética mais comum no câncer de pulmão é a mutação no gene supressor de tumor p53, que é encontrado em cerca de 60% dos casos. O gene p53 é considerado um importante guardião do genoma, que coordena um equilíbrio delicado entre a parada do ciclo celular para permitir a reparação de danos ao DNA e apoptose (morte celular programada ou suicídio celular) se o dano é grave e irreparável. (MOLLERUP, 2002)

Um método de avaliação da magnitude de apoptose é a observação do índice apoptótico (IA), obtido através do cálculo da relação percentual entre o número de células com características de apoptose e o número de células contadas. O índice apoptótico pode também ser utilizado como um indicador preditivo de eficácia da quimioterapia em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas. (GIOVANETTI, 2008; HUANG, 2007)

Nos pulmões a barreira tumoral é principalmente representada pelo índice apoptótico. O epitélio bronquial normal tem índice proliferativo celular muito baixo e um grau de apoptose irrelevante. As lesões pré cancerosas exibem altos níveis de apoptose e alto índice de proliferação celular, enquanto os carcinomas pulmonares tem uma alta proliferação celular e baixos níveis de apoptose. (HALAZONETIS, GORGOULIS, BARTEK, 2008)

Um alto nível de atividade apoptótica em tumores é geralmente considerada como um sinal de menor crescimento tumoral e melhor prognóstico. Entretanto, observa-se uma maior atividade apoptótica em tecidos pré-neoplásicos quando comparados a tecidos normais, indicando que tanto a frequência de proliferação celular quanto de morte celular são alteradas paralelamente às mudanças morfológicas, bem como uma direta correlação entre a extensão da apoptose e a proliferação celular em fases que antecedam a formação do tecido neoplásico. (TORMANEN et al., 1999)

Teoricamente, a magnitude da morte celular em um tumor poderia balancear a proliferação celular e assim determinar o ritmo de expansão tumoral e consequentemente o prognóstico de sobrevida. Normalmente espera-se que tumores com alto grau de apoptose sejam menos agressivos e que a sobrevida de pacientes nesta situação seja maior que daqueles cujos

tumores tenham baixo índice de apoptose. (GOSH, CROCKER, MORRIS, 2001)

A transformação maligna é um processo desencadeado por acúmulo de alterações genéticas. Há pouco tempo atrás, os oncologistas moleculares focavam seus estudos principalmente nas vias celulares de controle da proliferação, pois a doença neoplásica era tipicamente vista como resultante de defeitos na divisão celular. Nos últimos 12 anos as evidências sugerem que o outro lado do equilíbrio – a taxa de morte celular – é tão importante quanto a divisão das células, e estudos da correlação entre a programação da morte celular e proliferação carcinogênica estão no foco atual da pesquisa do câncer. Sabe-se que mutações e deleções de genes responsáveis pela apoptose desempenham papéis importantes na carcinogênese, crescimento tumoral e regressão do tumor. (BRAJUSKOVIC, 2005)

Alterações no processo de apoptose são observadas na patogênese de uma variedade de doenças humanas. Por exemplo, o incremento da apoptose está envolvido na patogênese da AIDS, desordens neurodegenerativas ou acidente vascular encefálico isquêmico. Por outro lado, a redução da função regulatória apoptótica tem sido relatada na progressão tumoral e no desenvolvimento da quimioresistência. (CHECINSKA, 2007)

Um evento crucial na via apoptótica intrínseca é a permeabilização da mitocôndria. Este processo, chamado permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP), leva a liberação do citocromo c no citosol, e constitui um “ponto sem retorno” na via. A via pode ser pela potencialização ou inibição da MOMP. (ARMSTRONG, 2006; VERHAGEN AND VAUX, 2002; GREEN, 2003)

Segundo Ekehda (2007), muitos dos tratamentos anti cancer utilizados clinicamente atuam com base na apoptose. Entretanto, resistência ao tratamento quimioterápico inerente ou adquirida é um problema clínico comum, tanto pelo menor efeito terapêutico da terapia anti cancer quanto pela participação da desregulação da apoptose como evento necessário na tumorigênese, e Fokkema (2006) mostrou em seu estudo que proteínas

expressadas durante a apoptose poderiam também ser usadas como ferramentas terapêuticas no tratamento do câncer.

2.4. BIOMARCADORES

O termo biomarcador refere-se a qualquer molécula ou característica biológica que possa ser detectada e medida revelando os processos biológicos normais, patogênicos ou a resposta farmacológica após intervenção terapêutica. Assim, tal termo deve indicar alterações do estado fisiológico normal para o patológico ou de mudanças no ambiente corporal interno ou no meio ambiente. No campo molecular, as pesquisas focalizaram a atenção sobre nossos genes, proteínas e moléculas ligadas ao metabolismo. (CARVALHO et al., 2006)

Os biomarcadores têm características passíveis de avaliação e mensuração, como indicadores de processos biológicos normais, processos patogênicos ou de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica. Como tal, devem refletir mudanças em sistemas biológicos relacionadas à exposição ou aos efeitos de xenobióticos, ou outros tipos de fatores (essencialmente aqueles relacionados a doenças). Eles podem ser classificados como biomarcadores de exposição, de efeito e de susceptibilidade. O biomarcador ideal deve reunir as seguintes características: mostrar alta especificidade para o efeito de interesse; refletir o efeito desde o início; ser passível de determinação e análise fáceis e de baixo custo; ser analisado por técnica não invasiva, de alta sensibilidade, no fluido biológico escolhido. Deve existir uma relação bem estabelecida entre a concentração do biomarcador e a exposição ao agente, ao dano induzido e à susceptibilidade pesquisada. (VASCONCELOS et al., 2007)

A prática da oncologia tornar-se-ia melhor se houvesse uma forma de prever o desenvolvimento e ocorrência do câncer, bem como determinar o prognóstico da doença após o tratamento. Existem três tipos de fatores preditivos: risco, diagnóstico e prognóstico. Eles diferem em grau de êxito e poder preditivo. Para risco e diagnóstico, o principal fator de interesse é a incidência da doença; para prognóstico o principal resultado de interesse é o óbito. Um fator raramente é um preditor forte se isolado dos outros fatores prognósticos. (WALASZEK, HANAUSEK, 2000)

O crescimento tumoral pulmonar é o resultado do acúmulo de múltiplas sequencias de anomalias genéticas, devido à exposição a fatores ambientais ou mutagênicos, levando a anomalias genéticas. Cada alteração pode ser classificada em etapas essenciais: a aquisição de sinais de auto-crescimento autônomo, insensibilidade aos processos inibitórios do crescimento e inibição da apoptose. Vários sub-caminhos redundam a cada uma dessas etapas, tornando o processo muito complexo. No entanto, algumas anormalidades são particularmente mais propensas na pressuposição do comportamento biológico do câncer em relação ao risco de metástases e à resposta terapêutica. (PACI, RAPICETTA, MARAMOTTI, 2010)

Estudos recentes identificaram 26 genes frequentemente modificados no câncer de pulmão, o dobro do numero de genes implicados nesta doença. Muitos esforços tem sido envidados na busca por biomarcadores no câncer de pulmão, buscando suprir a necessidade da detecção precoce da doença. Embora 1,2 milhões de pessoas no mundo recebam anualmente diagnóstico de câncer de pulmão, apenas 16% dos casos são detectados enquanto a doença ainda é localizada e possivelmente curável. (BROWER, 2009)

Um marcador tumoral define alterações celulares e moleculares presentes tanto em células normais quanto naquelas associadas a transformação maligna. Podem ser de dois tipos: (SILVA JÚNIOR et al., 2006)

a) marcadores intermediários ou precoces – que medem as alterações celulares e moleculares antes do aparecimento do tumor. Existe grande expectativa na detecção precoce de neoplasias malignas. Apesar do uso de exames imaginológicos e citopatológicos na detecção precoce, a biologia molecular tem recebido especial atenção no diagnóstico das neoplasias. As anormalidades genéticas e epigenéticas associadas a alterações histopatológicas vêm sendo estudadas, com vistas a serem utilizadas como biomarcadores para detecção precoce de transformação celular.

b) marcadores diagnósticos - presentes em associação com o tumor. Os marcadores diagnósticos são substâncias que podem ser medidas quantitativamente por métodos bioquímicos, imunológicos e moleculares, nos líquidos orgânicos ou nos tecidos corporais, associados a neoplasias e com o

órgão de origem. Os marcadores diagnósticos expressam diferentes características biológicas dos carcinomas brônquicos e podem ser utilizados no manejo clínico dos pacientes, auxiliando nos processos de diagnóstico, estadiamento, avaliação de resposta terapêutica, detecção de recidivas e prognóstico. Além do mais, esses marcadores vêm atualmente tomando papel importante no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento, direcionadas a quebrar o ciclo biológico da progressão tumoral.

Atualmente levantam-se importantes questões sobre os testes de validação dos biomarcadores. Em primeiro lugar uma avaliação ideal de um biomarcador deveria ser feita com a comparação de um grupo tratado e um grupo controle placebo, pois a efetividade do marcador poderia ser avaliada no grupo sem tratamento, e seu poder prognóstico controlado na comparação dos dois grupos. Em se tratando de doença neoplásica, ensaios controlados com grupo placebo não são considerados adequados. Portanto o estudo dos biomarcadores deve ser concentrado em comparação de tratamentos diferentes ou adição do objeto de estudo a uma terapia padrão, e isto leva a um segundo problema, à medida que o efeito da terapia padrão também pode ser diferente em subgrupos submetidos à biomarcação. (SHEPHERD, TSAO, 2010)

Assim, a análise das alterações genéticas e epigenéticas em células tumorais como a expressão gênica, regulação, alteração de mecanismos de reparo do DNA e instabilidade genômica representam área de importante atividade investigativa e inovadora, que pode potencialmente produzir uma grande quantidade de novos biomarcadores passíveis de serem utilizados em situações clínicas. (PACI, RAPICETA, MARAMOTTI, 2010)

Os biomarcadores para câncer de pulmão são específicos em duas categorias: mutação genética e marcadores protéicos, produzidos por tumores e detectáveis no sangue ou muco, e marcadores da resposta imune do paciente, quando esta reflete a presença de um tumor. (BROWER, 2009)

Para o incremento do prognóstico do câncer de pulmão é importante o estabelecimento de marcadores biológicos que determinem tanto o prognóstico quanto a resposta do tumor ao tratamento. Embora vários marcadores, como p-

53 e c-myc tenham sido investigados, nenhum deles conseguiu estabelecer-se como um marcador efetivo para o acompanhamento terapêutico. (TANAKA et al., 1999)

Defeitos no processo de controle da apoptose podem estender a vida celular até a expansão celular neoplásica independentemente da divisão celular. Adicionalmente, contribui para a carcinogênese pela criação de um ambiente permissivo à instabilidade genética e acumulação de mutação celular, promoção de resistência à destruição imunoprogramada e desregulação dos pontos do ciclo celular que normalmente induziriam apoptose. (WALASZEK, HANAUSEK, 2000)

Esses defeitos podem também facilitar a sobrevivência e crescimento celular por fatores hormonais independentes, redução da dependência ao oxigênio e nutrientes e conferir resistência à citotoxicidade de drogas anti-neoplásicas e radiação. A elucidação desses mecanismos constitui uma via para prover novos conhecimentos na biologia tumoral, revelando novas estratégias para detecção e combate do câncer. (WALASZEK, HANAUSEK, 2000)

O gene mais frequentemente modificado no câncer humano é o P53. Sua função é a ativação de fatores pró-apoptóticos via mitocondrial. Este gene é inativado em 50% dos carcinomas pulmonares de células não pequenas (particularmente em carcinomas de células escamosas) e em 90% dos carcinomas de pequenas células. A inibição da apoptose tem sido observada em 10 a 30% dos pacientes com câncer de pulmão, comparado com uma mínima detecção em grupos de indivíduos saudáveis. Mutações do gene pró-apoptótico é observada em 41% dos casos de tumores pulmonares, com mutação idêntica identificada no plasma de 73% desses casos. Apesar das incertezas que persistem sobre sua significância prognóstica, o gene P53 é frequentemente considerado um marcador do aumento de risco do câncer. (PACI, RAPICETTA, MARAMOTTI, 2010)

A proliferação e crescimento celular são regulados por uma complexa rede de fatores de crescimento e vias de transdução de sinais inibitórios do crescimento. A interrupção dessas vias de sinalização através de alterações

genéticas, epigenéticas ou somáticas é uma importante área de pesquisa do câncer. Crescentes evidências indicam que a ativação oncogênica de fatores de crescimento e de suas proteínas receptoras ocorrem através de mutações (oncoproteínas) que levam à ativação de vias de sinalização que desencadeiam a liberação do suposto marcador prognóstico e potenciais alvos para o tratamento de diversos tipos de câncer. (IVANOVIC, 2005)

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência da injeção pulmonar de benzo[a]pireno na atividade apoptótica pulmonar de ratos *Wistar*.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o tempo-resposta após injeção de benzo[a]pireno na atividade apoptótica pulmonar em modelos experimentais de carcinogênese.
- Estabelecer um modelo para avaliação das respostas histológicas e metabólicas da carcinogênese pulmonar experimental.

4. MÉTODO

4.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado no laboratório de fisiologia animal da Universidade Anhanguera-Uniderp, em Campo Grande – MS, no período compreendido entre os meses de fevereiro e outubro de 2009.

Foram estudados *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar albinus*, procedentes do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS. Todos animais eram machos e tinham idade entre dois e três meses (sessenta a noventa dias), com peso variando entre cento e cinquenta e duzentos gramas.

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno¹ com dimensões de trinta e três centímetros de largura, quarenta centímetros de profundidade e dezessete centímetros de altura, com tampas/grades de aço inoxidável contendo espaço para ração² e água. Cada caixa abrigou no máximo cinco animais. A oferta alimentar e hídrica foi realizada de forma contínua, *ad libitum* e substituída uma vez ao dia.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA/UFMS pelo certificado nº 72/2005, e todos os procedimentos respeitaram as normas internacionais para experimentação animal.

¹ Brasholanda®

² Nuvilab CR1 – Nuvital Nutrientes

Os animais de cada grupo foram submetidos à injeção intra-pulmonar única (pulmão esquerdo) via toracocentese da solução obtida pela diluição de B[a]P cristalino 98%¹ (3,4-benzo[a]pireno) em álcool 70%.

As doses utilizadas no preparo da solução de B[a]P foram preparadas com pesagem e separação em frascos estéreis com 20ml de capacidade nas concentrações de 40 e 80 mg/ml diluídas em álcool 70% até obtenção de um volume final de 10ml de solução, agitada até completa homogeneização. Para pesagem das doses foi utilizada balança milimesimal de grama².

A injeção intra-pulmonar foi realizada após sedação com injeção intraperitoneal de solução da associação de Cloridrato de Xilazina³ e Cloridrato de Cetamina³ (1:1) em dose de 0,01 ml/kg. Com o animal contido em decúbito dorsal foi realizada toracocentese à esquerda na linha axilar anterior em nível médioesternal, utilizando-se seringa estéril de 1ml e agulha 13X4,5, introduzida cerca de 0,8cm perpendicularmente à superfície do tórax.

A eutanásia dos animais foi realizada através de injeção letal da associação de solução injetável de Cloridrato de S(+) Cetamina⁴ e Tiopental Sódico⁴ pó estéril diluído em Solução Fisiológica de Cloreto de Sódio a 0,9% em concentração de 100mg/ml.

A retirada dos pulmões foi realizada com os animais posicionados e fixados em decúbito dorsal, submetidos à incisão mediana partindo da região cervical anterior e estendendo-se até aproximadamente um centímetro abaixo do apêndice xifóide. O acesso à cavidade torácica foi feito a partir de incisão sub-xifóidea e osteotomia costal paraesternal. Antes de se proceder à

¹ C₂₀H₁₂ – Fluka Chemie – Sigma-Aldrich – St Louis, USA

² Ohaus – Analytical Standard

³ Sespo Ind. e Com. Ltda, Jacareí, SP

⁴ Cristália – Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. – Campinas, SP

pleurotomia, a traquéia foi clampeada com pinça hemostática para prevenir-se o colapso maciço do tecido pulmonar.

Após cuidadosa ressecção, os pulmões foram submersos em formol tamponado a 10% e enviados para processamento dos cortes histológicos.

Os cortes foram analisados por um profissional patologista e os achados histopatológicos descritos para posterior análise. As imagens de cada campo foram obtidas a partir de um microscópio de luz¹ com lente objetiva² e aumento final de 1000X. As imagens foram captadas por uma câmera acoplada ao microscópio ótico e transferidas para um computador.

4.1.2 Preparo histológico – TUNEL (detecção da fragmentação do DNA – TUNEL in situ cell death detection kit)³

O preparo histológico foi feito através da seguinte sequência: imersão em Xilol I por 10 minutos, Xilol II por 05 minutos, Xilol III por 05 minutos, álcool 100% I por 05 minutos, álcool 100% II por 05 minutos, álcool 95% por 05 minutos, álcool 80% por 05 minutos, álcool 70% por 05 minutos e aplicação de tampão fosfato (Phosphate Buffer Saline – PBS) pH 7,4 por 15 minutos.

Aplicada enzima proteolítica Proteinase K (20µg/ml em Tris-HCL 10mM pH 7,4) e realizada hidratação em câmara úmida por 30 minutos a 37°C. Após hidratação os cortes foram circundados com Pap Pen e lavados com PBS 0,05M em três sessões de 05 minutos cada.

Os cortes foram incubados em solução permeabilizante de Triton X-100 a 0,1% em água destilada associada a 0,1g de citrato de sódio. Após foram lavados em PBS 0,05M em três sessões de 05 minutos cada.

¹ ZEISS® - ICS/KSZ

² Achromat-0,25

³ Roche

A primeira lâmina (controle positivo) foi tratada com DNase por 15 minutos. A segunda lâmina (reação) tratada com PBS 0,05M por 15 minutos. A terceira lâmina (controle negativo) foi tratada com PBS 0,05M por 15 min.

Logo após as primeira e segunda lâminas sofreram tratamento com solução enzima TDT (terminal deoxynucleotidyl transferase) associada a solução marcadora nucleotide mixture por 01 hora. A terceira lâmina sofreu tratamento com solução marcadora nucleotide mixture por 01 hora. Este procedimento foi realizado em temperatura controlada de 37°C.

As lâminas foram então lavadas em PBS em três sessões de 05 minutos cada e incubadas em solução POD (anti-fluorescein antibody HRP) por 30 minutos a 37°C, lavadas em PBS 0,05M em três sessões de 05 minutos cada e reveladas com DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride).

Realizada nova lavagem em PBS 0,05M em três sessões de 05 minutos cada, desidratação e montagem com sobreposição da lamínula e vedação com esmalte.

4.1.3. Avaliação da Apoptose

Foram estudados 24 animais, distribuídos em três grupos de 08 animais cada.

- Grupo 01(controle): álcool 70% em dose aproximada de 1ml/kg.
- Grupo 02: 40 mg/kg de benzo[a]pireno;
- Grupo 03: 80 mg/kg de benzo[a]pireno.

Os animais (04 por grupo) foram submetidos à eutanásia na décima sexta e décima oitava semana após a instilação, e os pulmões submetidos à técnica de coloração em TUNEL.

As secções pulmonares foram então submetidas a análise histomorfométrica realizada com auxílio do programa Image Pro Plus (versão 4.5.0.29) (figuras 02 e 03).

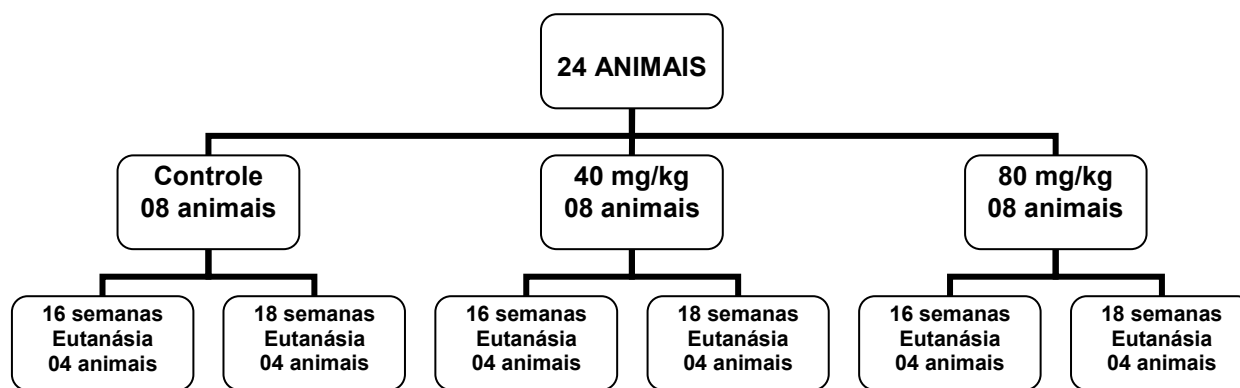


Figura 01: Caracterização do grupo Apoptose – TUNEL

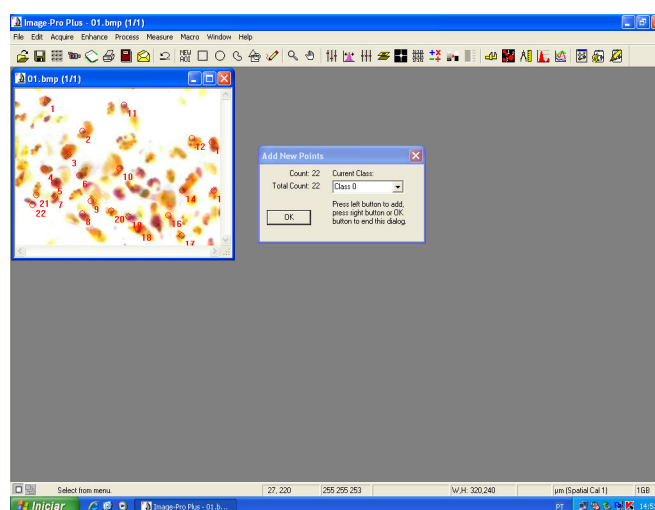


Figura 02: Quantificação de células em apoptose em um campo digitalizado com o software Image ProPlus 4.5.9.29 para o grupo Controle 16 semanas.

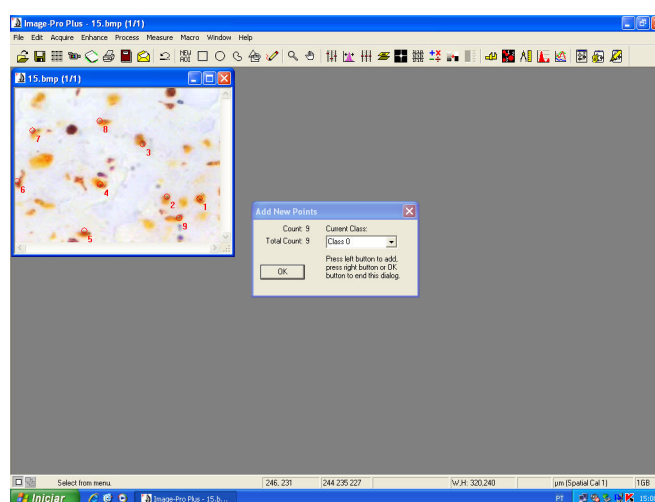


Figura 03: Quantificação de células em apoptose em um campo digitalizado com o software Image ProPlus 4.5.9.29 para o grupo 80 mg/kg 16 semanas.

4.1.4. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através de Análise de Variância (ANOVA) com *post test* de *Tukey* para comparação da dose-resposta. Quando aplicado, foi realizado o teste *t* de *Student* para comparações relacionadas. As diferenças foram consideradas significativas para os valores de $p \leq 0,05$. Para análise estatística foi utilizado o *software* GraphPad Prism 4.0.

RESULTADOS

Lung apoptosis after intra-pulmonary instillation of Benzo(a)pyrene in *Wistar* rats¹Apoptose pulmonar após instilação intrapulmonar de Benzo(a)pireno em ratos *Wistar*

Baldomero Antonio Kato da Silva^I, Ricardo Dutra Aydos^{II}, Iandara Schettert Silva^{II}, Daniel Martins Pereira^{III}, Paulo de Tarso Camillo de Carvalho^{IV}, Doroty Mesquita Dourado^V, Filipe Abdalla dos Reis^I, Renato Silva Nacer^{III}

^IFellow PhD Degree, Health and Development of the Central West Region, UFMS and Associate Professor, Anhanguera-Uniderp, Brazil.

^{II}PhD, Associate Professor, UFMS, Campo Grande-MS, Brazil.

^{III}Master, Health and Development Post Graduation from UFMS and Associate Professor at Anhanguera-Uniderp, Campo Grande-MS, Brazil.

^{IV}PhD, Orthopedics, Traumatology and Rehabilitation, Sao Paulo University (USP) and Associate Professor, UFSE, Brazil.

^VPhD, Cellular Biology and Structural Histology, UNICAMP and Associate Professor, Anhanguera-Uniderp, Brazil.

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the influence of pulmonary instillation of Benzo[a]pyrene in lung apoptosis of *Wistar* rats. **Methods:** Male *Rattus norvegicus albinus*, *Wistar* lineage was carried through an intra-pulmonary instillation of the Benzo[a]pyrene (B[a]P) dilution in alcohol 70%. Three experimental groups had been formed with 08 animals each: Control Group (Alcohol 70%); B[a]P Group 40 mg/kg; e B[a]P Group 80mg/kg, submitted to euthanasia 16 and 18 weeks after the experimental procedure. The pulmonary sections had been processed by TUNEL method and submitted to the histomorphometric analysis to quantify the apoptotic cell number. **Results:** After 16 weeks, mean of apoptotic cells number in control group ($19,3 \pm 3,2$) was greater than 40mg/Kg group ($11,8 \pm 1,9$; $p < 0,01$) and 80mg/Kg group ($7,0 \pm 1,4$; $p < 0,01$). Significant difference also observed between 40mg/Kg and 80mg/Kg ($p < 0,05$). After 18 weeks, mean of apoptotic cells number in control group ($18,0 \pm 2,2$) was greater than 40mg/Kg group ($8,8 \pm 1,7$; $p < 0,01$) and 80mg/Kg group ($5,5 \pm 1,3$; $p < 0,01$). Significant difference wasn't observed between 40mg/Kg and 80mg/Kg (ns). **Conclusion:** Intra-pulmonary instillation of Benzo[a]pyrene induces significant decrease of apoptotic activity in lung tissue.

Key words: Apoptosis. Benzo(a)pyrene. Lung Neoplasms. Carcinogens. Rats.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a influência da instilação intrapulmonar de Benzo[a]pireno na apoptose pulmonar de ratos *Wistar*. **Métodos:** *Rattus norvegicus albinus*, linhagem *Wistar* machos foram submetidos à instilação intra-pulmonar da diluição em álcool 70% de Benzo[a]pireno (B[a]P). Foram formados três grupos experimentais com 08 animais cada: Grupo Controle (álcool 70%); Grupo B[a]P 40 mg/kg; e Grupo B[a]P 80mg/kg, submetidos a eutanásia 16 e 18 semanas após o procedimento experimental. As secções pulmonares foram processadas pelo método TUNEL e submetidas à análise histomorfométrica para quantificação do número de células apoptóticas. **Resultados:** Após 16 semanas, a média do número de células apoptóticas do grupo controle ($19,3 \pm 3,2$) mostrou-se maior que o grupo 40mg/Kg ($11,8 \pm 1,9$; $p < 0,01$) e 80mg/Kg ($7,0 \pm 1,4$; $p < 0,01$). Diferença significativa foi também observada entre os grupos 40mg/Kg e 80mg/Kg ($p < 0,05$). Após 18 semanas, a média do número de células apoptóticas do grupo controle ($18,0 \pm 2,2$) mostrou-se maior que o grupo 40mg/Kg ($8,8 \pm 1,7$; $p < 0,01$) e 80mg/Kg ($5,5 \pm 1,3$; $p < 0,01$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos 40 e 80mg/Kg (ns). **Conclusão:** A instilação intrapulmonar de Benzo[a]pireno induziu diminuição significativa da atividade apoptótica em tecido pulmonar.

Descritores: Apoptose. Benzo(a)pireno. Neoplasias Pulmonares. Carcinógenos. Ratos.

¹Research performed at Postgraduate Program in Health and Development of the Central West Region, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Brazil.

Introduction

Lung cancer is one of most prevalent cancers in the world, and its mortality is expected to remain very high for many years to come. Because lung cancer does not show any symptoms in early stage of the disease, the majority of patients with this cancer are diagnosed with metastasis. Searching for prognostic indicators of lung cancer is an important clinical issue¹⁻³.

Cancer arises principally as a consequence of exposure of individuals to carcinogenic agents in what they inhale or eat and drink, or through exposures at their work or elsewhere. Rather than inherited genetic characteristics, other factors play the major roles in the etiology of cancer. These include personal habits such as tobacco use, dietary patterns, and occupational exposure to carcinogens⁴.

Environmental air pollution and smoking habits are the main sources of inhalation exposure to carcinogenic agents such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), products of incomplete combustion of organic matter and are widespread in the environment. PAHs, such benzo[a]pyrene (B[a]P), are currently recognized as one of major classes of environmental carcinogenic pollutants⁵.

Carcinogenic and mutagenic effects of B[a]P have been well documented in humans, animals, and mammalian cell systems. In general, B[a]P is among the more potent known experimental carcinogens. Active metabolites bind covalently to DNA and thus result in DNA damage¹.

Apoptosis or programmed cell death is a highly organized process to eliminate damaged or abnormal cells, and occurs under several physiological and pathological situations, and it represents a common mechanism of cell replacement and tissue remodeling. It is involved in maintaining homeostasis in multicellular organisms^{6,7}.

Apoptosis is characterized by nuclear and cytoplasmatic condensation of single cells (shrinkage) followed by loss of the nuclear membrane fragments of the nuclear material and cytoplasm – apoptotic bodies. Biochemical features associated with apoptosis include internucleosomal cleavage of DNA, leading to an oligonucleosomal “ladder”, phosphatidylserine externalization and proteolytic cleavage of a number of intracellular substrates⁸.

Because of dysregulation of apoptosis in cancer, studies that define the potential apoptotic markers to serve as prognostic or predictive factors in cancer are of critical importance. Defects in the processes controlling apoptosis can extend cell life span through neoplastic cell expansion independently of cell division. In addition, they contribute to carcinogenesis by creating a permissive environment for genetic instability and accumulation of gene mutations, promoting resistance to immune-based destruction, and allowing disobedience of cell cycle checkpoints that would normally induce apoptosis⁹.

The aim of this study was to evaluate the influence of pulmonary instillation of benzo[a]pyrene in lung apoptosis of *Wistar* rats.

Methods

Male *Rattus norvegicus albinus*, *Wistar* lineage 08 to 12 weeks of age were obtained from UFMS animal colony. Animals

were housed four per cage on hard-wood chip bedding and were given food and purified tap water. Rats were randomized into treatment groups and were quarantined for 2 *ad libitum* weeks prior to treatment, during which time they were acclimatized to 12-h light-dark cycles.

B[a]P was suspended in alcohol 70% to obtain 40 and 80 mg/ml concentrations. Rats were anesthetized with a mixture of ketamine and xilazine, positioned in supine and a thoracocentesis with a 13X4,5 needle was realized in left lung.

Rats (eight per group) were given a single intrapulmonary instillation of B[a]P at doses of 40 and 80 mg/kg using a 1-ml sterile syringe that was attached to the needle. The animals (four by four) were killed 16 and 18 weeks after the intrapulmonary instillation. A group of 08 rats (control) were also instilled with alcohol 70%.

Until their sacrifice, all animals were maintained four per cage under controlled ambient conditions and with free access to food and water. Rats were killed by intraperitoneal infusion of lethal dose of sodium pentobarbital.

The pulmonary sections were processed for enzyme terminal deoxy-nucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) and submitted to the histomorphometric analysis performed with the aid of the Image Pro Plus program (version 4.5.0.29).

Statistical evaluation was performed using Analysis of Variance followed Tukey's *post hoc* test. Student's *t* test was used for pairwise comparison. The difference was considered significant when $p < 0.05$. The statistical procedures were followed with the aid of Bioestat 5.0 statistical software. All experiments respected the international rules for animal experimentation.

Results

Apoptotic cells number were identified in all slices of control and experimental groups. The apoptotic cells were identified as irregular nuclear membrane staining. There was statistically significant difference among all the groups when analyzed the time and dose-response data ($p < 0.001$; ANOVA) (Table 1).

TABLE 1 – Mean ($\pm$ sd) of apoptotic cells number in the various animal's groups

	16 weeks	18 weeks
Control Group	19,3 $\pm$ 3,2	18,0 $\pm$ 2,2
B[a]P 40mg/Kg Group	11,8 $\pm$ 1,9	8,8 $\pm$ 1,7
B[a]P 80mg/Kg Group	7,0 $\pm$ 1,4	5,5 $\pm$ 1,3

Figures 1 and 2 shows the mean values (and standard deviation) of apoptotic cell number values for the 16 and 18 weeks of the control, 40mg/Kg and 80 mg/Kg groups.

Figure 3 shows the mean values (and standard deviation) of groups when realized pairwise comparisons.

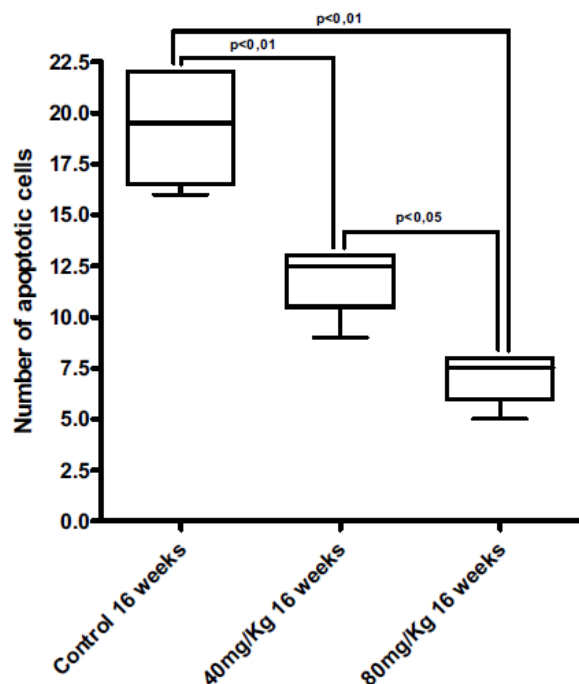


FIGURE 1 - Mean and standard deviation of number of apoptotic cells in all groups after 16 weeks

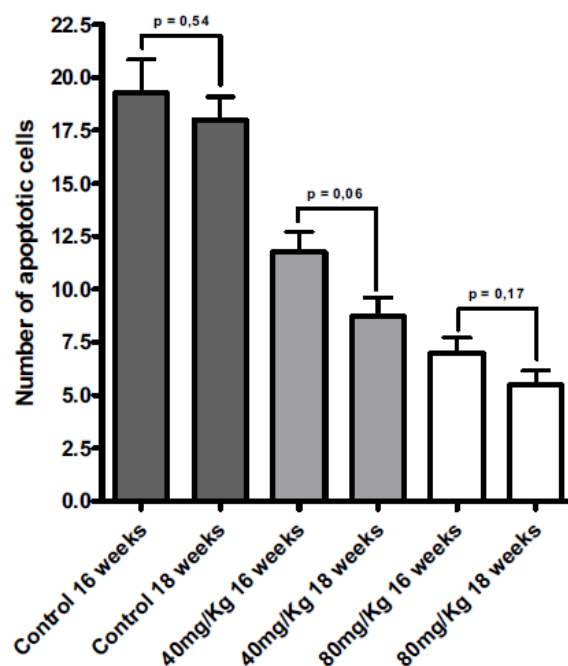


FIGURE 3 - Pairwise comparison between the control and experimental groups

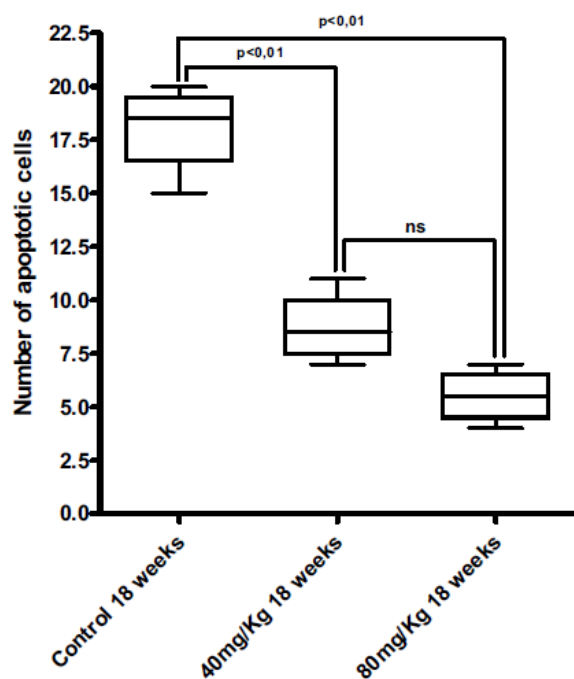


FIGURE 2 - Mean and standard deviation of number of apoptotic cells in all groups after 18 weeks

Discussion

Apoptosis has been implicated in a wide range of pathological conditions. Decreased apoptosis is involved in cancer and autoimmune disorders. Neoplastic disease was typically envisaged as result from defects in these pathways leading to excess cell division, and alterations of apoptotic mechanisms play important roles in carcinogenesis and tumor growth⁸.

In this study, apoptotic cells were identified as irregular nuclear membrane staining in 400X magnification. Light microscopic assessment is a standard method for apoptosis investigation. However, because of small size and typically scattered distribution of apoptotic cells and apoptotic bodies in lung tumors, high magnification objectives are needed for studying apoptosis on routine light microscopy¹⁰.

Although morphological characteristics described apoptosis, it is now clear that there is a highly complex molecular process involved. Genes implicated in animal and human carcinogenesis are a significant regulators of the process of apoptosis⁶.

All the groups presented inflammatory process in lung tissue. Garçon *et al.*¹² suggest that the exposition to an associated oxidant agent to the carcinogenic ones induces greater release of pro-inflammatory mediators, contributing to the process of carcinogenesis activation. Apoptosis of structural cells is frequently observed in inflammatory lung diseases^{11,12}.

Focal inflammatory areas were frequently observed in previous studies involved experimental models of lung cancer. In this study, apoptotic cells presence in all groups may be explained by inflammatory process secondary to cancer induction method⁵.

Repair after an acute lung injury requires the elimination of inflammatory cells from the alveolar airspace or alveolar wall. Clearance of apoptotic cells has an important role in the resolution of inflammatory lung injury¹³.

The analysis of the available literature, references had not been found on the accurate reply-dose of B[a]P enough to the induction of pulmonary carcinogenesis, however it observes that at the studies which outcomes related the instillation of B[a]P to tissular alterations, molecular or genetic in the lungs, the doses had varied between 10mg/kg and 50mg/kg^{12,14}.

Benzo[a]pyrene is often used as a model compound for polycyclic aromatic hydrocarbon family, and has been shown to be a potent lung carcinogen¹⁵.

The clonal cell expansion depends of proliferating lack of control and increased incapacity of apoptosis death. Therefore, despite greatly cancer variability, apoptosis resistance is a most important characteristic of malignant tumors¹⁶.

The finds of this study showed that apoptosis suppression was connected with time and dose of carcinogenic utilized. Analysis of tumor genesis revealed that death resistance capacity can be acquired by different mechanisms, how contact with external soluble factors, especially carcinogenic agents¹⁶.

Similar results were observed by Kwon *et al.*¹⁷ after intra-tracheal injection of cadmium into both rats lungs. Authors observed a time-response decrease of apoptotic cells¹⁷.

Conclusion

Intra-pulmonary instillation of Benzo(a)pyrene induces significant decrease of apoptotic activity in lung tissue. Understand apoptotic mechanism and apoptosis-signaling molecules may lead novels strategies in lung cancer therapy.

References

1. Pei XP, Nakanishi Y, Takayama K, Bai F, Hara N. Benzo[a]pyrene activates the human p53 gene through induction of nuclear factor kappaB activity. *J Biol Chem*. 1999;274(49):35240-6.
2. Sangrajrang S, Sornprom A, Chernrungraj G, Soussi T. Serum p53 antibodies in patients with lung cancer: correlation with clinicopathologic features and smoking. *Lung Cancer*. 2003; 39:297-301.
3. Lopez-Gonzales JS, Prado-Garcia H, Aguilar-Cazares D, Molina-Guarneros JA, Morales-Fuentes J, Mandoki JJ. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxicoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer*. 2004;43:275-83.
4. World Health Organization. Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. *Rev Panam Salud Publica*. 2002;12(5):366-70.
5. Silva BAK, Silva IS, Pereira DM, Aydos RD, Carvalho PTC, Facco GG. Experimental model of pulmonary carcinogenesis in Wistar rats. *Acta Cir Bras*. 2007;22 Suppl 1:16-20.
6. Taraphdar AK, Roy M, Bhattacharya RK. Natural products as inducers of apoptosis: implication for cancer therapy and prevention. *Curr Sci*. 2001;80(11):1387-96.
7. Carnevali S, Petruzzelli S, Longoni B, Vanacore R, Barale R, Cipollini M, Scatena F, Paggiaro P, Celi A, Giuntini C. Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284:955-63.
8. Brajuskovic GR. Apoptosis in malignant diseases. *Arch Oncol*. 2005;13(1):19-22.
9. Walaszek Z, Hanausek M. Molecular markers of apoptosis as prognostic indicator in cancer. *Cell Biol Mol Lett*. 2000;5(2): 278-9.
10. Gaffney EF, O'Neill AJ, Staunton MJ. In situ end-labelling, light microscopic assessment and ultrastructure of apoptosis in lung carcinoma. *J Clin Pathol*. 1995;48:1017-21.
11. Banjerdpongchai R. Oxidative stress related apoptosis in smokers and chronic lung diseases. *Chiang Mai Med Bull*. 2006;45(4):173-84.
12. Garçon G, Gosset P, Garry S, Marez T, Hanothiaux MH, Shirali P. Pulmonary induction of proinflammatory mediators following the rat exposure to benzo(a)pyrene-coated onto Fe2O2 particles. *Toxicol Lett*. 2001;121:107-17.
13. Kwano K, Yoshimi M, Maeyama T, Hamada N, Yamada M, Nakanishi Y. Apoptosis signaling pathways in lung diseases. *J Med Chem*. 2005;1(1):49-56.
14. Rubin H. Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis*. 2001;22(12):1903-30.
15. Harrigan JA, Vezina CM, McGarrigle BP, Ersing N, Box HC, Maccubbin AE, Olson JR. DNA adduct formation in precision-cut rat liver and lung slices exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicol Sci*. 2003;77:307-14.
16. Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte celular por apoptose. *Rev Bras Cancerol*. 2007;53(3):335-43.
17. Kwon KY, Jang JH, Kwon SY, Cho CH, Oh HK, Kim SP. Cadmium induced acute lung injury and TUNEL expression of apoptosis in respiratory cells. *J Korean Med Sci*. 2003;18:655-62.

Conflict of interest: none

Financial source: none

Correspondence:

Baldomero Antonio Kato da Silva
Rua Beirute, 289
79112-150 Campo Grande – MS Brazil
fbaldock@uol.com.br

Received: August 27, 2009

Review: October 29, 2009

Accepted: November 25, 2009

How to cite this article

Silva BAK, Aydos RD, Silva IS, Pereira DM, Carvalho PTC, Dourado DM, Reis FA, Nacer RS. Lung apoptosis after intra-pulmonary instillation of Benzo[a]pyrene in *Wistar* rats. *Acta Cir Bras*. [serial on the Internet] 2010 Jan-Feb;25(1). Available from URL: <http://www.scielo.br/acb>

6. DISCUSSÃO

A relação entre hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) e câncer é conhecida e suficientemente consagrada na literatura atual. O contato com os HAP leva a alterações funcionais celulares e o desencadeamento de uma série de eventos complexos, induzindo a inflamação celular inicial e desregulação dos mecanismos de apoptose.

Em trabalhos prévios observou-se resposta inflamatória importante em fases iniciais do modelo experimental, culminando com o aparecimento de tecidos potencialmente cancerizáveis e inibição da atividade apoptótica em fases tardias da experimentação.

Segundo Kwano et al. (2005), em modelos animais de doenças, vários sinalizadores celulares são envolvidos no processo de morte celular. A apoptose secundária à inflamação, acompanhada da presença de células de proteção parenquimatosa podem ser consideradas uma estratégia preventiva em doenças inflamatórias pulmonares graves. No entanto, quando as células do parênquima pulmonar sofrem danos severos, a reposição celular pode levar à carcinogênese. No sentido de evitar-se esta situação, a inibição da apoptose em estágio iniciais e a indução da mesma em estágio posteriores da carcinogênese poderiam ser consideradas estratégias efetivas na prevenção do aparecimento de neoplasias.

Meuwissen e Berns (2005) afirma que os tumores espontâneos de pulmão em ratos são similares em morfologia, histopatologia e características moleculares dos adenocarcinomas humanos. Modelos de câncer de pulmão em ratos podem desta forma, servir como uma valiosa ferramenta não apenas para a compreensão das bases biológicas desses tumores, mas também para o desenvolvimento e validação de novas intervenções e estratégias no tratamento do câncer, bem como na identificação de marcadores para o diagnóstico precoce.

A escolha da injeção intrapulmonar via toracocentese como técnica de indução carcinogênica no modelo experimental visou a indução de uma lesão focal e localizada no tecido pulmonar dos animais utilizados. Esta metodologia,

utilizada em trabalho previamente desenvolvido, mostrou-se eficaz para este objetivo. Descartou-se a possibilidade de instilação intratraqueal do agente carcinogênico, pela impossibilidade de definição do local definitivo da deposição deste agente. (SILVA et al., 2007)

Um outro fator a ser considerado foi a utilização do pulmão esquerdo para a injeção do hidrocarboneto aromático policíclico. Nos animais utilizados neste estudo, o pulmão direito é quadrilobar, enquanto o esquerdo constitui-se de um único lobo, o que minimiza a possibilidade de erros durante o procedimento de injeção intrapulmonar, bem como o risco de lesões em outros tecidos que não o parênquima pulmonar.

Em projetos pilotos prévios à experimentação, observou-se perda de alguns animais em função de pneumotórax após a toracocentese. A ocorrência desta complicação foi anulada pela compressão localizada no local de punção imediatamente após a retirada da agulha, não tendo sido registrada a perda de nenhum animal durante a realização do experimento final deste estudo.

Estudos experimentais sugerem que alterações no DNA são fatores importantes no desencadeamento da carcinogênese. Este estudo objetivou estudar o potencial do benzo[a]pireno na tumorigênese pulmonar, bem como a relação entre a indução da carcinogênese e a resposta apoptótica celular (YANG et al., 2008).

Nossos resultados indicam relação dose-resposta e tempo-resposta importante nas alterações celulares e taxa de apoptose pulmonares em modelos experimentais de câncer de pulmão.

A apoptose tem sido relacionada a uma ampla variedade de condições patológicas, e sua redução está envolvida na patogênese do câncer e uma série de doenças autoimunes. As doenças neoplásicas são tipicamente vistas como resultados de defeitos nestas vias que levam à divisão celular excessiva, e alterações dos mecanismos apoptóticos desempenham um papel importante na carcinogênese e crescimento tumoral.

Neste estudo as células apoptóticas foram identificadas através da coloração de componentes nucleares intramembranosos celulares em um aumento de 400X. A avaliação por microscopia de luz tem sido o método padrão para investigação da apoptose. Entretanto, devido ao tamanho limitado

e distribuição tipicamente dispersa das células apoptóticas e dos corpos apoptóticos no câncer de pulmão, algumas objetivas de ampliação mais elevadas são necessárias para um estudo de rotina em microscopia óptica. (GAFFNEY, O'NEILL, STAUNTON, 1995)

O desencadeamento de um processo altamente complexo envolvendo componentes moleculares é um fato conhecido no desenvolvimento do câncer, e segundo Taraphdar, Roy e Bhattacharya (2001), os genes implicados na carcinogênese humana são normalmente reguladores importantes do processo de apoptose.

Todos os grupos apresentaram processo inflamatório no tecido pulmonar. Garçon et al. (2001b) sugerem que a exposição a um agente oxidante associado a esses cancerígenos induz a uma maior liberação de mediadores pró-inflamatórios, contribuindo para o processo de ativação da carcinogênese, sendo a apoptose um evento freqüentemente observado em doenças inflamatórias pulmonares.

Áreas focais inflamatórias foram frequentemente observadas em estudos prévios envolvendo modelos experimentais de câncer de pulmão. Neste estudo, a presença de células apoptóticas em todos os grupos poder ser explicada pelo processo inflamatório secundário ao método de indução carcinogênica. O reparo após uma lesão pulmonar aguda requer a eliminação das células inflamatórias do espaço alveolar e de sua parede, e a apoptose celular tem um papel importante na resolução dessas injúrias inflamatórias. (KUWANO et al., 2005)

O B[a]P é um dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos que demonstra um alto poder carcinogênico pulmonar. A análise da literatura disponível não demonstra com exatidão qual a dose resposta de benzo[a]pireno suficiente para indução da carcinogênese pulmonar. No entanto observa-se que estudos relacionados com a instilação de B[a]P utilizam doses variando entre 10 e 50 mg/kg. (RUBIN, 2001)

A falta de controle do crescimento e incapacidade de desencadeamento dos mecanismos de apoptose são elementos importantes no desenvolvimento do câncer de pulmão. Segundo Grivicich, Regner e Rocha (2007), a despeito

da grande variabilidade dos tipos de câncer de pulmão, a resistência à apoptose é uma característica comum nos tumores malignos.

A despeito dos avanços na capacidade diagnóstica e terapêutica do câncer de pulmão, a mortalidade parece não ter sido grandemente modificada nas últimas décadas. Estudos recentes têm insistido na importância da utilização de marcadores biológicos e moleculares no diagnóstico, delimitação prognóstica e acompanhamento de pacientes com câncer de pulmão. (PATZ et al., 2007)

Os achados deste estudo mostraram que a supressão da apoptose foi relacionada ao tempo e à dose utilizados de carcinogênico. A análise da gênese tumoral revelou que a capacidade de resistência à morte celular pode ser adquirida por mecanismos exógenos, especialmente o contato com agentes cancerígenos solúveis. Resultados semelhantes foram observados por Kwon et al. (2006) após a injeção intra-traqueal de cádmio em pulmões de ratos. Os autores observaram igualmente uma diminuição de células apoptóticas condicionadas ao tempo-resposta do agente carcinogênico.

7. CONCLUSÃO

A injeção intrapulmonar de benzo[a]pireno induziu significante decréscimo na atividade apoptótica do tecido pulmonar, observando-se variação tempo e dose dependente do grau de apoptose após a realização do experimento.

O método de avaliação utilizado para avaliação mostrou-se efetivo e facilmente aplicável na avaliação das respostas da atividade apoptótica em modelos experimentais.

O entendimento do mecanismo de apoptose e a detecção molecular precoce da apoptose celular pode levar a novas estratégias do diagnóstico e terapêutica do câncer de pulmão.

8. REFERÊNCIAS

Agen BV, Maas LM, Zwingmann IH, Schooteen FJ, Kleinjans JCS. B[a]P-DNA adduct formation and induction of human epithelial lung cell transformation. *Environ. Mol. Mutagen.* 2001; 30: 287-292.

Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 2007; 132:29-55.

Armstrong JS. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioassays* 2006; 28:253-60.

Asano H, Toyooka S, Tokumo M, Ichimura K, Aoe K, Ito S et al. Detection of EGFR gene mutation in lung cancer by mutant- enriched polymerase chain reaction assay. *Clinical Cancer Research*, 2006; 12(1): 43-48.

Barros JA, Valladares G, Faria AR, Fugita EM, Ruiz AP, Vianna AGD, Trevisan GL, Oliveira FAM. Diagnóstico precoce do cancer de pulmão: o grande desafio. Variáveis epidemiológicas e clínicas, estadiamento e tratamento. *J Bras Pneumol*, 2006; 32(3):221-227.

Belizário JE, Sherwood S, Beçak. Induction of apoptosis in câncer cells by tumor necrosis factor and butyrolactone, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Bras J Med Biol Res.* 1999; 32(4): 473-482.

Brajuskovic GR. Apoptosis in malignant diseases. *Arch Oncol.* 2005; 13(1): 19-22.

Brower V. Biomarkers studies abound for early detection of lung cancer. *Journal of National Cancer Institute*, 2009; 101(1):11-13.

Califórnia Environmental Protection Agency. Public health goals for chemicals in drinking water – Benzo(a)pyrene. California, 2010; 1-61.

Carnevali S, Petruzzelli S, Longoni B, Vanacore R, Barale R, Cipollini M, Scatena F, Paggiaro P, Celi A, Giuntini C. Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003; 284: 955-963.

Carvalho PC, Fischer JSG, Degraive WM, Carvalho MGC. Marcadores séricos e espectrometria de massa no diagnóstico de cancer. *J Bras Patol Med Lab*, 2006; 42(6):431-436.

Checinska A. Regulation of mitochondria-dependent apoptosis in non-small cell lung cancer implications for cancer therapy. Thesis. Vrije Universiteit. Amsterdam, 2007.

Douillard JY, Kim ES, Hirsh V, Mok T, Socinski M, Gervais R et al. Phase III, randomized, open-label, parallel-group study of oral gefitinib (IRESSA) versus intravenous docetaxel in patients with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer who have previously received platinum-based chemotherapy. *Ejc Supplements*, 2007; 5(6): 2.

Ekedahl J. Apoptosis signaling in lung carcinoma cells. Thesis. Karolinska Institutet. Stockholm, 2003.

Elledge MF, Nandasena S, Phillips MJ, Thornburg VE. Environmental health risk and the use of biomass stoves in Sri Lanka. *RTI Press Research Briefs*, 2010; 1-8.

Endo K, Konishi A, Sasaki H, Takada M, Tanaka H, Okumura M et al. Epidermal growth factor receptor gene mutation in non-small cell lung cancer using highly sensitive and fast TaqMan PCR assay. *Lung Cancer*, 2005; 50(3): 375-384.

Fokkema E, Timens W, Vries EGE, Jong S, Fidler V, Meijer C, Groen HJM. Expression and prognostic implications of apoptosis-related proteins in locally unresectable non-small cell lung cancers. *Lung Cancer*. 2006; 52: 241-247.

Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax Surg*. 2003; 76: 167-174.

Gaffney EF, O'Neill AJ, Staunton MJ. In situ end-labelling, light microscopic assessment and ultrastructure of apoptosis in lung carcinoma. *J Clin Pathol*. 1995; 48: 1017-21.

Garçon G, Garry S, Gosset P, Zerimech F, Martin A, Hannotiaux MH, Shirali P. Benzo(a)pyrene-coated onto Fe₂O₃ particles-induced lung tissue injury: role of free radicals. *Cancer Lett*. 2001; 167: 7-15.

Garçon G, Gosset P, Garry S, Marez T, Hannotiaux MH, Shirali P. Pulmonary induction of proinflammatory mediators following the rat exposure to benzo(a)pyrene-coated onto Fe₂O₃ particles. *Toxicol Lett*. 2001; 121: 107-17.

Garry S, Nesslany F, El Moukhtar A, Haguenoer JM, Marzin D. Potent genotoxic activity of benzo[a]pyrene coated onto hematite measured by unscheduled DNA synthesis in vivo in the rat. *Mutagenesis*. 2003; 18(5): 449-455.

Giovanetti E, Lemos C, Tekle C, Smid K, Nannizzi S, Rodrigues JA, Ricciardi S, Danesi R, Giaccone G, Peters GJ. Molecular mechanisms underlying the synergistic interaction of erlotinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with the multitargeted antifolate pemetrexed in non-small-cell lung cancer cells. *Mol Pharm*. 2008; 73(4): 1290-1300.

Gosh M, Crocker J, Morris A. Apoptosis in squamous cell carcinoma of the lung: correlation with survival and clinicopathological features. *J Clin Pathol*, 2001; 54:111-115.

Gray J, Mao JT, Szabo E, Kelley M, Kurie J, Bepler G. Lung cancer chemoprevention: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 2007; 132:56-68.

Green DR. Overview: apoptotic signalling pathways in the immune system. *Immunol Rev* 2003; 193:5-9.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte celular por apoptose. *Rev Bras Cancerol*. 2007; 53(3): 335-43.

Guerra MR, Gallo CVM, Mendonça GAS. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Rev Bras Cancerol*. 2005; 51(3): 227-234.

Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*, 2008; 319:1352-1355.

Han SW, Kim TY, Hwang PG, Jeong S, Kim J, Choi IS et al. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J Clin Oncol*, 2005; 23(11): 2493-2501.

Harrigan JA, Vezina CM, McGarrigle BP, Ersing N, Box HC, Maccubbin AE, Olson JR. DNA adduct formation in precision-cut rat liver and lung slices exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicol Sci*. 2004; 77(2): 307-314.

Henson PM, Tuder RM. Apoptosis in the lung: induction, clearance and detection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008; 294:601-611.

Hetch SS. Metabolically activated carcinogens and mutations in the p53 tumor suppressor gene in lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92(10): 782-783.

Hodkson PS, MscKinnon A, Sethi T. Targeting grow factor in lung cancer. *Chest*, 2008; 133:1209-1216.

Huang CI, Liu D, Nakano J, Yokomise H, Ueno M, Kadota K, Wada H. E2F1 overexpression correlates with thymidylate synthase and survivin gene expressions and tumor proliferation in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(23): 6938-6946.

Husari AW, Dbaibo GS, Bitar H, Khayat A, Panjarian S, Nasser M, Bitar FF, El-Sabban M, Zaatari G, Mroueh SM. Apoptosis and the activity of ceramide, Bax and Bcl-2 in the lungs of neonatal rats exposed to limited and prolonged hyperoxia. *Respiratory Research*, 2006; 7:100-111.

Ivanovic V. Aberrations of growth factor as biomarkers of cancer progression. *Arch Oncol*, 2005; 13(3-4):1221-123.

Janne PA, Borras AM, Kuang YN, Rogers AM, Joshi VA, Liyanage H et al. A rapid and sensitive enzymatic method for epidermal growth factor receptor mutation screening. *Clinical Cancer Research*, 2006; 12(3): 751-758.

Kaufmann SH and Gores GJ. Apoptosis in cancer: cause and cure. *Bioassays* 2000; 22:1007-17.

Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res*, 2004; 64(24): 8919-8923.

Kuwano K, Yoshimi M, Maeyama T, Hamada N, Yamada M, Nakanishi Y. Apoptosis signaling pathways in lung diseases. *Med Chem*. 2005; 1(1): 49-56.

Kuwano K. Epithelial cell apoptosis and lung remodeling. *Cellular & Molecular Immunology*, 2007; 4(6): 419-429.

Kwon KY, Jang JH, Choi WI, Ramachandran S, Cho CH, Cagle PT. Expression of apoptotic nuclei by ultrastructural terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling and detection of FasL, capases and PARP protein molecules in cadmium induced acute alveolar cell injury. *Toxicol*, 2006, 218(2): 197-204.

Lee P, Weerasuriya DK, Lavori PW, Quon A, Hara W, Maxim PG, Le AT, Wakelee HA, Donington JS, Graves EE, Loo BW. Metabolic tumor burden predicts for disease progression and death in lung cancer. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*, 2007; 69(2):328-333.

Lopez-Gonzales JS, Prado-Garcia H, Aguilar-Cazares D, Molina-Guarneros JA, Morales-Fuentes J, Mandoki JJ. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxicoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer*. 2004; 43:275-83.

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 2004; 350(21): 2129- 2139.

Marchetti A, Felicioni L, Buttitta F. Assessing EGFR mutations. *New England Journal of Medicine* 2006; 354(5): 526-527.

Marchetti A, Martella C, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A et al. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol*, 2005; 23(4): 857-865.

Meuwissen R, Berns A. Mouse models for human lung cancer. *Genes & Dev*. 2005; 19: 643-664.

Miller VA, Kris WG, Shah N, Patel J, Azzoli C, Gomez J et al. Bronchioloalveolar pathologic subtype and smoking history predict sensitivity to gefitinib in advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2004; 22(6): 1103-1109.

Miranda DGN, Jamnik S, Santoro IL, Uehara C. Avaliação do escarro induzido no diagnóstico do carcinoma brônquico. *Rev Bras Cancerol*. 2003; 49(2): 91-98.

Mollerup S, Ryberg D, Skaug V, Haugen A. Lung cancer susceptibility. *Norsk Epidemiol*. 2002; 12(2): 137-143.

Moore MA, Aitmurzaeva G, Arsykulov ZA, Bozgunchiev M, dikanbayeva SA, Igisinov G, Igisinov N, Igisinov S, Karzhaubayeva S, Oyunchimeg D, Oyunsuren T, Soipova M. Chronic disease prevention research in Central Ásia, the Urals, Sibéria and Mongólia – past, present and future. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2009; 10:987-996.

Nelson HH, Christiani DC, Mark EJ, Wiencke JK, Wain JC, Kelsey KT. Implications and prognostic value of K-ras mutation for early-stage lung cancer in women. *Journal of the National Cancer Institute*, 1999; 91(23): 2032-2038.

Nowaczyk R, NOwak M, Glinska-Suchocka K. Neuroendocrine pulmonary small cell carcinoma in a dog. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2009; 53:285-290.

Pacheco FA, Paschoal MEM, Carvalho MGC. Marcadores tumorais no câncer de pulmão: um caminho para a terapia biológica. *J Pneumol*, 2002; 28(3):143-149.

Paci M, Rapicetta C, Maramotti S. New biomarkers for lung cancer. *Expert Opin Med Diagn*, 2010; 4(3):201-224.

Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 2004; 304(5676): 1497-1500.

Panov, SZ. Molecular biology of the lung cancer. *Radiol Oncol*, 2005; 39(3):197-210.

Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan QL, Ladanyi M et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *Plos Medicine*, 2005; 2(1): 57-61.

Patz EF, Campa MJ, Gottlin EB, Kusmartseva I, Guan XR, Herndon JE. Panel of serum biomarkers for the diagnosis of lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2007; 25(35):5578-5583.

Pei XP, Nakanishi Y, Takayama K, Bai F, Hara N. Benzo[a]pyrene activates the human p53 gene through induction of nuclear factor kB activity. *J Biol Chem*. 1999; 274(49): 35240-6.

Phillips M, Altorki N, Austin JHM, Cameron RB, Cataneo RN, Greenberg J, Kloss R, Maxfield RA, Munaar MI, Pass HI, Rashid A, Rom W, Schmitt P. Prediction of lung cancer using volatile biomarkers in breath. *Cancer Biomarkers*, 2007; 3:95-109.

Rosell R, Ichinose Y, Taron M, Sarries C, Queralt C, Mendez P et al. Mutations in the tyrosine kinase domain of the EGFR gene associated with gefitinib response in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2005.

Rubin H. Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis*. 2001; 22(12): 1903-30.

Rubin H. Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis*. 2001; 22(12): 1903-1930.

Sadikovic B, Andrews J, Carter D, Robinson J, Rodenhiser D. Genome-wide H3K9 histone acetylation profiles are altered in benzo[a]pyrene-treated MCF7 breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008; 283(7):4051-4060.

Sangrajang S, Sornprom A, Chernrungrroj G, Soussi T. Serum p53 antibodies in patients with lung cancer: correlation with clinicopathologic features and smoking. *Lung Cancer*. 2003; 39: 297-301.

Santos SS, Silva IF, Koifman RJ, Hatagima A, Koifman S. Exposição a substâncias químicas e câncer: aspectos epidemiológicos, genéticos e moleculares. *Cad Saúde Colet*, 2008; 16(4):613-658.

Scavo LM, Ertsey R, Chapin CJ, Allen L, Kitterman JA. Apoptosis in the development of rat and human fetal lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998; 18:21-31.

Shan Y, Wang C, Yang L, Chen LJ, Deng HX, Yang HS, Li Z, Li Z, Pan L, Leng F, Wei Y. Inhibition of human lung adenocarcinoma growth using survivin34a by low-dose systematic administration. *J Biosci*, 2006; 35(2): 209-216.

Shepherd FA, Tsao MS. Epidermal growth factor receptor biomarkers in non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2010; 28(6):903-910.

Silva GA, Noronha CP, Santos MO, Oliveira JFP. Diferenças de gênero na tendência de mortalidade por câncer de pulmão nas macrorregiões brasileiras. *Rev Bras Epidemiol*, 2008; 11(3): 411-419.

Silva Júnior CT, Cardoso GP, Santos LM, Zamboni M, Araújo EG. Diferenciação neuroendócrina dos carcinomas brônquicos. *Pulmão RJ*, 2006; 15(1):39-43.

Tanaka F, Kawano Y, Li M, Takata T, Miyahara R, Yanagihara K, Ohtake Y, Fukuse T, Wada H. Prognostic significance of apoptotic index in completely resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 1999; 17:2728-2736.

Taraphdar AK, Roy M, Bhattacharya RK. Natural products as inducers of apoptosis: implication for cancer therapy and prevention. *Current Science*. 2001; 80(11):1387-96.

Taron M, Ichinose Y, Rosell R, Mok T, Massuti B, Zamora L et al. Activating mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor are associated with improved survival in gefitinib-treated chemorefractory lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*, 2005; 11(16): 5878-5885.

Toh CK, Hee SW, Lim WT, Leong SS, Fong KW, Yap SP, Hsu AA, Eng P, Koong HN, Agasthian T, Tan EH. Survival of small cell lung cancer and its determinants of outcome in Singapore. *Ann Acad Med Singapore*, 2007; 36:181-188.

Tormanen U, Nuorva K, Soini Y, Paakko P. Apoptotic activity is increased in parallel with the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence of the bronchial epithelium. *British Journal of Cancer*, 1999; 79(5/6): 996-1002.

Toronto Agency of Public Health. Benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons. Toronto, 1998; 87-95.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova*, 2007; 30(5):1323-1338.

Verhagen AM and Vaux DL. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis* 2002; 7:163-166.

Walaszek Z, Hanausek M. Molecular markers of apoptosis as prognostic indicator in cancer. *Cell Biol Mol Lett*. 2000; 5(2): 278-9.

Wang QZ, Xu W, Habib N, Xu R. Potential uses of MicroRNA in lung cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 2009; 9:572-594.

World Health Organization. Policies and managerial guideliness for national câncer control programs. *Rev Panam Salud Publica*. 2002; 12(5): 366-70

Xu M, Li D, Lu Y, Chen GQ. Leukemogenic AML1-ETO fusion protein increases carcinogen-DNA adduct formation with upregulated expression of cytochrome P450-1A1 gene. *Experimental Hematology*, 2007; 35:1249-1255.

Yang J, Wang, L, Chen Z, Shen, ZQ, Jin M, Wang XW, Zheng Y, Qiu ZG, Wang JF, Li JW. Antioxidant intervention of smoking-induced lung tumor in mice by vitamin E and quercetin. *BioMed Central Cancer*, 2008; 8:383-341.