

O MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOGENESE GÁSTRICA INDUZIDO POR N-METHYL-N-NITROSOUREA EM RATOS F344 E CAMUNDONGOS C3H É VÁLIDO PARA OS RATOS WISTAR?

Experimental model of gastric carcinogenesis with N-methyl-N-nitrosourea for F344 rats and C3H mice is valid for Wistar rats?

Lissandro **TARSO**, Fabíola Schons **MEYER**, Marta Giotti **CIOATO**, Luíse **MEURER**, Carlos Cauduro **SCHIRMER**

Trabalho realizado na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

RESUMO – Introdução: O N-metil-N-nitrosourea (MNU) tem ação cancerígena direta, induzindo tumores em várias espécies em uma variedade de órgãos, incluindo o estômago de ratos. Tratamento do MNU na água de beber por 25-42 semanas, seletivamente, induz carcinoma gástrico glandular de ratos F344 e camundongos C3H. **Objetivo:** Estabelecer um modelo experimental para indução seletiva de câncer no estômago glandular de ratos Wistar com MNU. **Métodos:** Um total de 48 ratos Wistar machos com oito semanas, foram utilizados no presente estudo. MNU (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em DMSO e liberada água potável ad libitum por um período variando de 16 a 70 semanas. Após 16 semanas, quatro ratos foram selecionados aleatoriamente e mortos. Depois, de seis em seis semanas, quatro animais também foram mortos até 70 semanas. **Resultados:** A taxa de sobrevivência foi superior a 90%. Ocorreu a indução de dois adenocarcinomas, um carcinoma espinocelular e um sarcoma. A incidência de adenocarcinoma gástrico foi de 4,5% (0,5 a 15). **Conclusões:** O modelo experimental de carcinogênese gástrica em ratos Wistar, utilizando MNU dissolvido na água, não mostrou viabilidade prática neste estudo, devido à baixa taxa de adenocarcinoma gástrico que ocorreu.

DESCRIPTORIOS - Ratos Wistar. Marcadores biológicos de tumor. Neoplasias gástricas.

Correspondência:

Lissandro Tarso,
e-mail: lissandrotarso@hotmail.com

Fonte de financiamento: não há
Conflito de interesses: não há

Recebido para publicação: 29/10/2010
Aceito para publicação: 21/12/2010

HEADINGS – Wistar Rats. Tumor markers, biological. Stomach neoplasms.

ABSTRACT - Background: The N-methyl-N-nitrosourea (MNU) is a direct acting carcinogen, inducing tumors in several species in a variety of organs, including stomach of rats. Treatment of MNU in the drinking water for 25-42 weeks selectively induced glandular gastric carcinoma in F344 rats and C3H mice. **Aim:** To establish an experimental model for selective MNU induction of glandular stomach cancer in Wistar rats. **Methods:** A total of 48 males eight-week-old Wistar rats were used in the present study. MNU (Sigma-Aldrich) was dissolved in DMSO and provided as the drinking water ad libitum for a period ranging from 16 to 70 weeks. After 16 weeks, four rats were randomly selected and killed. After every six weeks four animals were killed until 70 weeks. **Results:** Survival rate was higher than 90%. It had the induction of two adenocarcinomas, one squamous cell carcinoma and one sarcoma. The incidence of gastric adenocarcinoma was 4.5% (0.5 to 15). **Conclusions:** The experimental model of gastric carcinogenesis in Wistar rats, using MNU dissolved in water, showed not practice viability in this study due to the low rate of gastric adenocarcinoma.

INTRODUÇÃO

Desde o primeiro relato da produção experimental de adenocarcinomas do estômago glandular de ratos com N-metil-N'-nitro-N nitrosoguanidina (MNNG)^{1,6}, muitos outros mamíferos, têm se mostrado sensíveis a essa substância cancerígena, incluindo hamsters, furões e cães^{2,3}. N-metil-N-nitrosourea (MNU) tem ação cancerígena direta, induzindo tumores em várias espécies e em variedade de órgãos, incluindo o sistema nervoso central, estômago, intestino, rim e pele^{1,4,9,10}.

O camundongo e rato são particularmente úteis para estudos de espécies de carcinogênese, devido à disponibilidade de mutantes e

linhagens quiméricas transgênicas. O uso do MNU na água de beber por 25-42 semanas seletivamente induz carcinoma gástrico glandular de ratos F344 e camundongos C3H^{5,8,11,13,14,18,21}. Esses modelos animais têm sido amplamente utilizados não apenas para investigar a patogênese da carcinogênese gástrica, mas também para identificar possíveis promotores de tumor e agentes quimiopreventivos^{11,14}.

O objetivo do presente estudo foi estabelecer um modelo experimental para indução MNU seletiva de câncer no estômago glandular de ratos Wistar e descrever o tempo para obter nível de profundidade do tumor (T).

MÉTODOS

O delineamento experimental

Um total de 48 ratos Wistar machos de oito semanas foram acomodados em gaiolas plásticas (três ratos/gaiola) em ambiente com ar-condicionado e ciclo de 12 horas a claro e 12 horas no escuro. Foram aclimatados por duas semanas antes do início dos experimentos. MNU (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e estocado em lugar escuro e fresco. A solução foi diluída a 200 ppm com água imediatamente antes de usar (três vezes por semana), e liberada como água potável ad libitum em garrafas opacas para proteção contra fotólise por 16 a 70 semanas. Ração regular (Nuvilab CR-1 - Nuvital S/A) foi disponível ad libitum. Após 16 semanas, quatro ratos foram selecionados aleatoriamente e mortos, e a seguir a cada outras seis semanas quatro animais eram também mortos até 70^a. Semana. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

Os critérios de exclusão

Os animais que sobreviveram menos de 16 semanas, foram excluídos. Necrópsias foram realizadas em todos os animais que morreram.

A análise histopatológica

Os estômagos excisados foram fixados em formalina tamponada, cortado em cerca de oito bandas, e rotineiramente processados para inclusão em parafina. Os tecidos foram corados com HE para avaliação histopatológica de desenvolvimento da lesão. Lesões neoplásicas foram classificadas como adenocarcinomas, carcinoma espinocelular e sarcomas.

Análise estatística

Intervalo de confiança para proporções utilizando o Método Binomial foi aplicado para cálculo da incidência do adenocarcinoma gástrico. Teste *t* de Student foi realizado para médias das variáveis quantitativas.

RESULTADOS

Um total de 48 ratos foi usado. Quatro animais morreram antes das 16 semanas iniciais e foram submetidos à autópsia. Estas mortes foram causadas por pneumonia, e eles foram excluídos do número efetivo final. As taxas de sobrevivência foram superiores a 90%. O peso médio inicial foi de 346 ± 33 g. O ganho de peso corporal por semana durante o seguimento foi menor nos ratos que desenvolveram câncer do que naqueles que não o fizeram (2.1 g x 3,2 g, *p*=0,07). Um total de 44 animais foram mortos entre a 16^a. e 70^a. semana. Características do número efetivo de ratos estão resumidos na Tabela 1.

TABELA 1 - Características do número efetivo de ratos

Numero efetivo de Ratos	Peso corporal inicial (g)	Peso corporal final (g)	Idade final
44	346±33	469±59	50±14

Achados macro e microscópicos

A partir de semana 52^a. até a 70^a. foi encontrado infiltrado inflamatório difuso na mucosa gástrica (Figura 1). Metaplasia intestinal não foi encontrada no estômago de qualquer rato neste experimento. Em 64 semanas, uma extensa lesão na parede anterior do estômago foi encontrada e análise histopatológica revelou ser um sarcoma. Em 70 semanas, um tumor adrenal foi encontrado. No pré-estômago dos animais, apenas um carcinoma epidermóide foi encontrado na semana 22. Nas semanas 52 e 70, dois adenocarcinomas bem diferenciados foram observados no estômago glandular. Os tumores invadiram a muscular própria superficialmente (T2a) (Figura 2). A incidência de adenocarcinoma gástrico foi de 4,5% (0,5 a 15). Os achados histopatológicos para o estômago são resumidos na Tabela 2.

TABELA 2 - Achados histopatológicos do estômago

Semana	Infiltração inflamatória	Adenocarcinomas	Carcinoma escamoso	Sarcoma
22	0	0	1	0
52	2	1	0	0
58	3	0	0	0
64	1	0	0	1
70	0	1	0	0

DISCUSSÃO

Não se conseguiu confirmar que MNU na água potável pode induzir a uma alta incidência de carcinomas do estômago glandular em ratos Wistar. Apenas dois adenocarcinomas se desenvolveram nos animais que receberam 200 ppm MNU. Estudos anteriores indicam que o câncer do estômago glandular pode

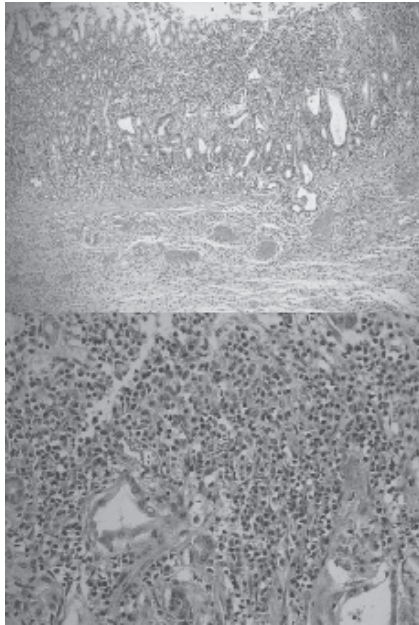


FIGURA 1 - Infiltrado inflamatório na mucosa gástrica. HE 100X (A), HE 400x (B)

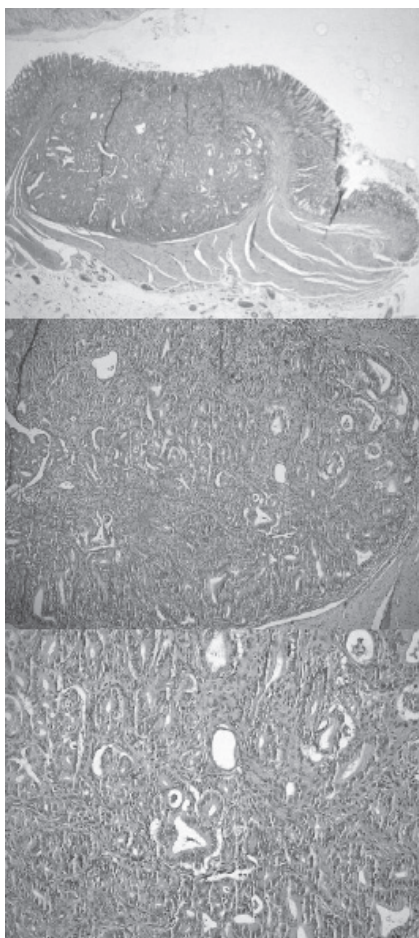


FIGURA 2 - Adenocarcinoma gástrico (T2a). HE 40X (A), ele e (B) 100X HE 400x (C)

ser produzido em ratos F344 e camundongos C3H

pela administração do MNU, um agente mutagênico utilizado amplamente. Estudos mostram que quando o MNU é administrado em água potável em período de 25 a 42 semanas, seletivamente induziu carcinoma gástrico glandular em ratos F344 e mouse C3H^{5,8,11,13,14,18,21}.

Maekava, et al.⁸ examinaram os efeitos do MNU na água potável a 100 ppm, em ratos F344. Após 42 semanas, 18% dos animais tinham adenocarcinoma gástrico. Tatematsu, et al.¹⁸ induziu câncer no estômago glandular de ratos C3H com MNU na água potável a 120 ppm por 30 semanas e obtiveram 40% de adenocarcinomas, após 54 semanas. Hirota utilizado MNU em 400 ppm, em ratos F344 por 25 semanas teve 100% de adenocarcinomas invasivos⁵. Foi usado aqui uma concentração intermediária do MNU (200 ppm), porque os estudos com as menores concentrações mostraram baixa incidência de adenocarcinoma, e maiores concentrações desenvolveram tumores avançados. O objetivo foi a obtenção de lesões precoces, a fim de descrever o tempo para obter um nível de profundidade do tumor (T).

Lee⁷ examinou os efeitos da administração concomitante de dimethylitaconate (CMS) e apresentaram aumento significativo da incidência do adenocarcinoma, que foi de 95% em comparação com 12% do grupo MNU ($p < 0,005$). Existem evidências de que a administração de cloreto de sódio potencializa os efeitos cancerígenos de MMNG no estômago do rato¹⁷. Talvez a adição desta substância com MNU poderia ter aumentado a incidência de adenocarcinoma gástrico aqui obtida.

Tatsuta et al.¹⁹ examinaram os efeitos de uma muito-baixa-proteína sobre a incidência de câncer gástrico induzido por MNNU em ratos Wistar. Administração oral de dieta com baixa proteína resultou em aumento significativo na incidência de câncer gástrico. Mecanismo desta dieta não é conhecida, mas pelo menos três maneiras possíveis podem ser consideradas.

Um deles é a imunomodulação pela proteína da dieta. Componentes da dieta pode influenciar o desenvolvimento de neoplasias por efeitos sobre o sistema imunológico. Em particular, o nível do tipo de gordura tem sido mostrado modular a resposta imune^{12,20}. Outro mecanismo é um efeito sobre a secreção de diversos hormônios, incluindo o hormônio do crescimento, hormônios da tireóide, gastrina e somatostatina^{6,15}. Hormônio do crescimento e hormônios da tireóide estão intimamente relacionados com o crescimento da mucosa gastrointestinal. Uma terceira possibilidade, é aumento na atividade do sistema nervoso simpático. A dieta influencia a atividade do sistema nervoso simpático em animais experimentais.

Há evidências de envolvimento neural no controle da proliferação celular²². Neste estudo, foi utilizada uma dieta da proteína normal.

É sabido que o MNU é cancerígeno e multipotentes; sua ação carcinogênica varia com a

raça de ratos utilizados e a via de administração⁸. Além disso, foi demonstrado que a especificidade do órgão a compostos N-nitrosos administrado por via oral é influenciada não só pela estrutura química deles ou pela linhagem de ratos utilizados, mas também pelo nível de dose dos compostos utilizados no teste⁸. Neste experimento, também foi demonstrado que a especificidade do órgão do MNU foi influenciada pela linhagem de ratos e/ou o nível da dose. Mais estudos são necessários para explicar esse fenômeno.

CONCLUSÕES

O modelo experimental de carcinogênese em ratos Wistar, utilizando-se 200 ppm do MNU dissolvido na água, não mostrou a viabilidade prática neste estudo, devido à baixa taxa de desenvolvimento de adenocarcinoma.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao apoio financeiro concedido pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

REFERÊNCIAS

- Alexandrov VA. Uterine, vaginal and mammary tumours induced by nitrosoureas in pregnant rats. *Nature* 1969; 222:1064-1065.
- Fox JG, Wishnok JS, Murphy JC, Tannenbaum SR, Correa P. MNNG-induced gastric carcinoma in ferrets infected with *Helicobacter mustelae*. *Carcinogenesis* 1993; 14:1957-1961.
- Fujimura S, Kogure K, Oboshi S, Sugimura T. Production of tumors in glandular stomach of hamsters by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. *Cancer Res* 1970; 30:1444-1448.
- Graffi A, Hoffmann F, Schutt M. N-Methyl-N-nitrosourea as a strong topical carcinogen when painted on skin of rodents. *Nature* 1967; 214:611.
- Hirota N, Aonuma T, Yamada S, Kawai T, Saito K, Yokoyama T. Selective induction of glandular stomach carcinoma in F344 rats by N-Methyl-N-nitrosourea. *Jpn J Cancer Res* 1987; 78 (7):634-638.
- Kaptein EM, Fisler JS, Duda MJ, Nicoloff JT, Drenick EJ. Relationship between the changes in serum thyroid hormone levels and protein status during prolonged protein supplemented caloric deprivation. *Clin Endocrinol* 1985; 22:1-15.
- Lee YS and Jang J. Potent promoting activity of dimethylitaconate on gastric carcinogenesis induced by N-methylnitrosourea. *Cancer Lett* 1994; 85(2):177-184.

- Maekawa A, Matsuoka C, Onodera H, Tanigawa H, Furuta K, Ogiu T, Mitsumori K, Hayashi Y. Organ-specific carcinogenicity of N-Methyl-N-Nitrosourea in F344 and ACI/N rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 1985; 109:178-182.
- Magee PN, Barnes JM. Carcinogenic nitroso compounds. *Adv Cancer Res* 1967; 10:163-246.
- Narisawa T, Wong CQ, Maronpot RR, Weisburger JH. Large bowel carcinogenesis in mice and rats by several intrarectal doses of methylnitrosourea and negative effect of nitrite plus methyleurea. *Cancer Res* 1976; 36:505-510.
- Ohgaki H, Ludeke BI, Meier I, Kleihues P, Lutz WK, Schlatter C. DNA methylation in the digestive tract of F344 rats during chronic exposure to N-methyl-N-nitrosourea. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991; 117(1):13-18.
- Olson LM, Clinton SK, Everitt JI, Johnston PV, Visek WJ. Lymphocyte activation, cell-mediated cytotoxicity and their relationship to dietary fa-enhanced mammary tumorigenesis in C3H/OJ mice. *J Nutr* 1987; 117:955-963.
- Shimizu M, Suzui M, Moriwaki H, Mori H, Yoshimi N. No involvement of b-catenin gene mutation in gastric carcinomas induced by N-methyl-N-nitrosourea in male F344 rats. *Cancer Letters* 2003; 195:147-152.
- Shimizu M, Yoshimi N, Yamada Y, Matsunaga K, Kawabata K, Hara A, Moriwaki H, Mori H. Suppressive effects of chlorogenic acid on N-methyl-N-nitrosourea-induced glandular stomach carcinogenesis in male F433 rats. *J Toxicol Sci* 1999; 24:433-439.
- Sommerville BA, Harvey S. The effect of low levels of dietary protein and calcium on growth rate, growth hormone, and vitamin D metabolism in the chicken. *Gen Comp Endocrinol* 1988; 71:93-96.
- Sugimura T and Sugimura S. Tumor production in glandular stomach of rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. *Nature* 1967; 216:943-944.
- Takahashi M, Kokubo T, Furukawa F, Kurokawa Y, Tatematsu M, Hayashi Y. Effect of high salt diet on rat gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* 1982; 3:1419-1422.
- Tatematsu M, Yamamoto M, Iwata H, Fukami H, Yuasa H, Tezuka N, Masui T, Nakanishi H. Induction of glandular stomach cancers in C3H mice treated with N-methyl-N-nitrosourea in the drinking water. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84:1258-1264.
- Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Uehara H, Nakaizumi A, Taniguchi H. Enhanced induction of gastric carcinogenesis by N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats fed a low-protein diet. *Cancer Research* 1991; 51:3493-3496.
- Thomas IK and Erickson KL. Lipid modulation of mammary tumor cell cytotoxicity: direct influence of dietary fats on the effector component of cell-mediated cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 1985; 74:675-680.
- Yamachika T, Nakanishi H, Inada K, Tsukamoto T, Shimizu N, Kobayashi K, Fukushima S, Tatematsu M. N-Methyl-N-Nitrosourea concentration-dependent, rather than total intake-dependent, induction of adenocarcinoma in the glandular stomach of BALB/c mice. *Jpn J Cancer Res* 1998; (89):385-391.
- Young JB, Kaufman LN, Saville ME, Landsberg L. Increased sympathetic nervous system activity in rats fed a low-protein diet. *Am J Physiol* 1985; 248:R627-R637.