



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

COMPARAÇÃO DA MARCAÇÃO NUCLEAR PARA EVIDENCIAÇÃO DE ADN

MESTRADO EM PATOLOGIA EXPERIMENTAL

TATIANA FILIPA ALVES SOARES

Coimbra, Julho de 2013

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para o cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Patologia Experimental, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Carlos Manuel Costa Almeida (Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita (Universidade de Coimbra)

Agradecimentos

Um especial agradecimento ao meu Orientador, Prof. Doutor António Manuel Silvério Cabrita, pelo apoio e ajuda incondicional na realização deste trabalho.

Ao Dr. Rodrigo Farinha, por todos os seus ensinamentos transmitidos e pela disponibilidade.

Quero também agradecer ao Dr. Gustavo Barandas, ao Mestre Eng. José Cabeças, ao Dr. Eduardo Costa e à Dr^a. Rita Silva, pela ajuda e disponibilidade que me foi dada na realização deste trabalho.

À minha família ...

Índice

Lista de Figuras	IX
Lista de Tabelas	X
Lista de Gráficos	XI
<i>Introdução</i>	<i>1</i>
Anatomia do fígado	2
Carbaril	8
Etanol	11
Ácidos nucleicos	18
Princípios sobre Hematoxilina-Eosina	19
Princípios sobre a reacção de Feulgen	21
<i>Análise morfométrica</i>	<i>26</i>
<i>Material e Métodos</i>	<i>27</i>
<i>Resultados</i>	<i>30</i>
<i>Discussão</i>	<i>35</i>
<i>Conclusões</i>	<i>37</i>
<i>Bibliografia</i>	<i>38</i>

Lista de Figuras

Figura 1 - Imagem histológica do grupo controlo da coloração H&E.....	30
Figura 2 - Imagem histológica do grupo teste 1 (carbaril) da coloração H&E.....	31
Figura 3 - Imagem histológica do grupo teste 2 (vinho) da coloração H&E.....	31
Figura 4 - Imagem histológica do grupo controlo da coloração Feulgen.....	31
Figura 5 - Imagem histológica do grupo teste 1 (carbaril) da coloração Feulgen.....	32
Figura 6 - Imagem histológica do grupo teste 2 (vinho) da coloração Feulgen.....	33

Lista de Tabelas

Tabela I - Protocolo usado para a coloração H&E.....	27
Tabela II - Protocolo usado para a coloração de Feulgen.....	27
Tabela IV - Média e desvio padrão do tamanho dos núcleos medidos após a coloração H&E.....	30
Tabela V - Média e desvio padrão do tamanho do ADN medido após a reacção de Feulgen.....	31
Tabela VI - Média e desvio padrão do tamanho do DNA medido após a reacção de Feulgen.....	32
Tabela VII - Resultados comparativos dos diferentes grupos para cada uma das colorações realizadas.....	33

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Representação da Tabela IV	30
Gráfico 2 - Representação da Tabela VI.....	31
Gráfico 3 - Representação esquemática da Tabela VII.....	34

Abstract

The liver is the largest gland in the human body, having an endocrine and exocrine component. This organ performs several important functions, such as storage and release of glucose, lipid metabolism and protein, synthesis of most plasma proteins, hormones and drug processing; destroys the old red blood cells or abnormal, transforming hemoglobin in bilirubin; it stores vitamins and minerals; regulate blood volume and has a significant antitoxic action against harmful substances to the body.

In the cell nucleus is about 99% of the cellular DNA, containing the genetic information of the individual (excluding mitochondria) and having the ability to transmit it to their offspring.

In this work we used Wistar rat liver tissue. The control group consisted of 10 blocks of paraffin Wistar rat liver without any manipulation with 28 weeks. The test group I consisted of 10 paraffin blocks with Wistar rat liver at 28 weeks who were given carbaryl. The test group II consisted of 10 paraffin blocks with Wistar rat liver at 28 weeks who were given red wine. Through the realization of two histochemical staining, Hematoxylin & Eosin and the Feulgen's reaction we compared the results obtained after quantification of DNA using the computer program "ImageJ" to measure where the quantity of DNA is greater.

Through the analysis of the results suggests that the smaller cores may have a high concentration of DNA.

Resumo

O fígado é a maior glândula do corpo humano, tendo uma componente endócrina e outra exócrina. Este órgão desempenha várias funções muito importantes, como: o armazenamento e libertação da glicose; metabolismo de lípidos e de proteínas; síntese da maioria das proteínas plasmáticas; processamento de drogas e hormonas; destrói os glóbulos vermelhos velhos ou anormais, transformando a hemoglobina em bilirrubina; armazena vitaminas e minerais; regula o volume sanguíneo e tem uma importante acção antitóxica contra substâncias nocivas ao organismo.

No núcleo das células encontra-se cerca de 99% do ADN celular, contendo a informação genética de cada indivíduo (excluindo as mitocôndrias) e tendo a capacidade de transmiti-la à sua descendência.

Neste trabalho foi usado tecido hepático de rato Wistar. O grupo controlo consistiu em 10 blocos de parafina com fígado de rato Wistar, sem qualquer manipulação, com 28 semanas. O grupo teste I foi constituído por 10 blocos de parafina com fígado de rato Wistar com 28 semanas a quem foi administrado carbaril. O grupo teste II foi constituído por 10 blocos de parafina com fígado de rato Wistar com 28 semanas a quem foi administrado vinho tinto. Através da realização de duas colorações histoquímicas, Hematoxilina & Eosina e a reacção de Feulgen, são comparados os resultados obtidos após quantificação do ADN, usando para tal um programa informático, "ImageJ", de forma a concluir-se onde existe maior quantidade de ADN.

Da análise dos resultados obtidos, sugere-se que os núcleos mais pequenos possam ter uma grande concentração de ADN.

Introdução

A Patologia Experimental consiste no estudo da Patologia usando modelos que simulam os quadros patológicos humanos ou modelos com um comportamento completamente diferente. Procura-se, estudar a etiopatogenia, a semiologia, a prevenção e o tratamento.

O modelo experimental é todo o sistema biológico ou não biológico que reproduz, no todo ou em parte, um acontecimento biológico ou biopatológico, com potencial para ser aplicado na patologia humana [1].

Nos dias de hoje é indispensável o recurso às técnicas da Anatomia Patológica, para rastreio, diagnóstico ou avaliação de terapêuticas e prognóstico das mais diversas patologias.

É de salientar que os bons resultados dependem não só da experiência e aptidão do técnico de Anatomia Patológica, como da qualidade e inovação dos equipamentos e materiais utilizados no laboratório.

[1] Cabrita, A.S. : Introdução à Patologia Experimental - Conceitos Gerais, 2011.

Anatomia do fígado

O fígado é o maior órgão do corpo humano, encontrando-se localizado no quadrante superior direito do abdômen, apoiado contra a face inferior do diafragma [2].

A representação do fígado de rato é feita em quatro lobos: mediano (ML), lateral esquerdo (ALV), lateral direito (MID) e caudado (CL) [3].

Os vários vasos, canais e nervos que entram e saem do fígado confluem para o hilo hepático, que se encontra localizado na face inferior do fígado: a veia porta, a artéria hepática e um pequeno plexo nervoso [1].

O citoesqueleto do hepatócito consiste em três grandes redes filamentosas: os microtúbulos, a actina e a citoqueratina [4].

Os microtúbulos são constituídos por unidades de repetição de heterodímeros de α - e β - tubulina, que formam protofilamentos, que se reúnem em tubos ocos que consistem em 13 protofilamentos dispostos em paralelo. Os microtúbulos existem tanto em polímeros dinâmicos como estáveis, sendo esta última população caracterizada por ter uma semi-vida maior, resistência a venenos de microtúbulos e por modificações pós-traducionais específicas na sub-unidade de α -tubulina. Essas modificações incluem a remoção do carboxil terminal da tirosina, poliglutaminação, poligliceração e acetilação da lisina 40. Nos hepatócitos, a polaridade da superfície celular é reflectida na organização assimétrica dos microtúbulos. Ao contrário das células não polarizadas onde os microtúbulos emanam de um centro de microtúbulos cuja organização é justa-nuclear. Nas células polarizadas, os microtúbulos estão organizados em locais perto ou então na membrana plasmática apical. Os microtúbulos têm a extremidade menor orientada para a superfície apical e a extremidade maior encontra-se ligada ou perto da membrana basolateral [4].

[1] Cabrita, A.S. : Introdução à Patologia Experimental - Conceitos Gerais, 2011.

[2] Seeley, S. T. : *Anatomia & Fisiologia*, Lusociência, 2007.

[3] Aller, M.-A. A., Arias, J.-L., Domínguez, J. G., Arias, J.-I., Durán, M., & Arias, J. : Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. *Fibrogenesis & Tissue Repair* , November 3, 2008.

[4] Osna, N. : Alcohol-induced alterations of the hepatocyte cytoskeleton. *World Journal of Gastroenterology*, March 21, 2010.

Comparação da marcação nuclear para evidência de ADN

A actina é uma proteína que existe sob a forma de um monómero (G-actina) ou como um polímero filamentosos (F-actina). O citoesqueleto da actina tem uma organização única em várias células polarizadas. Em geral, os microfilamentos prolongam-se até à membrana basolateral e formam anexos através de interações com proteínas da zona aderente, junções apertadas e adesões focais. Os microfilamentos de actina estão envolvidos numa série de processos celulares desde a citocinese até ao estabelecimento da polaridade celular epitelial [4].

Em geral, o sistema intermediário do filamento de citoqueratina é composto por dímeros polimerizados que consistem numa subunidade ácida (Tipo I) e outra básica (Tipo II) de queratina. Embora tenham sido identificadas mais de 50 isoformas de queratina, os hepatócitos expressam apenas a queratina 8 (Tipo II) e a queratina 18 (Tipo I). Durante o desenvolvimento embrionário, o fígado expressa também a queratina 19 (Tipo I), e alguns níveis muito baixos desta isoforma podem ser expressos nos hepatócitos adultos. Na maior parte das células epiteliais polarizadas, os filamentos de queratina formam densas redes corticais apicais. Em contrapartida, os filamentos corticais apical e basolateral de queratina são observados nos hepatócitos. A distribuição polarizada dos filamentos de queratina levaram alguns investigadores a sugerir um importante papel no estabelecimento e manutenção da polaridade das células epiteliais na secreção polarizada [4].

O canal biliar estende-se a partir do fígado através da superfície dorsal do pâncreas para o duodeno. O canal biliar é formado pela confluência dos vários canais hepáticos que drenam os lobos do fígado. A bÍlis secretada pelas células hepáticas é libertada no duodeno através do canal biliar e esta não contém enzimas digestivas, mas é muito alcalina e neutraliza o conteúdo ácido do estômago [5].

A bÍlis contém sais biliares que emulsionam a gordura, para

[4] Osna, N. : Alcohol-induced alterations of the hepatocyte cytoskeleton. *World Journal of Gastroenterology*, March 21, 2010.

[5] Heath, J. W., Young, B. : *Wheater - Histologia Funcional*, Harcourt Publishers Limited 2000.

Comparação da marcação nuclear para evidênciação de ADN

facilitar a degradação enzimática da gordura pela lipase solúvel em água a partir do pâncreas [5].

O fígado é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo e por peritoneu visceral, excepto numa pequena área rodeada pelo ligamento coronário, na fase diafragmática, na qual não existe peritoneu. No hilo, a cápsula de tecido conjuntivo ramifica-se, enviando uma rede de septos para o parênquima hepático, que constituem o seu principal suporte. Os vasos, nervos e canais distribuem-se pelo fígado seguindo as ramificações do tecido conjuntivo [2].

[2] Seeley, S. T. : *Anatomia & Fisiologia*, Lusociência, 2007.

Os septos de tecido conjuntivo dividem o fígado em lóbulos hexagonais tendo em cada vértice um sistema porta constituído por dois vasos, (veia porta hepática e, a artéria hepática) e o canal hepático. Os nervos hepáticos e os vasos linfáticos também se encontram localizados nestas áreas. No centro de cada lóbulo existe uma veia central e estas unem-se para formar as veias hepáticas, que saem do fígado nas suas faces posterior e superior, drenando para a veia cava inferior [2].

[5] Heath, J. W., Young, B. : *Wheater - Histologia Funcional*, Harcourt Publishers Limited 2000.

Da veia central de cada lóbulo derivam os cordões hepáticos, compostos por hepatócitos, as células funcionais do fígado. As células entre os cordões hepáticos são canais sanguíneos, os sinusóides hepáticos. Estes estão revestidos por epitélio pavimentoso muito fino e irregular, composto por dois tipos de células, as células endoteliais e as células fagocitárias (células de Kupffer). Entre as células de cada cordão existe um lúmen em forma de fenda, o canalículo biliar [2].

Os hepatócitos têm seis funções principais: síntese de bÍlis, armazenamento, biotransformação, desintoxicação, fagocitose e síntese dos componentes sanguíneos. O sangue proveniente das vísceras, rico em nutrientes e pobre em oxigénio, entra nos sinusóides hepáticos e através dos ramos da veia porta mistura-se com o sangue rico em oxigénio e pobre em nutrientes das artérias hepáticas. Os hepatócitos têm a capacidade de retirar oxigénio e

Comparação da marcação nuclear para evidência de ADN

nutrientes do sangue que podem ser armazenados, desintoxicados, utilizados como energia ou na síntese de novas moléculas. As moléculas produzidas ou modificadas nos hepatócitos são libertadas nos sinusóides hepáticos ou nos canalículos biliares [2].

O sangue misto dos sinusóides hepáticos drena para a veia central, por onde sai do lóbulo e, posteriormente, do fígado através das veias hepáticas. A bÍlis produzida pelos hepatócitos é essencialmente constituída por produtos metabólicos, e é levada pelos canalículos biliares até ao sistema porta, saindo do fígado através dos canais hepáticos. Assim, o sangue flui do sistema porta para o centro de cada lóbulo, enquanto que a bÍlis flui em sentido inverso, do centro do lóbulo para o sistema porta [2].

Os componentes chave da bÍlis são os sais biliares para a digestão de gorduras, os pigmentos da bÍlis, tais como a bilirrubina, que são produtos residuais da degradação da hemoglobina, e o colesterol. Os ácidos biliares são esteróides que se combinam com aminoácidos para formar os sais biliares. Estes são detergentes com uma cadeia polar que permite a interação tanto com lípidos quanto com a água, criando gotículas lipídicas hidrossolúveis [6].

A bilirrubina, resulta da degradação da hemoglobina e contém também colesterol, gorduras, hormonas lipossolúveis e lecitina.

A secretina aumenta a secreção de bÍlis, principalmente através do aumento da sua quantidade de água e ião bicarbonato. Os sais biliares também aumentam a secreção biliar através de um sistema de retrocontrolo positivo. A maioria dos sais biliares são reabsorvidos no íleon e retornam ao fígado através da corrente sanguínea, onde estimulam a secreção de bÍlis. A perda de sais biliares pelas fezes é reduzida por este processo de reciclagem. A secreção de bÍlis para o duodeno mantém-se até que este fique vazio [2].

Os hepatócitos podem retirar glicose do sangue e armazená-lo

[2] Seeley, S. T. : *Anatomia & Fisiologia*, Lusociência, 2007.

[6] Silverthorn, D. U. : *Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada*, 2nd Edition ed., Prentice Hall, Inc., 2003.

sob a forma de glicogénio e podem também armazenar gorduras, vitaminas (A, B₁₂, D, E e K), cobre e ferro. Este armazenamento é normalmente temporário e a quantidade de produtos retidos nos hepatócitos, assim como o tamanho da célula, variam ao longo do dia. Os hepatócitos ajudam a manter a glicémia estável. Com a absorção de uma grande quantidade de glicose após uma refeição, a osmolalidade do sangue aumentará, ocorrendo hiperglicémia. Tal não acontece porque o sangue que vem do intestino passa através da veia porta do fígado, onde a glicose e outras substâncias são retiradas do sangue pelos hepatócitos, armazenadas e recolocadas em circulação à medida das necessidades metabólicas [2].

[2] Seeley, S. T. : *Anatomia & Fisiologia*, Lusociência, 2007.

Outra das funções do fígado é a biotransformação dos nutrientes. Muitas das vezes os nutrientes ingeridos não são proporcionais às necessidades dos tecidos e o fígado tem a capacidade de converter alguns nutrientes em outros. Os hepatócitos transformam ainda substâncias que não podem ser utilizadas pela maioria das células em substâncias mais facilmente utilizáveis. Por exemplo, as gorduras ingeridas são combinadas no fígado com colina e fósforo para produzir fosfolípidos, componentes essenciais das membranas plasmáticas. A vitamina D é hidroxilada no fígado, sendo nesta forma que circula maioritariamente no organismo, e é conduzida ao rim onde é novamente hidroxilada para ser activada a actuar na manutenção da calcémia [2].

Muitas das substâncias ingeridas são nocivas para as células do organismo. Além disso, o próprio organismo produz muitos metabolitos que são tóxicos quando acumulados. O fígado constitui uma das primeiras linhas de defesa contra muitas dessas substâncias nocivas, através da sua alteração estrutural, tornando-as menos tóxicas ou mais fáceis de eliminar. Existem outras substâncias que são removidas da circulação e excretadas pelos hepatócitos para a biliar [2].

Comparação da marcação nuclear para evidência de ADN

As células fagocitárias hepáticas (células de Kupffer), localizadas ao longo da parede dos sinusóides hepáticos, fagocitam glóbulos vermelhos e brancos, obsoletos, algumas bactérias e outros resíduos que entram no fígado através da circulação [2].

O fígado tem a capacidade de produzir os seus novos e únicos componentes. Muitas das proteínas sanguíneas, a albumina, o fibrinogénio, as globulinas, a heparina e alguns factores de coagulação, são produzidos no fígado e libertados para a circulação [2].

O rato não tem vesícula biliar. Há um sistema biliar periportal composto por uma rede de canalículos que se juntam num ducto biliar comum [7].

[2] Seeley, S. T. : *Anatomia & Fisiologia*, Lusociência, 2007.

[7] Schanaider, A., & Cesar Silva, P. : The use of animals in experimental surgery. *Acta Cir. Bras. vol. 19 no.4 São Paulo July/Aug. 2004* .

Carbaril

Os pesticidas são amplamente utilizados no saneamento, agricultura e no controlo de pragas. Eles contaminam as cadeias alimentares e têm efeitos tóxicos nos animais e na população humana. A biotransformação dos tóxicos é o processo pelo qual os xenobióticos, tal como os pesticidas são descontaminados através da biotransformação enzimática em metabolitos hidrófilos que são eliminados directamente por via renal ou após conjugação com cofactores endógenos [8].

Os insecticidas distribuem-se por quatro grupos químicos principais: os inibidores da acetilcolinesterase, que são os organofosforados e os carbamatos; os organoclorados, que são derivados do clorobenzeno, do ciclo hexano ou do ciclodieno; e os piretróides, que são compostos sintéticos que apresentam estruturas químicas semelhantes à piretrina [9].

No caso do presente estudo o insecticida em análise pertence ao grupo dos inibidores da acetilcolinesterase, mais propriamente aos carbamatos.

Os carbamatos fazem parte de um grande grupo de praguicidas sintéticos, derivados de ésteres do ácido carbâmico. Estes foram desenvolvidos e usados em grande escala nos últimos quarenta anos, e apresentam alta eficiência praguicida, principalmente, actividade insecticida, baixa acção residual e baixa toxicidade a longo prazo, com um largo espectro de uso [9].

Actualmente, os carbamatos disponíveis no mercados são: Aldicarb (Temik®), Aminocarb (Metacil®), Carbaril (Sevin®), Carbofuran (Carboran®, Furadan®), Landrin (Landrin®), Metacalmato (Bux®), Metiocarb (Mesuro®), Metomil (Lannate®), Nudrin®, Mexacarbato (Zectran®), Propoxur (Baygon®, Uden®) [9].

Os carbamatos são absorvidos através do tracto alimentar, vias aéreas e na pele intacta. Quando absorvidos, sofrem uma rápida

[8] Abass, K., Pelkonen, O., & Turpeinen, M. : An evaluation of the cytochrome P450 inhibition potential of selected pesticides in human hepatic microsomes. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* , July 13, 2009..

[9] Itho, S. d. (n.d.). <http://lct.nutes.ufrj.br/toxicologia/mxii.org.htm>. Retrieved Dezembro 20, 2012, from <http://lct.nutes.ufrj.br/toxicologia/entrada.htm>.

Comparação da marcação nuclear para evidência de ADN

transformação no local de exposição (sistema nervoso, plasma) e em outros tecidos. Os metabolitos produzidos mostram variada toxicidade, por vezes igual ou superior à substância administrada [10].

Os carbamatos são metabolizados pela hidrólise das ligações do carbamoil, tal como por mecanismos de oxidação. A hidrólise dos carbamatos realiza-se com a contribuição de várias enzimas, incluindo a colinesterase, enquanto que a hidrólise da ligação carbamoil é um processo de desintoxicação [10].

Estudos conduzidos por McCracken mostram que o carbaril é hidrolisado pelo fígado, pulmões e pele numa taxa inferior por fracções microssomais, quando comparado com fracções citosólicas e com plasma [10].

No organismo dos mamíferos, o carbaril é decomposto em três metabolitos principais, resultantes da estrutura do hidroxilo, que são excretados pela urina na forma de glucoronidos ou sulfatos [9].

Os carbamatos exercem as suas acções biológicas principalmente por inibição de enzimas, sendo as esterases o alvo. Há inibição da acetilcolinesterase (AChE), que tem como acção degradar o neurotransmissor, a acetilcolina (ACh) [9].

Com a AChE inibida há acúmulo de ACh nos receptores muscarínicos, nicotínicos e no Sistema Nervoso Central. No caso dos carbamatos, a inibição é reversível, uma vez que o complexo é menos estável quando comparado com o caso dos organofosforados, permitindo a recuperação da colinesterase mais rapidamente [9].

A enzima carbamilada é instável e a regeneração da AChE é relativamente rápida quando comparada com a enzima fosforilada. Desta forma, os praguicidas carbamatos são menos perigosos em relação à exposição humana do que os organofosforados [9].

Para que haja transmissão sináptica é necessário que ACh seja libertada do neurónio terminal e difundida através da fenda

[9] Itho, S. d. (n.d.). <http://lct.nutes.ufrj.br/toxicologia/mXII.orga.htm>. Retrieved Dezembro 20, 2012, from <http://lct.nutes.ufrj.br/toxicologia/entrada.htm>.

[10] Tos-Luty, S., Tokarska-Rodak, M., Latuszynska, J., & Przebirowska, D. : Dermal Absorption and Distribution of ¹⁴C Carbaryl in Wistar Rats, April 12, 2001.

AChE - Acetilcolinesterase

ACh - Acetilcolina

Comparação da marcação nuclear para evidência de ADN

[9] Itho, S. d. (n.d.). <http://lct.nutes.ufrj.br/toxicologia/mXII.orga.htm>. Retrieved Dezembro 20, 2012, from <http://lct.nutes.ufrj.br/toxicologia/entrada.htm>.

ACh - Acetilcolina

AChE - Acetilcolinesterase

SNC - Sistema Nervoso Central

sináptica, ligando-se a um receptor pós-sináptico, transmitindo assim o impulso nervoso para um receptor colinérgico [9].

A ACh é sintetizada no neurónio através da acetilcoenzima A e da colina e é responsável pela neurotransmissão nas fibras pré-ganglionares simpáticas e parassimpáticas, nas pós-ganglionares parassimpáticas e na placa mioneural [9].

A ACh liga-se a receptores na membrana da célula pós-sináptica, permitindo que os iões fluam para dentro da célula pós-sináptica. Para cessar a estimulação e restabelecer a sensibilidade do receptor à nova transmissão nervosa, a ACh precisa de ser hidrolisada pela AChE continuamente. Na superfície da AChE existe um centro activo para inactivação por hidrólise da ACh, com formação de colina e ácido acético. A colina é reutilizada pela célula pré-sináptica para produzir nova ACh [9].

Como os organofosforados e os carbamatos são inibidores da AChE ocorre acúmulo de ACh na sinapse. O excesso de ACh inicialmente estimula e então, subsequentemente, paralisa a transmissão na sinapse colinérgica. Há estimulação dos receptores muscarínicos, nos receptores nicotínicos e no Sistema Nervoso Central (SNC). Os insecticidas inibidores da colinesterase ligam-se ao centro esterásico da molécula de AChE e cada um tem uma afinidade diferente nesse sitio. A inibição ocorre porque os compostos organofosforados fosforilam a enzima, formando um complexo estável e geralmente irreversível. Os compostos carbamatos carbamitam a enzima e formam complexos menos estáveis, permitindo a recuperação da enzima mais rapidamente [9].

A taxa de reactivação da enzima carbamitada é relativamente rápida quando comparada à da enzima fosforilada nos organofosforados. A inibição da AChE pelos carbamatos é tão frágil que nenhuma reacção de envelhecimento é possível, como ocorre com a enzima fosforilada [9].

Etanol

O etanol é metabolizado no fígado antes das gorduras, permitindo que estas se acumulem nos hepatócitos. Quatro ou cinco bebidas durante várias semanas são suficientes para causar acumulação de gorduras. No entanto, nesta etapa, as células do fígado ainda não estão comprometidas, e com abstinência, elas podem ser restauradas ao seu estado normal. Com a continuação da ingestão de bebida, a acumulação de gordura causa a expansão das células do fígado, havendo por vezes ruptura das membranas citoplasmáticas ou formação de quistos. A acumulação de gordura nos hepatócitos reduz também o fluxo de sangue no fígado, causando inflamação, conhecida por hepatite alcoólica. Gradualmente, a acumulação de tecido cicatricial fibroso pode conduzir a cirrose, com alterações da arquitectura hepática que aumenta a resistência à passagem do fluxo sanguíneo e compromete a função do órgão. O estado de insuficiência hepática decorrente de cirrose, pode ter como manifestações clínicas a hemorragia gastrointestinal, insuficiência renal e edemas, constituindo uma situação letal se não tratada.[11].

O etanol ao contrário de muitos outros produtos químicos hepatotóxicos, não é uma substância estranha para os organismos vivos. De facto, o que acontece em pequenas quantidades nos tecidos de mamíferos é concebivelmente formado pela redução catalisada pela desidrogenase alcoólica em acetaldéido, derivado da descarboxilação do metabolito intermediário do piruvato. Além disso, quantidades significativas de etanol são normalmente formadas no tracto gastrointestinal, absorvidas pela veia porta e metabolizadas pelo fígado. A maior parte do álcool tem origem microbiana, havendo outra parte que provavelmente é proveniente do acetaldéido formado pelas vias de degradação da treonina, da desoxirribose fosfato e pela β -alanina. Além disso, o etanol é mais rápido e completamente convertido no intermediário chave, o acetato, o qual pode ser usado numa ampla variedade de vias metabólicas [12].

[11] Goodenough, J., & McGuire, B.: *Biology of Humans*, 3rd Edition ed., Benjamin Cummings, 2010.

[12] Comporti, M., Signorini, C., Leoncini, S., Gardi, Concetta, Ciccoli, L., et al. : Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge, December 24, 2009.

Comparação da marcação nuclear para evidência de ADN

[12] Comporti, M., Signorini, C., Leoncini, S., Gardi, Concetta, Ciccoli, L., et al. : Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge, December 24, 2009.

[13] Setshedi, M., Wands, J., & Monte, S. : Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease, October 5, 2010.

[14] Setshedi, M., Wands, J., & Monte, S. : Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease, October 5, 2010.

O etanol é rapidamente absorvido no tracto gastrointestinal (80% no intestino delgado e o restante no estômago) e quase completamente oxidado a dióxido de carbono e água. Após absorção em jejum, o seu pico plasmático ocorre em 30 a 90 minutos e atravessa a barreira hematoencefálica e placentária. A taxa de metabolismo é de cerca de 13 a 25 mg/dl/hora, podendo chegar a 50 mg/dl/hora em indivíduos com consumo crónico intenso [13]. Apenas pequenas quantidades são excretadas na urina, na respiração e na transpiração. A taxa de metabolismo do álcool varia entre 50 a 180 mg/h/kg por corpo no homem adulto, enquanto que no rato e murganho, não obstante a aversão natural de álcool, tem sido relatada uma taxa de duas a três vezes mais elevada [12].

O álcool é bem absorvido pelo aparelho digestivo [13]. O álcool é metabolizado principalmente no fígado através de uma série de reacções oxidativas. Os três passos principais são a oxidação reversível do etanol e acetaldeído, que é tóxico; o metabolismo não reversível do acetaldeído tóxico a acetato; e a separação do acetato em água e dióxido de carbono [14].

O primeiro passo do metabolismo oxidativo do álcool é efectuado por enzimas chave, incluindo a álcool desidrogenase (ADH), o citocromo P450 2E1 (CYP2E1) e a catalase. A ADH é a principal enzima oxidativa, tem uma elevada afinidade para o álcool e quebra o etanol no citoplasma. O CYP2E1 é usado numa via distinta onde é induzido pelo consumo crónico de álcool e resulta na formação de acetaldeído nos peroxissomas. A terceira etapa do primeiro passo do metabolismo do etanol é mediada pela oxidação da catalase em etanol nos microssomas [14].

O segundo passo, é realizado principalmente pela mitocondrial aldeído desidrogenase (ALDH), e consiste em metabolizar o acetaldeído a acetato. Além disso, o acetaldeído pode ser metabolizado pelo CYP2E1 através da via NADPH dependente (sistema microssomal acetaldeído oxidante). O acetato resultante é

CYP2E1 - citocromo P450 2E1

ADH - álcool desidrogenase

ALDH - aldeído desidrogenase

Comparação da marcação nuclear para evidência de ADN

instável e decompõe-se instantaneamente em água e dióxido de carbono. Quando estes mecanismos oxidativos ficam sobrecarregados, há acumulação de acetaldeído e este exerce os seus efeitos tóxicos [14].

A reoxidação do NADH formado no citoplasma solúvel ocorre através de mecanismos de transporte que transferem equivalentes redutores a partir do NADH citoplasmático para a cadeia transportadora de electrões. Esta torna-se rapidamente saturada por reduzir os equivalentes provenientes do etanol, desacelerar o ciclo do ácido cítrico, que em condições normais, reduz equivalentes da cadeia respiratória [12].

Como o etanol é metabolizado, o acetaldeído é produzido. Este metabolito altamente reactivo pode facilmente modificar covalentemente proteínas, ADN e lípidos. Tem sido mostrado que, muitas proteínas podem ser modificadas pelo acetaldeído incluindo a tubulina, a actina, a calmodulina, a hemoglobina, as enzimas hepáticas e as proteínas plasmáticas. Em geral, pensa-se que o acetaldeído forma aductos estáveis com o grupo ϵ - amino dos resíduos de lisina. A hipótese é que essas modificações covalentes cumulativas perturbam o normal funcionamento das proteínas hepáticas, conduzindo a lesão celular [4].

A via mais importante é representada pela álcool desidrogenase, uma metaloenzima contendo zinco, largamente distribuída na natureza, localizada no citoplasma solúvel e NAD⁺ dependente, que catalisa a oxidação do etanol a acetaldeído. É geralmente aceite que o etanol é também metabolizado pela catalase, uma enzima largamente distribuída na natureza e particularmente expressa nos peroxissomas. A catalase que normalmente catalisa a decomposição do H₂O₂ em H₂O e O₂, pode também catalisar a redução do H₂O₂ em H₂O se estiverem presentes electrões dadores (reacção peroxidativa). Geralmente, cada reacção é catalisada pela peroxidase, mas a catalase pode também catalisar reacções peroxidativas, quando o peróxido de

[4] Osna, N. : Alcohol-induced alterations of the hepatocyte cytoskeleton. *World Journal of Gastroenterology*, March 21, 2010.

[12] Comporti, M., Signorini, C., Leoncini, S., Gardi, Concetta, Ciccoli, L., et al. : Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge, December 24, 2009.

[14] Setshedi, M., Wands, J., & Monte, S. : Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease, October 5, 2010.

ADN - ácido desoxirribonucleico

H₂O₂ - peróxido de hidrogénio

O₂ - oxigénio

MDA - malonil dialdeído

[12] Comporti, M., Signorini, C., Leoncini, S., Gardi, Concetta, Ciccoli, L., et al. : Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge, December 24, 2009.

hidrogénio é produzido e a fonte de electrões dadores está disponível. O etanol, que actua como um dador de electrões, é oxidado a acetaldeído. O H_2O_2 necessário para a reacção pode ser produzido pelas oxidases, podendo algumas das quais ocorrer nos peroxissomas [12].

A oxidação do etanol pode resultar da ligação das reacções catalisadas pelo NADPH oxidase (microssomal) e pela xantina oxidase com a catalase [12].

Finalmente, Lieber and De Carli and Lieber et al. descreveram uma terceira via metabólica para a oxidação do etanol que ocorre no retículo endoplasmático dos hepatócitos, denominado de “microssomal etanol-oxidizing system” (MEOS). O MEOS com o NADPH como cofactor oxida o etanol a acetaldeído [12].

É conhecido desde há muito tempo que a administração prévia de uma variedade de substâncias conhecidas como antioxidantes proporciona uma protecção significativa contra a lesão hepática induzida pelo CCl_4 e outras hepatotoxinas. Subsequentemente, foi demonstrado que, quer o CCl_4 seja administrado in vivo ou seja adicionado a preparações de fígado, este aumenta significativamente a peroxidação hepática de lípidos, medido pela formação de malonil dialdeído (MDA). Foi proposto em estudos que nas células hepáticas, o CCl_4 poderia sofrer uma clivagem homolítica produzindo radicais livres. Estes, poderiam rapidamente interagir com moléculas vizinhas, tais como proteínas, ácidos nucleicos, tióis e ácidos gordos insaturados da membrana. A próxima interacção seria definir o movimento da peroxidação lipídica, que afecta seriamente a estrutura e a função da membrana [12].

Desde que o pré-tratamento antioxidante foi descoberto como sendo efectivo na lesão hepática induzida pelo etanol, foi sugerido que a lesão hepática produzida pelo CCl_4 ou pelo etanol podem ter um mecanismo patogénico comum, chamado de stress oxidativo e peroxidação dos lípidos do fígado. Subsequentemente, foi

H_2O_2 - peróxido de hidrogénio

CCl_4 - tetracloreto de carbono

MDA - malonil dialdeído

Comparação da marcação nuclear para evidenciação de ADN

descoberto que, no caso do CCl_4 a produção de MDA após incubação com homogeneizados de fígado é bastante reforçada durante 1, 2, 4, 6 e 12 horas após uma administração aguda de etanol. O aumento da peroxidação lipídica no fígado precede a acumulação de triglicédeos no fígado, excluindo assim que a maior formação de MDA poderia resultar do aumento do teor de gordura hepática. Esta última possibilidade é descartada pelo facto que não há aumento da produção de MDA 24 horas após a administração de etanol quando o nível de triglicédeos hepáticos é máximo. Além disso, foi mostrado que o etanol adicionado in vitro a homogeneizados de fígado tem um efeito pró-oxidante, embora em menor grau do que o tetracloreto de carbono. O efeito é específico para tecidos do fígado, uma vez que o etanol, quer in vitro quer in vivo, não tem efeito sobre a peroxidação do cérebro ou de outros tecidos homogeneizados [12].

Foi proposto que o etanol ou os seus metabolitos stressam o equilíbrio peroxidativo da célula do fígado para a auto-oxidação, podendo agir como pró-oxidante ou baixando o nível antioxidante celular [12].

Implicações no stress oxidativo na toxicidade do etanol poderá implicar que o etanol é convertido, durante o metabolismo, num metabolito de radicais livres ou que o etanol ou os seus metabolitos reagem com alguns nucleófilos numa molécula antioxidante, bloqueando assim a molécula e diminuindo o potencial antioxidante [12].

Estudos recentes mostraram conclusivamente que o radical etoxi é gerado durante a oxidação do etanol e que o stress oxidativo é imposto nas células hepáticas como resultado do metabolismo do etanol. A oxidação do etanol pode resultar na produção de radicais livres, que podem provir do oxigénio e do próprio etanol. Os radicais de oxigénio podem originar os seguintes: microsomal NADPH-citocromo c redutase e o citocromo P450 (componentes do MEOS) podem gerar O_2^- e H_2O_2 .

[12] Comporti, M., Signorini, C., Leoncini, S., Gardi, Concetta, Ciccoli, L., et al. : Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge, December 24, 2009.

CCl_4 - tetracloreto de carbono

MDA - malonil dialdeído

H_2O_2 - peróxido de hidrogénio

O_2 - oxigénio

Comparação da marcação nuclear para evidência de ADN

As mesmas espécies de oxigénio podem ser produzidas pela aldeído oxidase e pela xantina oxidase, ambas envolvidas no metabolismo do etanol, derivado do acetaldeído. O O_2^- e H_2O_2 podem também ser produzidos pela NADPH microsomal oxidase, que fica aumentada depois de uma administração aguda ou crónica de etanol. Durante a oxidação do NADPH os microsomas hepáticos produzem quantidades significativas de OH^- (tendo como precursor o H_2O_2), o que por sua vez parece ser necessário para a oxidação do etanol [12].

[12] Comporti, M., Signorini, C., Leoncini, S., Gardi, Concetta, Ciccoli, L., et al. : Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge, December 24, 2009.

As modificações ultra-estruturais induzidas pelo etanol nas células hepáticas envolvem as mitocôndrias e o retículo endoplasmático. As alterações mitocondriais consistem no alargamento, tumefacção e desorganização das cristas, diminuição do número ou ausência de grânulos de matriz e inclusões cristalinas intramitocondriais. As modificações envolvendo o retículo endoplasmático consistem numa acentuada proliferação das membranas lisas com abundantes estruturas vesiculares. As alterações no retículo endoplasmático são a primeira modificação morfológica detectável nos hepatócitos depois da alimentação com álcool em ratos. Depois de alguns dias de administração de álcool, foi observado que as alterações mitocondriais surgem alguns dias depois. Foram descritos vacúolos autofágicos contendo mitocôndrias alteradas e corpos residuais densos. A presença de corpos de hialina de Mallory foi repetidamente documentada [12].

H_2O_2 - peróxido de hidrogénio

O_2 - oxigénio

As alterações morfológicas da mitocôndria têm um equivalente funcional, que consiste numa diminuição do citocromo a, a_3 e b, da actividade enzimática do ciclo de Krebs e em geral no controlo respiratório. Muitas dessas alterações são estáveis e podem ser responsáveis pelas alterações no metabolismo dos lípidos produzido pela oxidação do próprio etanol. O etanol induz alterações mitocondriais envolvidas na síntese autóctone de algumas proteínas mitocondriais, produzindo assim um desequilíbrio entre as proteínas sintetizadas na mitocôndria e

Comparação da marcação nuclear para evidência de ADN

aquelas que são sintetizadas no retículo endoplasmático. Este desequilíbrio pode influenciar a biossíntese da mitocôndria [12].

Estudos recentes de genômica e proteômica revelaram que componentes do citoesqueleto do hepatócito estavam alterados em hepatócitos tratados com etanol. Por exemplo, os níveis de expressão de muitos genes que codificam para proteínas do citoesqueleto são alterados em sistemas tratados com etanol. Da mesma forma, os níveis de expressão da proteína do citoesqueleto são alterados pela exposição ao etanol. No entanto, é importante notar que mudanças na expressão dos genes não estão necessariamente relacionadas com mudanças na expressão das proteínas. Além disso, foi mostrado que os metabólitos do etanol mostram aductos com várias proteínas do citoesqueleto. As alterações induzidas pelo álcool sugerem fortemente que a estrutura e a função do citoesqueleto são prejudicadas em hepatócitos tratados com etanol. Porque o citoesqueleto é essencial para inúmeros processos celulares, estas alterações provavelmente têm efeitos profundos sobre a adequada função dos hepatócitos conduzindo à progressão da lesão hepática alcoólica [4].

[4] Osna, N. : Alcohol-induced alterations of the hepatocyte cytoskeleton. *World Journal of Gastroenterology*, March 21, 2010.

[12] Comporti, M., Signorini, C., Leoncini, S., Gardi, Concetta, Ciccoli, L., et al. : Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge, December 24, 2009.

Ácidos nucleicos

As nucleoproteínas são combinações de proteínas básicas (protamínas e histonas) e ácidos nucleicos. Os dois ácidos nucleicos são o ADN, que é principalmente encontrado no núcleo das células e o ácido ribonucleico (RNA), que se encontra localizado no citoplasma das células, principalmente nos ribossomas. Ambas as moléculas de ADN e RNA consistem em açúcares alternados e grupos fosfatos com uma base azotada ligada a cada um dos grupos de açúcares [15].

Normalmente, há quatro bases nitrogenadas no ADN, as purinas, adenina e guanina e as pirimidinas, a timina e a citosina, enquanto que no RNA as purinas são a adenina e a guanina e as pirimidinas são o uracilo e a citosina [15].

[15] Bancroft, J. D., & Stevens, A. : *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone, 1996.

ADN - ácido desoxirribonucleico

RNA - ácido ribonucleico

Princípios sobre Hematoxilina-Eosina

A coloração de eleição na rotina para o diagnóstico histopatológico é a coloração de Hematoxilina-Eosina (H&E).

A hematoxilina é extraída do cerne da árvore *Haematoxylon campechianum* que é originária do estado Mexicano de Campeche, mas actualmente, é cultivada no ocidente da Índia. A hematoxilina é extraída do cerne com água quente e é então precipitada a partir de uma solução aquosa usando ureia (Lamb 1974). A hematoxilina por si só não é um corante, é o seu produto oxidado, a hemateína, o corante natural. A hemateína pode ser produzida a partir da hematoxilina de duas formas. Uma delas é por oxidação natural através da exposição à luz e ao ar. Este é um processo lento, demorando por vezes 3 a 4 meses, mas a solução resultante parece reter a sua capacidade de coloração por muito tempo. A hematoxilina de Ehrlich e de Delafield são exemplos de hematoxilinas naturalmente amadurecidas. A outra forma é por oxidação química usando o iodato de sódio (por exemplo, hematoxilina de Meyer) ou o óxido de mercúrio (por exemplo, Hematoxilina de Harris). O uso de agentes químicos oxidantes convertem a hematoxilina em hemateína quase instantaneamente. Desta forma, estas soluções de hematoxilinas podem ser usadas imediatamente após a preparação. Em geral estas preparações têm um curto período de vida quando comparadas com as hematoxilinas oxidadas naturalmente, muito provavelmente porque o contínuo processo de oxidação ao ar e à luz destrói, eventualmente, a hemateína, convertendo-a num composto colorido [15].

A hemateína por si só tem fraca afinidade para os tecidos e é inadequada como coloração nuclear sem a presença de um mordente. Os mordentes mais úteis para a hematoxilina são os sais dos metais de alumínio, ferro e tungsténio. O tipo de mordente usado influencia fortemente o tipo de estruturas celulares coradas. No entanto, certas hematoxilinas requerem que o tecido seja

H&E - Hematoxilina-Eosina

[15] Bancroft, J. D., & Stevens, A. : *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone, 1996.

[15] Bancroft, J. D., & Stevens, A. : *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone, 1996.

RNA - ácido ribonucleico

embebido no mordente antes da coloração, tendo como exemplo a hematoxilina férrica de Heidenhain [15].

A hematoxilina é um corante básico que carrega uma carga positiva a porção da molécula que vai conferir cor ao tecido. Os corantes básicos reagem com os grupos aniônicos das células e tecidos, os quais incluem grupos fosfatos, ácidos nucleicos, grupos sulfatos de glicosaminoglicanos e grupos carboxil das proteínas. A habilidade dos grupos aniônicos reagirem com corantes básicos é chamada de basofilia, e as estruturas celulares que são coradas com corantes básicos são denominadas basófilas. Fazem parte das estruturas celulares que podem ser coradas com corantes básicos a heterocromatina, os nucléolos, o RNA ribossômico e a matriz extracelular da cartilagem. A hematoxilina cora geralmente as estruturas de azul [15].

A eosina é a coloração mais adequada para combinar com a hematoxilina alumínica para demonstrar a arquitetura histológica geral do tecido. É principalmente importante pela capacidade de, com adequada diferenciação, distinguir entre o citoplasma de diferentes tipos de células, e entre diferentes tipos de fibras de tecido conjuntivo e matrizes, corando-os de diferentes tons de vermelho e rosa [15].

A eosina é um corante ácido que reage com componentes catiónicos das células e tecidos. Quando usados juntamente com corantes básicos como a hematoxilina, coram o citoplasma, filamentos citoplasmáticos e fibras extracelulares. A eosina geralmente cora as estruturas em vermelho ou rosa [15].

Princípios sobre a reacção de Feulgen

A reacção nuclear de Feulgen para a coloração específica do ADN em amostras citohistoquímicas *in situ* foi introduzida por Feulgen e Rossenbeck em 1924. Estes autores conceberam um tratamento químico, usando a hidrólise com ácido clorídrico (HCl) para produzir grupos aldeído livres na estrutura da cadeia do ADN, que poderiam ser detectados através de uma reacção [16].

A história da reacção de Feulgen começou praticamente no século XX. Desde então, a técnica tem servido fundamentalmente objectivos nas ciências biológicas e biomédicas sobre a localização e a distribuição quantitativa de ADN, em situações fisiológicas e patológicas. Em particular, a reacção de Feulgen ajudou a estabelecer que: existe uma relação entre o conteúdo de ADN de um núcleo e o seu número de cromossomas; que o conteúdo de ADN é o mesmo ou cai nas classes em que são números inteiros múltiplos de dois, em todos os núcleos de células de um dado organismo; e que antes da mitose as células multiplicam o seu conteúdo genético. A reacção de Feulgen permite também medir a quantidade de ADN presente em cromossomas individuais e comparar o conteúdo de ADN nuclear de diferentes espécies vegetais e animais [16].

O mecanismo do primeiro passo da reacção de Feulgen, a hidrólise ácida, é simples. Num ambiente ácido moderado, as bases de purina são separadas do açúcar da desoxirribose expondo os grupos aldeído livres, deixando intacta a espinha dorsal do ADN. Por conseguinte, a molécula de ADN torna-se “apurinica”. As condições hidrolíticas óptimas para os procedimentos de Feulgen têm sido amplamente estudados desde 1932, quando foi descoberto que, como produto de hidrólise, os filamentos de ADN começam a partir e este processo é influenciado pelo fixador e pela acessibilidade ao ADN. Desta forma, a produção de grupos aldeído pode ser contrabalançada por uma perda de fragmentos de ADN a partir do núcleo que

[16] Chieco, P., & Derenzini, M. : The Feulgen reaction 75 years on. *Histochem Cell Biol* , January 13, 1999.

ADN - ácido desoxirribonucleico

HCl - ácido clorídrico

Comparação da marcação nuclear para evidência de ADN

[15] Bancroft, J. D., & Stevens, A. : *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone, 1996.

[16] Chieco, P., & Derenzini, M. : The Feulgen reaction 75 years on. *Histochem Cell Biol*, January 13, 1999.

ADN - ácido desoxirribonucleico

HCl - ácido clorídrico

perturba a estequiometria da reacção. Este processo atrasa e minimiza a produção de fragmentos de ADN pequenos o suficiente para escaparem do núcleo. No entanto, tanto a quantidade de grupos aldeído produzidos como a solubilização do ADN são variavelmente influenciadas pela fixação e pela compactação da cromatina [16].

A parte crítica do método é a hidrólise, em que um aumento da reacção é obtido à medida que o tempo óptimo da hidrólise aumenta. Por outro lado, a reacção torna-se fraca se a hidrólise for continuada, podendo falhar por completo [15].

Seguindo o passo hidrolítico, as células são expostas ao reagente de Schiff, onde os locais celulares com grupos aldeídos livres na molécula ADN apurínico ligam a pararosanilina dissolvida no reagente de Schiff, adquirindo a cor magenta. A pararosanilina é a forma não metilada de uma série de grupos mortos de triamino-trifenilmetano, com a denominação de magenta ou fucsina básica [16].

A reacção de Feulgen tem sido muito estudada desde 1924 por vários autores pela sua especificidade e nos fins de 1940 tornou-se uma das reacções químicas mais investigadas para quantificar o ADN intracelular. Entre os citoquímicos chegou-se a um consenso que, sob condições controladas, a reacção de Feulgen é específica para ADN e não são formados grupos aldeído estranhos no núcleo. A evidência para esta afirmação vem das seguintes observações que: os cromossomas não agem como simples adsorventes para o reagente de Schiff; a reacção de Schiff pode ser efectivamente prejudicada pelo bloqueio dos grupos aldeído do ADN hidrolisado por diferentes ligações do reagente ao aldeído; depois da digestão tecidual pela desoxirribonuclease a reacção de Feulgen não cora os núcleos nem os cromossomas; 5 minutos de hidrólise com HCl dos núcleos individuais e não fixados previamente não aumenta a solubilização do ADN; e uma digestão prolongada dos cromossomas com lisina não altera a positividade da reacção de

Comparação da marcação nuclear para evidenciação de ADN

Feulgen. Alguma coloração inespecífica do corante de ligação pode aparecer no citoplasma e alterar as medidas de fluorescência. Para a reacção de Feulgen ser específica, a fixação do tecido tem de ser adequada. É obrigatório evitar fixadores aldeído, tais como a acroleína, ou glutaraldeído, que, após a fixação, mantêm um grupo aldeído livre para reagir com o reagente de Schiff [16].

A reacção de Feulgen com o Schiff e com o reagente tipo Schiff pode ser realizada a fresco ou em células fixadas, e em tecidos fixados e em tecidos embebidos em parafina. Vários esquemas de fixação têm sido considerados adequados, sendo o mais comum o formol tamponado a 10% para tecidos e esfregaços [17], e uma mistura de metanol (ou etanol), formalina e ácido acético para esfregaços secos ao ar [18]. Tecidos fixados em Bouin não são recomendados [19].

A possibilidade de quantificar o ADN através da reacção de Feulgen é devido ao facto que, na reacção de Feulgen o desenvolvimento da cor é proporcional à concentração de ADN (Lessler 1953). Foi demonstrado que o Schiff usado usualmente e o reagente tipo Schiff reage com todos os grupos aldeídos formados na molécula de ADN durante a hidrólise e a intensidade final da cor (ou fluorescência) é proporcional ao número de grupos aldeído libertados nas moléculas de ADN [16].

Considerando que nos núcleos diplóides humanos a concentração de ADN é mais elevada, na ordem de 10 mg/ml, e que o grau de formação dos grupos aldeído na fase da hidrólise é diferente em núcleos com diferentes graus de compactação da cromatina, medidas exactas da massa do ADN nuclear requerem um cuidado controlo e procedimentos de reacção standardizados, que assegurem um número de grupos aldeído reactivos, que sejam proporcionais desde hipodiploidia a octaploidia e mesmo valores mais elevados de ADN [16].

Frequentemente, é necessário um factor de correcção para

[16] Chieco, P., & Derenzini, M. : The Feulgen reaction 75 years on. *Histochem Cell Biol*, January 13, 1999.

[17] Delgado, R., Mikuz, G., Hofstadter, F. (1984) DNA-Feulgen-cytophotometric analysis of single isolated from paraffin-embedded tissue. *Pathol Res Pract* 179:92-94.

[18] Decosse, J.J., Aiello, N. (1966) Feulgen hydrolysis: effect of acid and temperature. *J Histochem Cytochem* 14:601-604.

[19] Mikel, U.V., Fishbein, W. N., Bahr, G. F. (1985) Some practical considerations in quantitative absorbance microspectrophotometry. Preparation techniques in DNA cytophotometry. *Anal Quant Cytol Histol* 7:107-118.

ADN - ácido desoxirribonucleico

[16] Chieco, P., & Derenzini, M. : The Feulgen reaction 75 years on. *Histochem Cell Biol*, January 13, 1999.

combinar as medidas de ADN ploidia em núcleos de diferentes tamanhos e de compactação da cromatina [16].

A ADN ploidia através da reacção de Feulgen pode ser medida em suspensões nucleares ou celulares espalhadas numa lâmina, em células cultivadas em placas, em fluidos biológicos e em sessões histológicas. Células individuais isoladas intactas estão mais perto dos principais objectivos para determinar a ADN ploidia com a reacção de Feulgen. As células podem ser dissociadas das culturas celulares e dos tecidos frescos através de métodos, onde perdem o contacto célula a célula e a aderência ao estroma. Podem ser facilmente obtidas preparações citológicas adequadas a partir de sangue e de outros fluidos biológicos, tal como da urina, da efusão de líquidos ou da expectoração, e através de soluções isotónicas usadas para lavar cavidades, biopsias e espécimes cirúrgicos [16].

[17] Delgado, R. , Mikuz, G., Hofstadter, F. (1984) DNA-Feulgen-cytophotometric analysis of single isolated from paraffin-embedded tissue. *Pathol Res Pract* 179:92-94.

Células individuais podem ser dissociadas a partir de tecidos previamente fixados ou fixados e embebidos em parafina, usando para tal fortes contracções e actividades enzimáticas do que aquelas utilizadas em amostras frescas. Para começar o material para a suspensão celular pode derivar de uma amostra de tecido macerado a partir de um núcleo perfurado numa biopsia e incluído em parafina [17], ou de uma secção histológica compacta. Vários estudos combinados têm mostrado que a ADN ploidia de populações de células isoladas a partir de tecidos fixados dá resultados comparáveis aos isolados a partir de tecidos combinados não fixados. Enquanto que, em estudos de citometria de fluxo as células isoladas a partir de tecidos fixados em formalina não foram consideradas óptimas para análise de ADN, uma vez que os corantes fluorescentes intercalares coram detritos citoplasmáticos e penetram pobre e imprevisivelmente na cromatina reticulada [16].

ADN - ácido desoxirribonucleico

Comparação da marcação nuclear para evidência de ADN

Actualmente, a reacção de Feulgen funciona muito bem, fornecendo controlos internos de células adequados e são usadas correcções para a diferença na compactação da cromatina [16].

[16] Chieco, P., & Derenzini, M. : The Feulgen reaction 75 years on. *Histochem Cell Biol* , January 13, 1999.

Análise Morfométrica

A análise de imagem é utilizada em patologia para se obter dados precisos, mediante mensuração e contagem. A morfometria nuclear estuda alguns parâmetros do núcleo como tamanho, forma e padrão cromatínico [20].

[20] Andreal, C. E., Torres, L. F., & Alves, M. T. : Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem, *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Fevereiro, 2008.

Morfometria é a descrição quantitativa dos achados geométricos de estruturas de qualquer dimensão. Isso inclui a planimetria, que é o processo de medição horizontal, ou seja, é a medida das áreas das superfícies planas, e a estereometria que está relacionada à medida dos sólidos [20].

O olho humano é sensível a muitas variáveis, como luminosidade, diferenças de contraste e brilho, que poderão resultar em interpretações e conclusões subjectivas e específicas do analisador. Portanto, um dos objectivos da morfometria é eliminar a subjectividade e permitir maior reprodutibilidade interobservador [20].

Material e Métodos

Neste trabalho foram usados como grupo controlo 10 blocos de parafina com fígado de rato Wistar com 28 semanas. **Foram ainda usados** 10 blocos de parafina com fígado de rato Wistar com 28 semanas onde foi administrado carbaril (grupo teste 1) e 10 blocos de parafina com fígado de rato Wistar com 28 semanas onde foi administrado vinho (grupo teste 2). Foram obtidos dois cortes histológicos de cada bloco, para posteriormente se poder fazer a comparação entre as duas colorações em estudo, a H&E e o Feulgen.

Após a recolha dos blocos de parafina no arquivo de blocos, estes foram colocados na placa fria, com o intuito de ficarem gelados para obter cortes histológicos na ordem dos três micrómetros. Depois procedeu-se à desparafinação com xilol, passando depois as lâminas por uma série de banhos de álcoois com concentrações decrescentes para ficarem hidratadas.

Coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E)

A hidratação preparou o tecido para receber o primeiro corante, a hematoxilina, que se encontra em solução aquosa, sendo posteriormente coradas pela eosina, que conferiu o contraste (Tabela I).

Coloração de Feulgen

Após a desparafinação e hidratação, os tecidos foram colocados na estufa a 60° durante 8 minutos, em ácido clorídrico 1M pré-aquecido. Decorrido este tempo os cortes foram colocados

Tabela I - Protocolo usado para a coloração H&E.

Protocolo H&E	
Xilol	20 min
Álcool absoluto	1 min
Álcool 95°	1 min
Álcool 70°	1 min
Hematoxilina Mayer	15 min
Lavar em água corrente	7 min
Eosina	5 min
Água corrente	Passagem
Álcool 95°	1 min
Álcool absoluto	1 min
Xilol	Passagem

Tabela II - Protocolo usado para a coloração de Feulgen.

Protocolo Feulgen	
Xilol	20 min
Álcool absoluto	1 min
Álcool 95°	1 min
Álcool 70°	1 min
Colocar os cortes em HCl 1M	
Levar à estufa 60°C	8 min
Limpar temperatura ambiente	1 min
HCl 1M	
Reagente Schiff	45 min
Lavar com solução bissulfito	30 s
Lavar com água destilada	Passagem
Verde luz 1%	2 min
Lavar com água corrente	Passagem
Álcool 95°	1 min
Álcool absoluto	1 min
Xilol	Passagem

Comparação da marcação nuclear para evidência de ADN

em ácido clorídrico 1M à temperatura ambiente, durante 1 minuto. Em seguida, colocam-se os cortes no reagente de Schiff durante 45 minutos e terminado este tempo lavou-se com metabissulfito de potássio durante 30 segundos. Posteriormente, contrastou-se com verde luz durante 1 minuto e no fim lavou-se com água destilada (Tabela II).

Montagem da lamela

Seguidamente, terminaram-se as colorações com a desidratação dos tecidos histológicos numa série de álcoois de concentração crescente, seguindo-se a diafanização com xilol, que prepara o tecido para o meio de montagem sintético, o Entellan.

Obtenção das fotografias e Análise morfométrica

Posteriormente, procedeu-se à observação dos tecidos e à recolha de imagens dos mesmos, tendo sido realizadas cinco fotografias em cada um dos tecidos sempre nos mesmos locais, com o objectivo de se proceder à análise morfométrica dos núcleos celulares, com a possibilidade de comparação entre as duas colorações realizadas. Todas as imagens foram recolhidas à escala de 25µm.

A análise das fotografias foi realizada com recurso à aplicação informática "ImageJ", desenvolvida pelos National Institutes of Health (NIH, EUA) .

As imagens foram convertidas em escala cinza e optimizado o contraste por forma a conseguir a melhor evidência dos núcleos, com medição automática das áreas nucleares, quer para a coloração de Hematoxilina & Eosina, quer para a coloração de Feulgen.

Comparação da marcação nuclear para evidenciação de ADN

Foram medidas as áreas dos núcleos para cada uma das fotografias de cada lâmina dos órgãos dos animais dos três grupos em estudo.

Análise estatística

A variação da área individual de cada núcleo corado por cada uma das técnicas utilizadas pode ser descrita utilizando a média, desvio padrão e coeficiente de variação para um intervalo de confiança de 95%. Com base nestes dados definem-se para o grupo controlo, para cada uma das colorações, cinco classes de núcleos, de acordo com as áreas medidas: núcleos muito pequenos, núcleos pequenos, núcleos médios, núcleos grandes e núcleos muito grandes. Designamos de núcleos médios aqueles cuja área se encontra compreendida no intervalo [média - coeficiente de variação, média + coeficiente de variação]. Designamos núcleos grandes, aqueles cujo valor da área se encontra incluído no intervalo [média + coeficiente de variação, média + 2 x coeficiente de variação]. Designamos núcleos pequenos, quando o valor da área está incluído no intervalo [média - 2 x coeficiente de variação, média - coeficiente de variação]. Consideramos que os núcleos são muito pequenos, quando o valor da sua área se encontra abaixo do considerado para os núcleos pequenos, e os núcleos são considerados como muito grandes quando a sua área excede a área dos núcleos grandes.

As áreas dos núcleos medidos em cada um dos grupos foi comparado com o grupo controlo, para cada uma das colorações, permitindo conhecer a distribuição destas por classes.

Tabela IV - Média e desvio padrão do tamanho dos núcleos medidos após a coloração H&E.

H&E	Média	Desvio Padrão
Controlo	425,42	357,87
Carbaril	488,14	472,27
Vinho	437,80	420,23

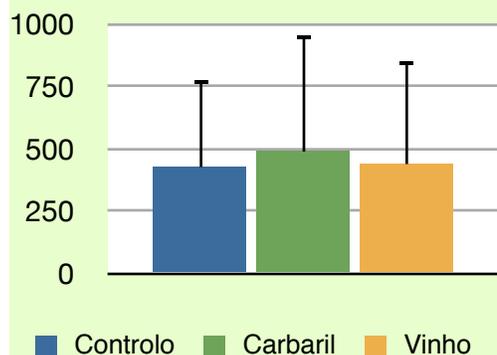


Gráfico 1 - Representação da Tabela IV.

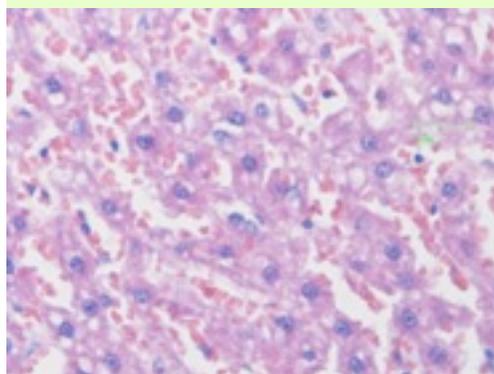


Figura 1 - Imagem histológica do grupo controlo da coloração H&E.

Resultados

Através da análise da tabela III observamos que nos três grupos em estudo corados com H&E não existem núcleos muito pequenos. Em relação ao grupo controlo 0,56% dos núcleos são pequenos, 85,25% são médios, 8,07% são grandes e 6,15% são muito grandes. Relativamente ao grupo carbaril 0,45% dos núcleos são pequenos, 80,67% são médios, 9,76% são grandes e 9,11% são muito grandes. Nomeadamente ao grupo do vinho, 0,58% dos núcleos são pequenos, 84,43% são médios, 7,78% são grandes e 7,21% são muito grandes.

Da análise da tabela IV, constatamos que a média dos núcleos medidos no grupo controlo é de 425,43μm e o desvio padrão de 357,87μm. No grupo do carbaril a média é de 488,14μm e o desvio padrão de 472,27μm e no grupo do vinho a média é de 437,80μm e o desvio padrão de 420,43μm.

Tabela III - Valor médio do tamanho dos núcleos medidos após o protocolo da coloração H&E.

H&E	Controlo	Carbaril	Vinho
Muito pequeno	0	0	0
Pequeno	0,56	0,45	0,58
Médio	85,25	80,67	84,43
Grande	8,07	9,76	9,11
Muito grande	6,15	9,11	7,21

Comparação da marcação nuclear para evidência de ADN

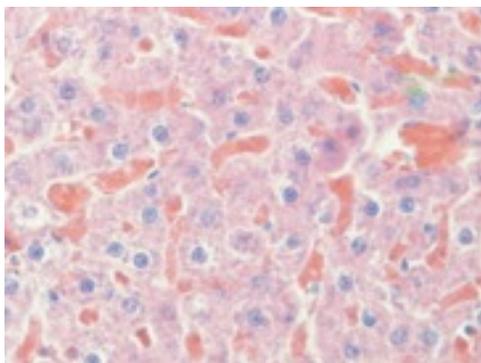


Figura 2 - Imagem histológica do grupo teste 1 (carbaril) da coloração H&E.

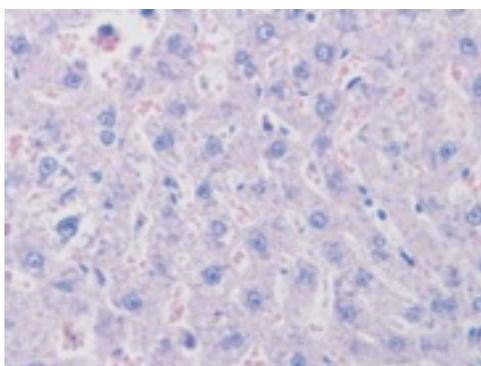


Figura 3 - Imagem histológica do grupo teste 2 (vinho) da coloração H&E.

Relativamente à análise da tabela V, verificamos que nos três grupos em estudo onde foi usado o reagente de Feulgen não existe uma percentagem muito pequena de ADN corado com o mesmo. Em relação ao grupo controlo 10,42% do ADN marcado é classificado como pequeno, 72,29% é médio, 12,93% é grande e 4,36% é muito grande. Nomeadamente ao grupo do carbaril, observamos que 13,30% do ADN corado é classificado como pequeno, 71,31% é médio, 9,03% é grande e 6,37% é muito grandes. Do grupo do vinho, constatamos que 9,72% do ADN corado é pequeno, 69,79% é médio, 11,89% é grande e 8,61% é muito grande.

Tabela V - Média e desvio padrão do tamanho do ADN medido após a reacção de Feulgen.

Feulgen	Média	Desvio Padrão
Controlo	715,83	573,16
Carbaril	698,06	675,91
Vinho	784,04	734,43

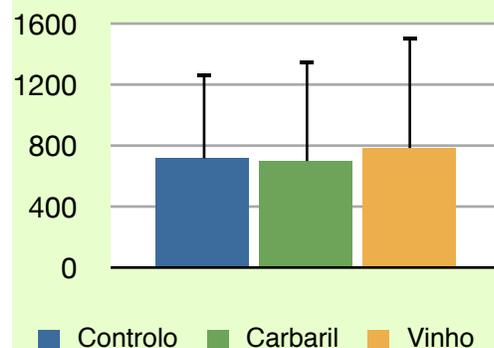


Gráfico 2 - Representação da Tabela VI.

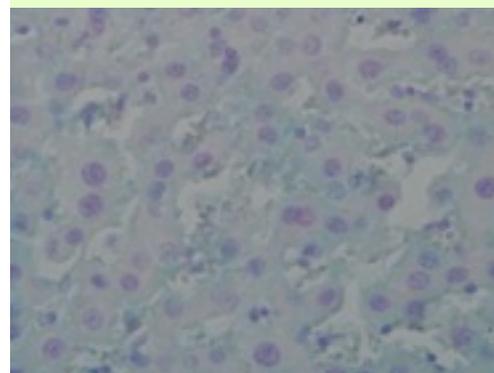


Figura 4 - Imagem histológica do grupo controlo da coloração Feulgen.

Comparação da marcação nuclear para evidência de ADN

Tabela VI - Valor médio da quantidade de ADN medido após o protocolo da coloração de Feulgen.

Feulgen	Controlo	Carbaril	Vinho
Muito pequeno	0	0	0
Pequeno	10,42	13,30	9,72
Médio	72,29	71,31	69,79
Grande	12,93	9,03	11,89
Muito grande	4,36	6,37	8,61

Na análise da tabela VI observamos que a média da quantidade de ADN medido no grupo controlo é de 715,83 μ m e o desvio padrão é de 573,16 μ m. Nomeadamente ao grupo do carbaril a média é de 698,06 μ m e o desvio padrão é de 675,91 μ m. Relativamente ao grupo do vinho a média é de 784,04 μ m e o desvio padrão é de 734,43 μ m.

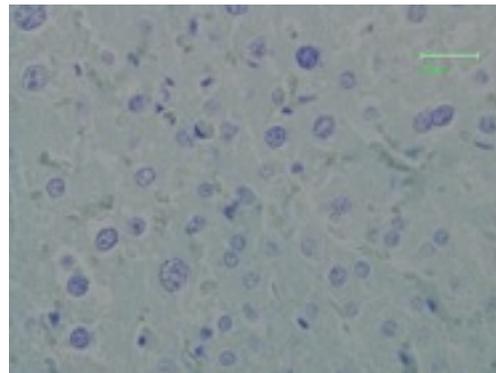


Figura 5 - Imagem histológica do grupo teste 1 (carbaril) da coloração Feulgen.

Comparação da marcação nuclear para evidência de ADN

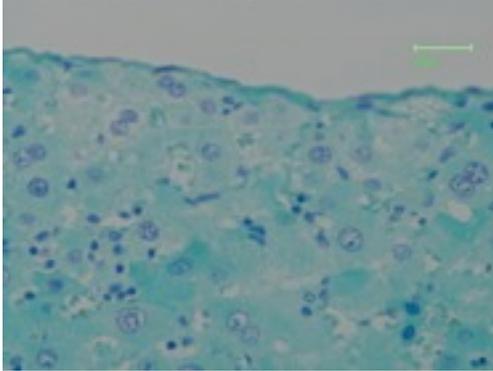


Figura 6 - Imagem histológica do grupo teste 2 (vinho) da coloração Feulgen.

Tabela VII - Resultados comparativos dos diferentes grupos para cada uma das colorações realizadas.

		Muito pequeno	Pequeno	Médio	Grande	Muito grande
Controlo	H&E	0	0,56	85,25	8,07	6,15
	Feulgen	0	10,42	72,29	12,93	4,36
Carbaril	H&E	0	0,45	80,67	9,76	9,11
	Feulgen	0	13,30	71,31	9,03	6,37
Vinho	H&E	0	0,58	84,43	7,78	7,21
	Feulgen	0	9,72	69,79	11,89	8,61

Comparação da marcação nuclear para evidência de ADN

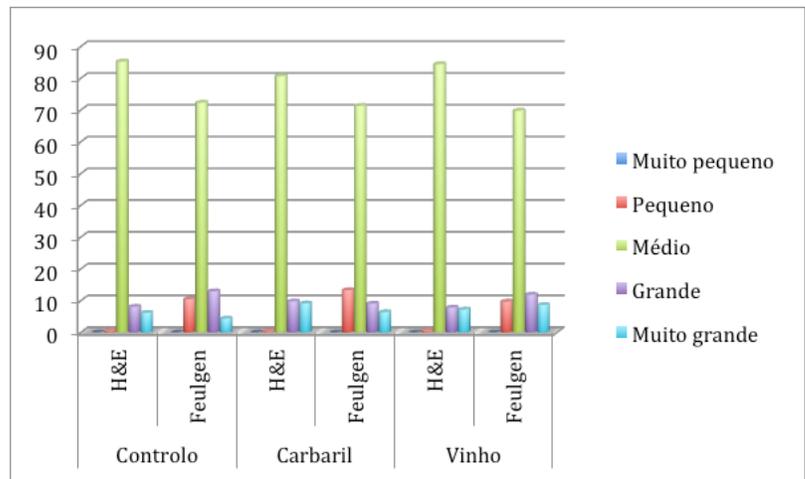


Gráfico 3 - Representação gráfica da Tabela VII.

Discussão

A coloração de Feulgen constitui uma técnica específica para identificação de ADN, que permite a identificação de alterações nucleares mesmo que precoces e a identificação de micronúcleos [21]. Esta técnica apresenta-se particularmente sensível à prática da pessoa que a executa, e por constituir um protocolo longo, facilmente está sujeito a erros [21].

Pela sua especificidade na identificação de alterações precoces do ADN, a técnica de Feulgen permite a identificação da formação de micronúcleos como marcador de lesão cromossómica, em situações de cirrose hepática [22].

A determinação quantitativa do conteúdo nuclear em ADN é hoje considerada uma técnica importante no auxílio ao diagnóstico e estadiamento de algumas neoplasias malignas. A coloração de Feulgen é a técnica preconizada pela ISCO (International Society of Cellular Oncology) (DNA Consensus in Image Cytometry, 1995).

Através da análise da tabela VII e do gráfico 3 examinamos que no caso do grupo controlo há uma percentagem maior de ADN considerado pequeno e grande corado com o reagente de Feulgen comparativamente com a coloração de rotina H&E e que há maior percentagem de núcleos corados com a coloração H&E cujo tamanho é grande e muito grande em relação ao reagente de Feulgen.

O carbaril é um insecticida sintético utilizado de forma intensiva na produção agropecuária e no controlo de pragas domésticas. Tóxico para o ser humano, este pesticida é um inibidor reversível das colinesterases e constitui um agente carcinogénico, tendo

[21] Grover S, Mujib ABR, Jahagirdar A, Telagi N, Kulkarni PG. A comparative study for selectivity of micronuclei in oral exfoliated epithelial cells. J Cytol 2012 29(4):230-235.

[22] Almeida TM, Leitão RC, Andrade JC, Beçak W, Carrilho FJ, Sonohara S. Detection of micronuclei formation and nuclear anomalies in regenerative nodules of human cirrhotic livers and relationship to hepatocellular carcinoma. Cancer Genet Cytogenet. 2004;150(1):16-21.

ADN - ácido desoxirribonucleico

H&E - Hematoxilina e Eosina

Comparação da marcação nuclear para evidência de ADN

capacidade de inibir as enzimas hepáticas.

Do ponto de vista histopatológico, está descrito o aumento do tamanho dos hepatócitos e do seu núcleo, com vacuolização citoplasmática que confere às células um aspecto espumoso, num modelo de administração oral deste composto [23]. Por outro lado, sobretudo na proximidade das ramificações portais e da veia central, é possível observar hepatócitos com menores dimensões, citoplasma intensamente corado e núcleo denso e picnótico [24].

Na nossa avaliação, constata-se que há maior percentagem de ADN pequeno corado com o reagente de Feulgen quando comparado com a percentagem de núcleos corados com a coloração de rotina e que a percentagem de núcleos médios, grandes e muito grandes é maior na coloração H&E em relação ao reagente de Feulgen.

O consumo excessivo de etanol é responsável por uma elevada morbidade e mortalidade, com impacto sobretudo sobre o fígado. Os mecanismos subjacentes à doença hepática alcoólica são múltiplos e incluem fenómenos inflamatórios, stress oxidativo, reacções de oxidação-redução e lesão mitocondrial [25,26,27].

A doença alcoólica hepática compreende, do ponto de vista histopatológico: esteatose, esteatohepatite, fibrose e cirrose. O aparecimento de uma destas lesões depende dos hábitos de consumo: doses ingeridas e duração dos hábitos [28].

No que diz respeito ao grupo do vinho, constatamos que a percentagem de núcleos médios é maior na coloração H&E e que há uma maior percentagem de ADN pequeno, grande e muito grande corado com o reagente de Feulgen.

[23] Shtenberg AI, Rybakova MN. Effect of Carbaryl on the neuroendocrine system of rats. *Fd Cosmet Toxicol* 1968;6:461-67.

[24] Tos-Luty S, Prezbirowska D, Latuszynska J, Tokarska-Rodak M. - Histological and ultrastructural studies of rats exposed to carbaryl. *Ann Agric Environ Med* 2001;8:137-44.

[25] Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology* 2006;43:S63-S74.

[26] Beier JI, McClain CJ. Mechanisms of cell signaling in alcoholic liver disease. *Biol Chem* 2010;391:1249-1264.

[27] Conigrave KM, Davies P, Haber P, Whitfield JB. Traditional markers of excessive alcohol use. *Addiction* 98 2003;sup2:143-152.

[28] Mann RE, Smart RG, Govoni R. The epidemiology of alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health* 2003;27(3)-209-219.

ADN - ácido desoxirribonucleico

H&E - Hematoxilina e Eosina

Conclusões

A técnica de coloração de Feulgen permite identificar ADN nuclear, constituindo uma técnica específica. Foi possível a sua optimização, com a identificação dos ácidos nucleicos de forma eficaz.

Quando comparada a identificação nuclear conseguida nas lâminas coradas pela técnica de Feulgen com a coloração de rotina Hematoxilina e Eosina, concluímos que é possível uma maior diferenciação dos núcleos, quanto à sua área, com identificação de maior número de núcleos com áreas pequenas e a sua destrição em relação a núcleos com áreas média ou grande.

Bibliografia

- [1] Cabrita, A.S. : Introdução à Patologia Experimental - Conceitos Gerais, 2011.
- [2] Seeley, S. T. : *Anatomia & Fisiologia*, Lusociência, 2007.
- [3] Aller, M.-A. A., Arias, J.-L., Domínguez, J. G., Arias, J.-I., Durán, M., & Arias, J. : Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. *Fibrogenesis & Tissue Repair* , November 3, 2008.
- [4] Osna, N. : Alcohol-induced alterations of the hepatocyte cytoskeleton. *World Journal of Gastroenterology*, March 21, 2010
- [5] Heath, J. W., Young, B. : *Wheater - Histologia Funcional*, Harcourt Publishers Limited 2000.
- [6] Silverthorn, D. U. : *Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada*, 2nd Edition ed., Prentice Hall, Inc., 2003.
- [7] Schanaider, A., & Cesar Silva, P. : The use of animals in experimental surgery. *Acta Cir. Bras. vol.19 no.4 São Paulo July/Aug. 2004* .
- [8] Abass, K., Pelkonen, O., & Turpeinen, M. : An evaluation of the cytochrome P450 inhibition potential of selected pesticides in human hepatic microsomes. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* , July 13, 2009..
- [9] Itho, S. d. (n.d.). <http://ltc.nutes.ufrj.br/toxicologia/mXII.orga.htm>. Retrieved Dezembro 20, 2012, from <http://ltc.nutes.ufrj.br/toxicologia/entrada.htm>.

- [10] Tos-Luty, S., Tokarska-Rodak, M., Latuszynska, J., & Przebirowska, D. : Dermal Absorption and Distribution of ¹⁴C Carbaryl in Wistar Rats, April 12, 2001.
- [11] Goodenough, J., & McGuire, B.: *Biology of Humans*, 3rd Edition ed., Benjamin Cummings, 2010.
- [12] Comporti, M., Signorini, C., Leoncini, S., Gardi, Concetta, Ciccoli, L., et al. : Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge, December 24, 2009.
- [13] Rodrigues, R. M. (n.d.). <http://lct.nutes.ufrj.br/toxicologia/entrada.htm>. Retrieved Fevereiro 4, 2013, from <http://lct.nutes.ufrj.br/toxicologia/mVIII.alcoo.htm>.
- [14] Setshedi, M., Wands, J., & Monte, S. : Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease, October 5, 2010.
- [15] Bancroft, J. D., & Stevens, A. : *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone, 1996.
- [16] Chieco, P., & Derenzini, M. : The Feulgen reaction 75 years on. *Histochem Cell Biol* , January 13, 1999.
- [17] Delgado, R. , Mikuz, G., Hofstadter, F. (1984) DNA-Feulgen-cytophotometric analysis of single isolated from paraffin-embedded tissue. *Pathol Res Pract* 179:92-94.
- [18] Decosse, J.J., Aiello, N. (1966) Feulgen hydrolysis: effect of acid and temperature. *J Histochem Cytochem* 14:601-604.
- [19] Mikel, U.V., Fishbein, W. N., Bahr, G. F. (1985) Some practical considerations in quantitative absorbance microspectrophotometry. Preparation techniques in DNA cytophotometry. *Anal Quant Cytol Histol* 7:107-118.
- [20] Andreal, C. E., Torres, L. F., & Alves, M. T. : Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem, *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* , Fevereiro, 2008.
- [21] Grover S, Mujib ABR, Jahagirdar A, Telagi N, Kulkarni PG. A comparative study for selectivity of micronuclei in oral exfoliated epithelial cells. *J Cytol* 2012 29(4):230-235.

- [22] Almeida TM, Leitão RC, Andrade JC, Beçak W, Carrilho FJ, Sonohara S. Detection of micronuclei formation and nuclear anomalies in regenerative nodules of human cirrhotic livers and relationship to hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;150(1):16-21.
- [23] Shtenberg AI, Rybakova MN. Effect of Carbaryl on the neuroendocrine system of rats. *Fd Cosmet Toxicol* 1968;6:461-67.
- [24] Tos-Luty S, Prezbirowska D, Latuszynska J, Tokarska-Rodak M. - Histological and ultrastructural studies of rats exposed to carbaryl. *Ann Agric Environ Med* 2001;8:137-44.
- [25] Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology* 2006;43:S63-S74.
- [26] Beier JI, McClain CJ. Mechanisms of cell signaling in alcoholic liver disease. *Biol Chem* 2010;391:1249-1264.
- [27] Conigrave KM, Davies P, Haber P, Whitfield JB. Traditional markers of excessive alcohol use. *Addiction* 98 2003;sup2:143-152.
- [28] Mann RE, Smart RG, Govoni R. The epidemiology of alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health* 2003;27(3)-209-219.
- [29] Tripathi PK, Singh A. Toxic effects of dimethoate and carbaryl pesticides on reproduction and related enzymes of the fresh water snail *Lymnaea acuminata*. *Bull Environ Contam Toxicol* 2003;71:535-42.
- [30] Smalley HE, Curtis JM, Earl FL. Teratogenic action of carbaryl in beagle dogs. *Toxicol Appl Pharmacol* 1968;13:392-403.
- [31] Grant BF, Dufour MC, Harford TC. Epidemiology of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1988;8:12-25.
- [32] Sorensen HT, Thulstrup AM, Mellekjar L, Jepsen P, Christensen E, Olsen JH, Vilstrup H. Long-term survival and cause-specific mortality in patients with cirrhosis of the liver: a nationwide cohort study in Denmark. *J Clin Epidemiol* 2003;56:88-93.

[33] Travlos GS, Morris RW, Eldwell MR, Duke A, Rosenblum S, Thompson MB. Frequency and relationships of clinical chemistry and liver and kidney histopathology findings in 13-week toxicity studies in rats. *Toxicology* 1996;107(1):17-29.

[34] Hiraoka, Tosisuko - Feulgen Nuclear Reaction: approaches to the understanding of mechanism of in vitro reaction. *Histochemie* 35, 283-296 (1973).

[35] Kjellstrand P. Temperature and acid concentration in the search for optimum Feulgen hydrolysis conditions. *J Histochem Cytochem* 1977;25:129-134.

[36] Larson MLP, Sanaia H. The Feulgen reaction: importance of the wash after hydrolysis. *Acta Histochem* 1980;67:6-12.

[37] Schulte E, Wittekind D. Standardization of the Feulgen reaction: The influence of chromatin condensations on the kinetics of acid hydrolysis. *Analyt Cell Pathol* 1990;2:149-157.

[38] Khandelwal S, Solomon MC. Cytomorphological analysis of keratinocytes in oral smears from tobacco users and oral squamous cell carcinoma lesions - a histochemical approach. *Int J Oral Sci*, 2(1):45-52, 2010.

[39] Kasprzak A, Biczysko W, Adamek A, Zabel M, Surdyk-Zasada J. Correlation of morphological alterations of light and electron microscopy in chronic type B and C hepatitis. *Med Sci Monit* 2001;7(S1):138-146.

[39] Guido M, Fassan M, Giacomelli L, Cillo U, Farinat F, Burra P, Faggioli S, Rugge M. Micronuclei and broken eggs in human liver carcinogenesis. *Anticancer research* 28:2507-2512 (2008).

[40] Jonas S, Al-Abadi H, Benckert C, Thelen A, Hippler-Benscheid M, Saribeyoglu K, Radtke B, Pratschke J, Neuhaus P. - Prognostic significance of the DNA-index in liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Ann Surg*. 2009 Dec;250(6):1008-13.

[41] de Almeida TM, Leitão RM, Carrilho FJ, Sonohara S. - Micronuclei formation in liver fibrosis samples from patients infected by hepatitis C virus. - Genet Mol Biol. 2010 Jul;33(3):418-21.