

Os Compostos N-Nitroso e o Cancro

MARIA EDUARDA ARAUJO, LUISA CYRNE, H. SUSANA MARINHO e FÁTIMA NORBERTO*

Neste artigo faz-se uma breve revisão do envolvimento dos compostos N-nitroso na carcinogénese. É feita igualmente uma breve abordagem dos testes que permitem detectar se um dado composto químico é cancerígeno ou mutagénico.

INTRODUÇÃO

Como é do conhecimento comum, muitos compostos químicos podem ser a causa primária de desenvolvimento do cancro, denominando-se cancerígenos químicos. De acordo com a International Agency for Research on Cancer (IARC), "Carcinogénese química é a indução por compostos químicos de neoplasmas que não são normalmente observados, a indução de neoplasmas, que são normalmente observados, num período de tempo mais curto, e a indução de mais neoplasmas do que aqueles que são normalmente observados" [1].

As primeiras observações que um aumento na incidência de cancro estava relacionada com a exposição de seres humanos a certas substâncias químicas foram feitas independentemente por dois médicos ingleses, John Hill (1761) e Sir Percival Pott (1775). Hill observou um aumento do cancro do nariz nos utilizadores de rapé e Pott observou que homens que tinham sido limpa-chaminés quando crianças/adolescentes tinham uma maior incidência de cancro da pele do escroto [2]. Mais tarde foram feitas outras associações entre a exposição a compostos químicos e a carcinogénese. Assim, por exemplo, o cancro de pele, que é corrente nos trabalhadores da indústria do carvão e do creosoto, está claramente associado à exposição aos compostos polinucleares e o cancro de bexiga, frequente nos trabalhadores da indústria de tintas e borrachas, está associado à exposição à 2-naftilamina, benzidina e outras aminas aromáticas [3].

A carcinogénese química tornou-se uma ciência experimental em

1918, quando foi publicado o primeiro estudo que referia que se podia induzir tumores na pele de coelhos e murganhos através da aplicação repetitiva de alcatrão de carvão [4].

FASES DA CARCINOGENESE QUÍMICA

O processo de carcinogénese é um processo multifásico podendo-se considerar pelo menos três fases discerníveis, a **iniciação**, a **promoção** e a **progressão**. A primeira indicação de que este processo se poderia dividir em fases surgiu dos estudos pioneiros de Berenblum e Shubik (1947) [5], que demonstraram que a indução de carcinomas na pele do murganho podia ser separada em duas fases distintas. Alguns aspectos da experiência básica de Berenblum e Shubik estão apresentados em diagrama (Figura 1). Estes investigadores demonstraram que a fase da carcinogénese a que deram o nome de **iniciação** podia ser induzida por uma única aplicação de uma dose relativamente pequena de um cancerígeno (benz[a]pireno). Após esta fase, se os animais não fos-

sem sujeitos a qualquer outro tratamento, não se formavam tumores (Figura 1, linha 1). Se, subsequentemente, fosse aplicado repetidamente um outro composto, (óleo de cróton) resultavam tumores (Figura 1, linha 2). A este segundo composto foi dado o nome de **promotor** e ao processo em si promoção. O processo de iniciação parece ser irreversível, contrariamente à promoção, uma vez que se formam tumores mesmo quando o tempo entre a aplicação do iniciador e a aplicação do promotor é muito grande (Figura 1, linha 3). Por outro lado, a iniciação deve preceder a fase de promoção (Figura 1, linha 4). Existem alguns compostos cuja aplicação repetida resulta em carcinomas da pele. Estes compostos são conhecidos por cancerígenos completos, pois são capazes tanto de iniciação como de promoção. Os estudos de Miller e Miller [6] demonstraram que os cancerígenos iniciadores são compostos electrófilos, ou então compostos, que ao serem desintoxicados pelo sistema do citocromo P450, formam compostos electrófilos, capazes de reagir com o DNA, sendo pois frequentemente mutagénicos.

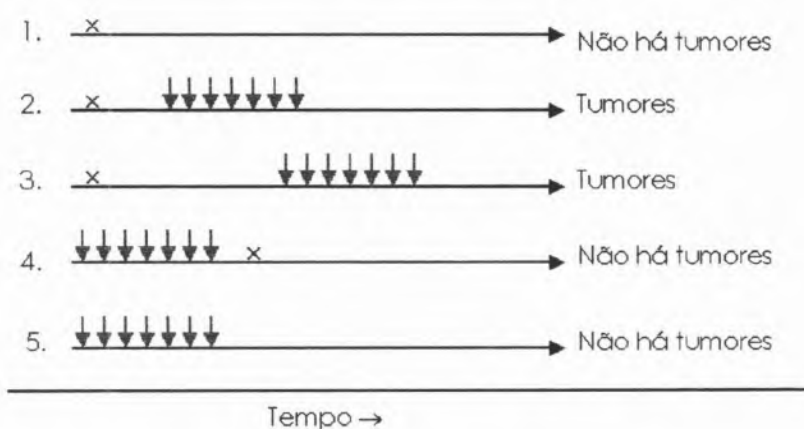


Fig. 1 - Diagrama representativo das experiências feitas por Berenblum e Shubik na pele do murganho (adaptado de [7]). X = iniciador; ↓ = promotor. Os compostos usados foram o benz[a]pireno (iniciador) e o óleo de croton (promotor). 1. Aplicação única do iniciador; 2. Aplicação única do iniciador seguida de repetidas aplicações do promotor com intervalos de duas semanas durante diversos meses; 3. Aplicação única do iniciador seguida de aplicação do promotor duas vezes por semana após um intervalo de diversos meses; 4. Aplicação do promotor repetidamente com intervalos de duas semanas durante diversos meses, seguida de uma aplicação única do iniciador; 5. Aplicação do promotor repetidamente com intervalos de duas semanas durante diversos meses.

Desde as experiências iniciais de Berenblum e Shubik foram definidas outras fases do processo de cancerígenes. Em 1954, Foulds formulou uma extensão do conceito de duas fases e propôs o nome de progressão para a fase da carcinogénese em que os neoplasmas são transformados de uma forma benigna numa forma maligna [8].

COMPOSTOS ORGÂNICOS N-NITROSADOS COMO CAUSADORES DO CANCRO

Em 1956, Magee e Barnes publicaram o primeiro estudo em que se relacionava e se comprovava inequivocamente que a administração a ratos no laboratório de N-nitrosodimetilamina (DMN) em pequenas doses diárias (50 ppm misturados com a alimentação) provocava o aparecimento de tumores no fígado no período máximo de 1 ano [9]. Este facto vinha de encontro a relatos de envenenamento de trabalhadores expostos à DMN em laboratórios industriais. Em ratos de laboratório uma dose única de 25 mg/kg de DMN tomada oralmente ou por via intravenosa era responsável pela necrose do fígado e rins e levava à morte em 2 a 4 dias. Preocupante foi a observação de que uma única dose de DMN inferior à dose letal, embora não provocasse inicialmente quaisquer danos visíveis nos rins, levava ao aparecimento, a médio prazo, de tumores nestes órgãos [9]. No entanto, nem todas as N-nitroso-aminas são cancerígenas, verificando-se que a N-nitrosometil-terc-butilamina, a N-nitroso-etil-terc-butilamina e a N-nitrosodibenzilamina, entre outras, não têm a capacidade de induzir tumores. A falta de capacidade de induzir tumores por parte destes compostos foi explicada através de um mecanismo que postula a hidroxilação no carbono α seguida de decomposição originando um diazoalcano. Este diazoalcano seria o responsável pela indução do tumor, não tendo

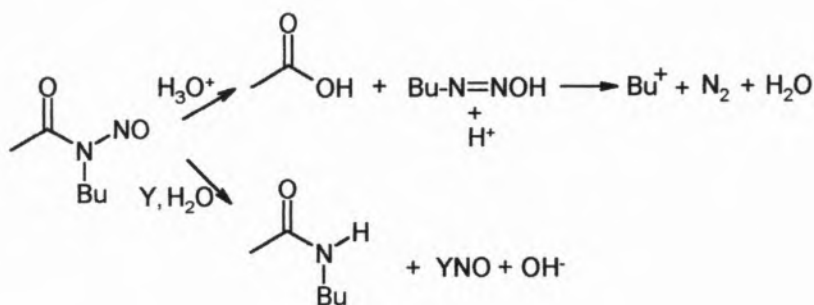
as N-nitroso-aminas atrás referidas essa possibilidade [10].

Outros compostos N-nitroso, como por exemplo, as N-nitroso-amidas também estão associados ao aparecimento de carcinomas. Por exemplo, após a administração de N-nitroso-N-metilureia foram observadas lesões inflamatórias hemorrágicas no estômago, intestino e pâncreas, antecedendo o aparecimento de carcinomas [9].

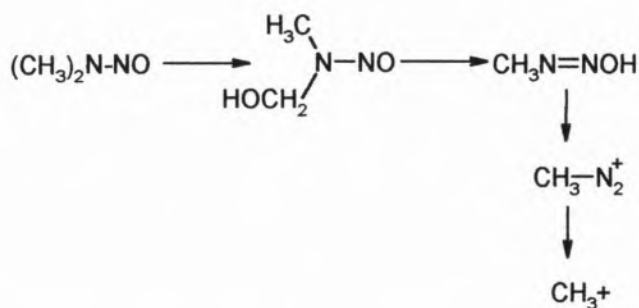
As N-nitroso-aminas e N-nitroso-amidas são responsáveis pelo aparecimento de carcinomas em diversos órgãos, variando o órgão afectado com o composto administrado [10]. Comparando as estruturas e actividades cancerígenas conhecidas de vários compostos N-nitrosados, algumas conclusões emergiram: as N-nitrosodialquilaminas não produzem tumores na zona de aplicação, mas sim em órgãos distantes, órgãos esses onde possivel-

mente existe capacidade de promover a hidroxilação no carbono do composto nitrosado; as N-nitroso-amidas produzem apenas tumores no local de aplicação [10].

Este último facto será provavelmente devido à menor solubilidade das N-nitroso-amidas em meio aquoso, o que faz com que estes compostos não sejam transportados para longe do local de aplicação e, portanto, os diazoalcanos responsáveis pela carcinogénese sejam produzidos nesse mesmo local. Sabe-se que, enquanto as N-nitroso-amidas se hidrolisam dando origem a diazoalcanos (Esquema 1), as N-nitroso-aminas requerem activação metabólica promovida pelo sistema enzimático dependente do citocromo P450 situado no retículo endoplasmico (fracção microssomal) para formar N-nitroso-hidroxiaminas (Esquema 2). Estas decompõem-se espontaneamente formando alquildiazo-hidró-



Esquema 1 - Hidrólise de N-nitroso-amidas. Y=Cl⁻, SCN⁻, H₂O



Esquema 2 - Metabolização de N-nitroso-aminas.

xidos. Por sua vez estes derivados ou alquilam directamente nucleófilos do DNA ou formam diazoalcanos, que são por si igualmente alquilantes. Estas espécies catalisam alterações de um local específico da hélice dupla do DNA, nas posições N⁷ da guanina, N¹ da adenina e O⁶ da guanina, podendo provocar assim importantes mutações responsáveis pela iniciação da carcinogénese.

A UBIQUIDADE DOS COMPOSTOS N-NITROSO

Os compostos N-nitroso são sem dúvida uma das classes mais comuns de agentes cancerígenos, podendo o homem contactar com eles por exposição quer exógena quer endógena. A exposição exógena pode surgir do contacto com o fumo do tabaco, que contém N-nitrosaminas voláteis, ou da ingestão de diversos produtos alimentares que contêm N-nitrosaminas não voláteis [11]. Por exemplo, as concentrações destes compostos são da ordem dos 100 µg/kg no *bacon* frito e variam entre 5 e 70 µg/l na cerveja [11]. Entre os compostos identificados contam-se a N-nitrosoprolina e a N-nitrososarcosina [12].

A exposição exógena a certos compostos N-nitroso tem vindo a decrescer mas o mesmo não se poderá dizer da exposição endógena a estes compostos. Com efeito, estes podem ser formados endogenamente através de reacção catalisada pelo ácido nítrico, por transnitrosação [13,14] ou por reacção com diversos gases contendo azoto.

A reacção via ácido nítrico (HNO₂) é a mais conhecida, sabendo-se que este agente é formado *in situ* no meio ácido do estômago a partir de nitrito de sódio. O nitrito pode estar presente no estômago não só porque é usado como aditivo alimentar, mas também porque pode ser formado a partir do nitrato pela acção redutora de microorganismos desnitrificantes presentes na saliva [12]. Um outro agente nitrosante bastante importante é o óxido

nítrico¹ (•NO), que se forma *in vivo* pela acção dos sintases do óxido nítrico, enzimas essas que podem ser induzidos em situações de inflamação como as provocadas por alguns microorganismos (por exemplo, *Shistosoma hematobium* e *Helicobacter pylori*) [15,16]. Em condições aeróbias, o óxido nítrico oxida-se a NO₂ (dióxido de azoto), que por sua vez pode dimerizar a N₂O₄ (tetróxido de azoto) ou combinar-se com outra mole de •NO e formar N₂O₃ (trióxido de azoto) [17].

A possibilidade de ocorrência de reacções de nitrosação depende não só dos agentes nitrosantes, como também e acima de tudo da estrutura dos substratos. Sabe-se que as amins só são nitrosadas por meio do trióxido de azoto, que está em equilíbrio com o ácido nítrico (Equação 1). Esta reacção pode ser acelerada pela presença de catalisadores como o ião iodeto ou o ião tiocianato, tendo este processo particular relevância devido à presença de iodeto no suco gástrico, e de tiocianato na saliva de fumadores (Equação 2). Quando temos substratos mais fracamente básicos, como as amidas, estas só reagem

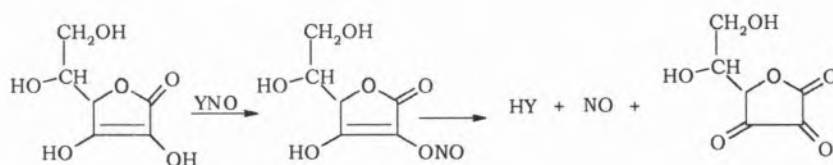
com ácido nítrico protonado, numa reacção para a qual não se conhece qualquer catalisador (Equação 3) [17, 18].

A ocorrência das reacções de nitrosação, pode ser evitada tornando as amins inertes à nitrosação, por exemplo, protonando-as, ou, dado o limitado sucesso deste método, recorrendo ao uso de antioxidantes como o ácido ascórbico (vitamina C) ou o α-tocoferol (vitamina E), os quais são inibidores da nitrosação. Estes agentes reagem com o nitrito transformando-o em •NO, não reactivo nas condições em causa (Esquema 3) [19].

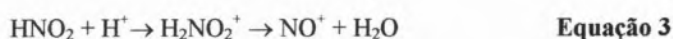
AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS N-NITROSO COMO AGENTES MUTAGÉNICOS E CANCERIGENOS

Para a avaliação do risco do contacto do homem com os compostos N-nitroso do ponto de vista da mutagénese/carcinogénese é fundamental ter em atenção os seguintes aspectos:

1. A formação de derivados



Esquema 3. Reacção do ácido ascórbico com agentes nitrosantes. Y=Cl⁻, SCN⁻, H₂O



N-nitroso e mecanismos da sua formação.

2. As reacções sofridas pelos derivados N-nitroso e possível formação de agentes electrófilos/alquilantes.

3. A capacidade dos derivados N-nitroso de serem genotóxicos.

A determinação da capacidade dos derivados N-nitroso de serem genotóxicos é importante, pois dá-nos a possibilidade de prever se o agente pode, ou não, ser um potencial cancerígeno. Com o objectivo de se avaliar o potencial genotóxico de certos compostos químicos, foram desenvolvidos diversos tipos de testes que se subdividem em duas grandes classes [20]:

1. testes de longo termo, ou testes de carcinogénese, que envolvem a administração do composto químico a testar a um elevado número de animais de laboratório. Estes animais são observados durante um grande período de tempo, para a detecção de eventuais lesões fisiológicas, como, por exemplo, a formação de tumores. Estes ensaios apesar de uma elevada sensibilidade têm como inconvenientes a baixa especificidade e o serem muito morosos.

2. testes de curto termo, ou testes de genotoxicidade, que utilizam como modelos biológicos uma variedade de organismos tais como bactérias, fungos e linhas celulares de mamíferos, e permitem prever os possíveis efeitos mutagénicos dos compostos químicos em estudo. Estes testes são mais simples, menos dispendiosos e mais rápidos que os anteriores, e possibilitam a determinação dos mecanismos de lesão no genoma. Apresentam como desvantagem o facto de não detectarem cancerígenos não genotóxicos.

Os testes de curto termo, baseiam-se no facto de num organismo poderem ocorrer mutações genéticas espontaneamente ou por indução. As mutações induzidas podem surgir quando o organismo é exposto a um agente mutagénico, ocorrendo estas com maior frequên-

cia do que as mutações espontâneas. Utilizando diversos sistemas celulares, tais como leveduras e bactérias, é possível detectar/identificar os mutantes induzidos através de alterações fenotípicas. O teste de curto termo mais usado foi desenvolvido por Bruce Ames, designando-se por isso como **teste de Ames** [21]. O teste de Ames utiliza várias estirpes mutantes de *Salmonella typhimurium*, estirpes essas que não possuem a capacidade de biossintetizar histidina (ou seja, são auxotróficas para a histidina), não tendo portanto a capacidade de crescer em meio sem histidina. O tratamento das células com um agente mutagénico poderá induzir mutações que reverterem as mutações anteriores (mutantes revertentes), de modo a que a célula passa a ter capacidade de sintetizar histidina. Os mutantes induzidos que reverterem as mutações iniciais são quantificáveis, pois passam a poder crescer num meio deficiente em histidina. Como foi referido anteriormente, nem todos os compostos são por si só mutagénicos, mas alguns deles ao serem metabolizados podem originar compostos reactivos que vão danificar o DNA. Por essa razão, uma vez que neste tipo de testes se utilizam microorganismos, que não têm capacidade de metabolizar compostos pré-genotóxicos, é frequente adicionar-se à suspensão de células em estudo a fracção microsomal de fígado de murganho (fracção S9), que contém o sistema enzimático dependente do citocromo P450. Com o teste de Ames, ou com outro tipo de teste análogo, um composto é considerado mutagénico caso induza um aumento no número de mutantes revertentes de pelo menos 1,5 a 2 vezes o número de espontâneos, observando-se simultaneamente um efeito dose-resposta.

Ainda na categoria de testes a curto termo, têm sido desenvolvidos ensaios que utilizam linhas celulares de mamíferos, às quais se adiciona o composto químico em estudo, observando-se qual o efeito que eles produzem nas funções celulares. Nestes

testes o que se vai detectar/medir é o aparecimento de células morfologicamente alteradas. Neste tipo de ensaios a utilização de linhas celulares humanas minimiza as variações de espécie; no entanto, uma vez que não há activação metabólica dos compostos nas células em cultura, (pois as células em cultura perdem o sistema enzimático dependente do citocromo P450) alguns dos resultados podem aparecer como falsos negativos.

Tal como já foi referido atrás, o estabelecimento da correlação entre dados de mutagenicidade e cancerogenicidade apresenta algumas limitações. Os cancerígenos epigenéticos não actuam directamente sobre o DNA, actuando através de mecanismos diferentes, que incluem a promoção de processos neoplásicos, e portanto apresentam um resultado negativo em testes que determinam a reactividade face ao DNA. As limitações de cada um destes testes, nomeadamente quanto à interpretação final dos resultados, levam a que seja conveniente a utilização de vários deles para uma melhor avaliação das qualidades do composto.


* Departamento de Química e Bioquímica,
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa,
Rua Ernesto de Vasconcelos, C1, Piso 5,
1749-016 Lisboa


¹ A nomenclatura IUPAC para o NO é monóxido de azoto, mas na literatura científica em bioquímica é usado, quase exclusivamente, o termo óxido nítrico.

BIBLIOGRAFIA

1. International Agency for Research on Cancer (IARC) *IARC Monograph on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*, Vol.29, p.16, IARC, Lyon, 1982.
2. R.C. Smart, (P.E. Levi, E. Hodgson, editores) *Introduction to Biochemical Toxicology*, pp.381-414, Norwalk, Appleton & Lange, 1994.

3. W. Lijinsky, S. S., Epstein, *Nature* **225** (1990) 21.
4. K. Yamagiwa, K. Ichikawa, *J. Cancer Res.* **3** (1918) 1.
5. I. Berenblum, P.A. Shubik, *Br. J. Cancer* **1** (1947) 383.
6. J.A. Miller, E. Miller, *Prostaglandins Relat. Lipids* **1** (1982) 81.
7. H.C. Pitot, *Annu. Rev. Med.* **30** (1979) 25.
8. L. Foulds, *Cancer Res.* **14** (1954) 327.
9. P. N. Magee, J. M. Barnes, *Adv. Cancer Res.* **10** (1967) 163.
10. H. Low, *Arch. Env. Health* **29** (1974) 257.
11. W. Lijinsky, *Mutat. Res.* **443** (1999) 129.
12. S. Mirvish, *Toxicol. Applied Pharmacol.* **31** (1975) 325.
13. G. Scorza, D. Pietraforte, M. Minetti *Free Radic. Biol. Chem.* **22** (1997) 633.
14. D. Tsikas, J. Sandman, S. Rossa, F.M. Gutzki, J.C. Frolich *Anal. Biochem.* **270** (1999) 231.
15. C. Nathan, C.-W. Xie, *Pharmaceutical Res.* **6** (1989) 651.
16. S. James, *Microbiological Rev.* **59** (1995) 533.
17. L. H. Williams, *Nitrosation*, Cambridge University Press, Cambridge, 1987.
18. B.C. Challis, *Acta Cientifica Compositellana* **19** (1980) 55.
19. S.R. Tannenbaum, J. Wishnok, C. Leaf, *Am. J. Chem. Nutrition* **53** (1991) 247S.
20. R.J.B. King, *Cancer Biology* Singapore: Longman 1996.
21. B. N. Ames (A. Hollaender, Editor), *Chemical mutants, principles and methods for their detection.*, vol. 1, pp. 267-282, Plenum: New York, 1971.

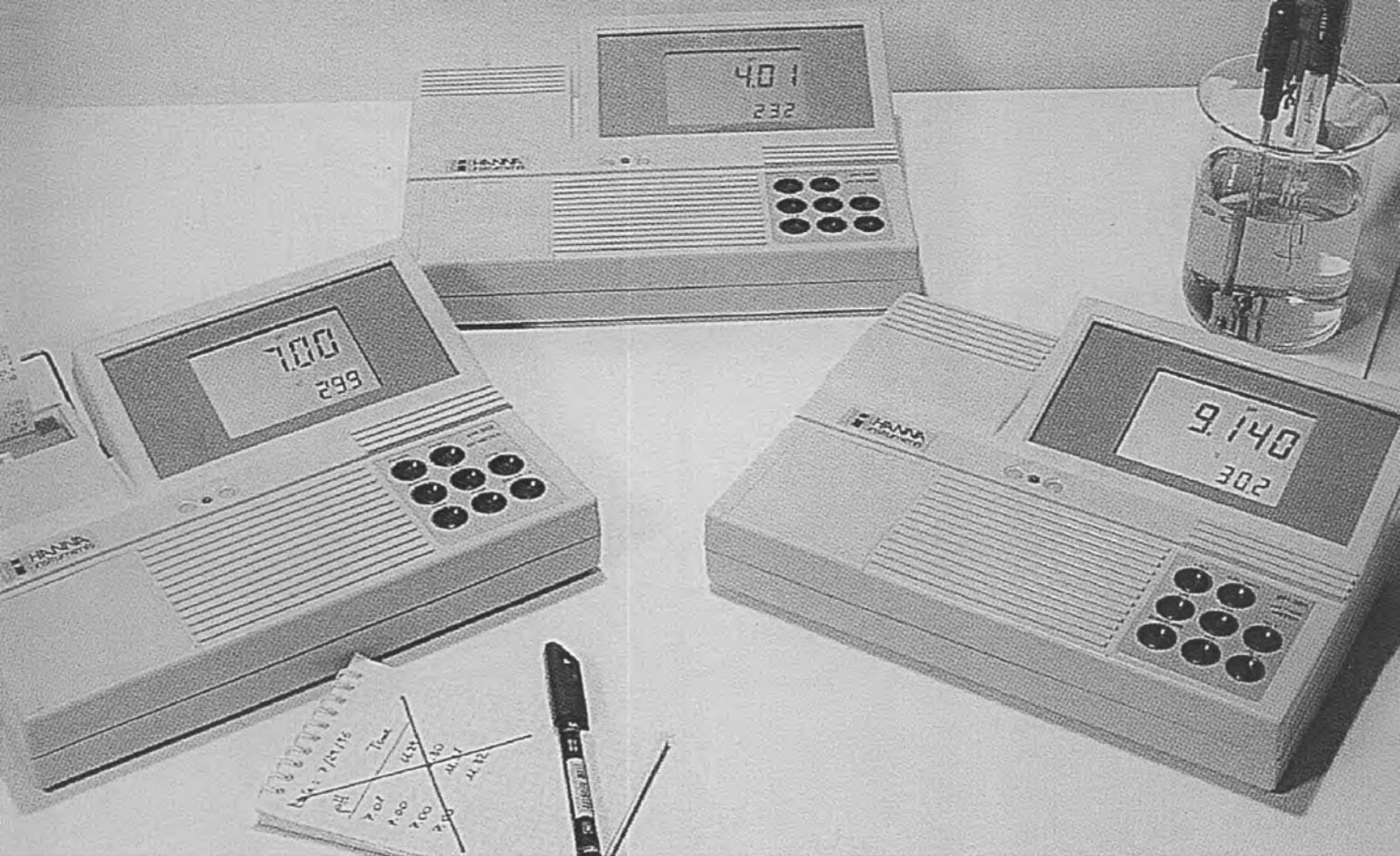
| | |
|---|--|
| Instituto Português da Qualidade <small>Ministério de Indústria e Energia</small> | <small>PORTUGUESE INSTITUTE FOR QUALITY Rua C.ª Avenida dos Três Vales 2820 SICHTE DA CAPARICA Portugal Tel (01) 294 81 00 Fax (01) 294 81 01</small> |
| CERTIFICADO DE CONFORMIDADE | <small>NÚMERO</small> |
| <small>96/CEP.410</small> | |
| O INSTITUTO PORTUGUÊS DA QUALIDADE certifica que o Sistema da Qualidade da | |
| SOQUÍMICA - SOCIEDADE DE REPRESENTAÇÕES DE QUÍMICA, LDA. Rua Coronel Santos Pedroso, 15 1500 LISBOA PORTUGAL | |
| implantado na comercialização, manutenção e calibração de equipamentos de laboratório, cumpre os requisitos da Norma Portuguesa NP EN ISO 9002 - "Sistemas da Qualidade. Modelo de garantia da qualidade na produção, instalação e assistência após venda". | |
| O presente certificado é emitido ao abrigo do Decreto-Lei n.º 234/93 de 2 de Julho, e de acordo com a Directiva CNQ 22 - "Certificação de sistemas da qualidade de empresas. Metodologias e regras gerais". | |
| A presente certificação é válida por um período de três anos, renovável. | |
| Monte de Caparica, 18 de Junho de 1996 | |
|  | |
| Cândido dos Santos Presidente | |



SOQUÍMICA

Sociedade de Representações e Química, Lda.

Rua Coronel Santos Pedroso, 15 • 1500 LISBOA • Tel.: 716 51 60 • Fax: 716 51 69
Sede Social: Av. da Liberdade, 220-2º • 129 LISBOA CODEX
Rua 5 de Outubro, 269 • 4100 PORTO • Tels.: 609 30 69 • Fax: 600 08 34
Email: soquimica@mail.telepac.pt; Internet: www.soquimica.pt



MEDIDORES DE pH DE ALTA TECNOLOGIA FÁCEIS DE USAR E ECONÓMICOS

pH 300

Medidor de pH/mV/°C de bancada

pH 301

Medidor de pH/mV/iões/°C de bancada

pH 302

Medidor de pH/mV/°C de bancada
com impressora

De acordo com as GLP

From

HANNA
instruments
ISO 9000 CERTIFIED

... of course

Dos 700 funcionários do grupo Hanna,
130 estão ao seu serviço em Portugal.

**PARA MAIS INFORMAÇÕES CONTACTE O NOSSO REVENDEDOR HANNA OU
HANNAPRO EM VILA DO CONDE ATRAVÉS DO TEL. 052 637 184 / FAX 052 637 185**