



Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Mestrado em Patologia Experimental

AVALIAÇÃO DO FÍGADO NUM MODELO DE TOXICOLOGIA EXPERIMENTAL COM DMBA

EVALUATION OF THE LIVER IN A MODEL WITH EXPERIMENTAL TOXICOLOGY
WITH DMBA

Ana Rute Bertão Duarte N°: 1998100062

Mestrado em Patologia Experimental

Coimbra, 2014

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Patologia Experimental, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor António Silvério Cabrita (Universidade de Coimbra) e do Mestre Patrícia Isabel Miranda de Jesus (Universidade de Coimbra)

AGRADECIMENTOS

As nossas realizações pessoais são naturalmente fruto de um considerável esforço próprio, mas não são indissociáveis de um grande número de contribuições, apoios, sugestões, comentários ou críticas. A sua importância assume no caso presente uma valia tão preciosa que sem elas, teria sido muito difícil de chegar a qualquer resultado digno de menção. Os responsáveis por esta ajuda desinteressada são uma referência para o resto da minha vida. Mencionar aqui o nome dessas pessoas constitui um preito de justiça e uma homenagem sentida. Os meus primeiros e profundos agradecimentos têm que ir para os meus Pais e para as minhas Irmãs, que com muito amor e carinho, me apoiaram nos momentos mais difíceis e contribuíram para a minha educação e para a minha formação enquanto ser humano que vive integrado numa sociedade, onde os valores morais e profissionais se devem conjugar num sentido de responsabilidade. Expresso a minha sincera gratidão ao Professor Doutor António Silvério Cabrita, pela oportunidade que me deu, de trabalhar e colaborar nos projetos envolvidos no Serviço de Patologia Experimental, permitindo-me a realização de um estágio voluntário e uma iniciação científica na área da investigação em animais de laboratório, que me motivaram à realização deste mestrado. A sua sempre pronta disponibilidade, aliada à grande capacidade de trabalho, de organização e de transmissão de conhecimentos, contribuíram sem dúvida para o meu enriquecimento e desenvolvimento do ponto de vista teórico e prático em termos científicos, sendo decisivo para a realização desta tese. À Mestre Dra. Patrícia Jesus, o meu reconhecimento pela receptividade e interesse na ajuda à minha formação e ao trabalho de investigação no mestrado, disponibilizando os seus conhecimentos na área da química e da administração experimental do DMBA. À Mestre Dra. Ana Calado Lopes, o meu especial agradecimento por mais uma vez continuar na sua árdua tarefa de me orientar e acompanhar, confiando e fazendo reconhecer o valor das coisas realmente úteis para a minha formação e experiência profissional. Aos colegas do Serviço de Patologia Experimental, Professora Doutora Andreia Figueiredo, Dr. Eduardo Costa, Dr. Gustavo Barandas, Dra. Joana Costa, Mestre Eng. José Cabeças, Dr. Miguel Marto, Dra. Rita Pereira, Dra. Rita Silva, Mestre Dr.

Rodrigo Farinha e Dr. Tiago Mendes, também uma manifestação de apreço, por todo o apoio e colaboração ao longo da realização deste trabalho. Não quero deixar também de mencionar o meu agradecimento aos funcionários do biotério pela colaboração na fase experimental desta investigação relacionada com a manutenção dos animais e ao Mestre Dr. Nuno Gonçalves responsável pela execução da Cromatografia Líquida de Alta Pressão. Fica-me também a boa recordação do agradável convívio do Dr. Álvaro Balhau, Dr. António Guardado, Dr. Juan Herrera, Dra. Maura Ferreira e Dr. Varão Nolasco, alguns deles colegas do mestrado em patologia experimental. Ainda o meu sincero agradecimento a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese. Existem muitas formas de agradecer, mas penso que a mais importante delas reside na simplicidade de encantar com a grandeza do gesto, porque é no agradecimento que reside a força da aproximação e o poder de se construírem laços eternos de amizade.

Índice

Introdução	1
Objectivos	45
Materiais e Métodos	46
Resultados	68
Discussão e Conclusão	82
Lista de Acrónimos	85
Bibliografia	90

Lista de Figuras

1	Figado de rato [50]	1
2	Esquema representativo da localização anatômica dos órgãos no rato. O fígado localiza-se caudalmente ao diafragma, na região crânio-abdominal direita (Adaptado de [8].	3
3	Orientação dos lobos do fígado na cavidade abdominal em posição ventro-dorsal e em relação com os órgãos adjacentes. O fígado relaciona-se cranialmente com o diafragma e caudalmente com o estômago, o intestino delgado, o pâncreas, o baço, o rim direito e a glândula adrenal direita. LLE: lobo lateral esquerdo; LM: lobo médio; LME: lobo médio esquerdo; LMD: lobo médio direito; LLD: lobo lateral direito; LLDCr: lobo lateral direito cranial; LLDCa: lobo lateral direito caudal; LC: lobo caudado; LCCr: lobo caudado cranial; LCCa: lobo caudado caudal (Adaptado de [13].	4
4	Lobos do parênquima hepático do rato e processo caudado (zona pontuada). LM: lobo médio (LMD: lobo médio direito; LME: lobo médio esquerdo); LLE: lobo lateral esquerdo; LLD: lobo lateral direito (LLDCr: lobo lateral direito cranial; LLDCa: lobo lateral direito caudal); LC: lobo caudado (LCCr: lobo caudado cranial; LCCa: lobo caudado caudal); PC: processo caudado (Adaptado de [4].	5

5	Principais ligamentos do fígado de rato. LF: ligamento falciforme; LTD ligamento triangular direito; LTE: ligamento triangular esquerdo; LM: lobo médio; LLE: lobo lateral esquerdo; LLDCr lobo lateral direito cranial; LC: lobo caudado; VCCa-Cr: veia cava caudal crânio-hepática; VCCa-Ca: veia cava caudal caudo-hepática (Adaptado de [4]).	6
6	O hilo hepático é exposto deslocando cranialmente o lobo médio (LM) e para a esquerda o lobo lateral esquerdo (LLE) e o duodeno. R: rim direito; VCCa-Ca: veia cava caudal caudo-hepática; P: pâncreas [16]	6
7	Vascularização hepática e trato biliar extrahepático do rato (adaptado de [17]	7
8	Anatomia do hilo hepático em rato. Vascularização venosa portal (azul), arterial (vermelho) e drenagem biliar (amarelo). Ducto biliar ventral à artéria hepática. Artéria hepática ventral à veia porta [5].	8
9	Veia porta no rato. VMS: veia mesentérica superior; VE: veia esplênica; VP: veia porta; VGD: veia gastro-duodenal; VGE: veia gástrica esquerda; VPi: veia pilórica; Es: estômago; D: duodeno; VCCa: veia cava caudal (Adaptado de [4]).	8
10	Vascularização arterial hepática em ratos. A: aorta; EC: eixo celíaco; AHC: artéria hepática comum; AHP: artéria hepática própria; AGE: artéria gástrica esquerda; AE: artéria esplênica; AHE: artéria hepática esquerda (adaptado de [4].	8
11	Distribuição mais frequente dos ductos biliares hepáticos nos lobulos no rato. DBC: ducto biliar comum; DP: ducto pancreático; DHE: ducto hepato-entérico; E: esófago; ES: estômago; D: duodeno; LLE: lobo lateral esquerdo; LM: lobo médio; LLD: lobo lateral direito; LC: lobo caudado (adaptado de [4]	10
12	Sistema biliar esquemático de espécies sem vesícula biliar (A) e com vesícula biliar (B), respectivamente (Adaptado de cite20.	10
13	Desenho esquemático dos três conceitos de lóbulo hepático: o lóbulo clássico, o lóbulo portal e o ácino hepático (ácino de Rappaport), indicados a azul [25].	11

14	Estrutura básica de um lóbulo hepático clássico, com setas a indicar o sentido da circulação do sangue e da bÍlis (Adaptado de [28]).	11
15	Estrutura básica de um lóbulo hepático, mostrando as placas hepatocelulares, os vasos sanguíneos, o sistema coletor da bÍlis e o sistema de fluxo linfático, composto pelo espaço de Disse e pelos ductos linfáticos [29]. . . .	13
16	Diagrama esquemático de um sinusóide hepático, do espaço de Disse, dos hepatócitos e da localização das células de Kupffer e das células estreladas (Adaptado de [32].	13
17	Circulação do sangue e da bÍlis num lóbulo hepático. O sangue arterial (seta vermelha) e venoso (seta azul) entra no lóbulo hepático através dos vasos do espaço porta, passa através dos sinusoides hepáticos (seta roxa) e deixa o lóbulo através da veia central (seta azul). A veia central converge para a veia hepática que transporta o sangue venoso do fígado. A bÍlis é secretada pelos hepatócitos para os canálculos biliares (seta verde), que drenam para os ductos biliares do espaço porta (Adaptado de [28]).	15
18	Lóbulo portal (Adaptado de [31]).	16
19	Ácino hepático (Adaptado de [31]).	16
20	Desenho de um aglomerado acinar [33].	17
21	Representação esquemática das zonas de um ácino hepático [32].	19
22	Etapas da carcinogénese [37].	28
23	Ilustração das reações de fase I, mediadas pelas isoenzimas do citocromo P450 e das reações de fase II (adaptado de [49]).	31
24	Regeneração do fígado de rato, com restauração da massa original e não da forma, pela extensa proliferação celular dos lobos residuais, após hepatectomia do LLE e LM (adaptado de [50]).	32
25	A sigla DMBA refere-se à abreviatura do nome químico da substância 7,12-Dimetilbenzantraceno	33
26	Estrutura química do DMBA [57].	34
27	Formação do DMBA a partir de uma molécula de antraceno (adaptado de [55],[57]	34

28	Principais vias de exposição ao DMBA ([64], [65]).	35
29	Esquema representativo da glândula mamária de uma fêmea de rato com 55 dias de idade. A glândula está dividida em três zonas: a zona A, é proximal ao mamilo (n) e contém a maioria dos lóbulos do tipo 1 (lob); a zona B, é mediana e contém o gânglio linfático (LN); a zona C, é distal ao mamilo e contém a maioria do crescimento ativo dos TEB e também estão presentes botões alveolares (AB) e ductos terminais (TD) [76].	39
30	Via metabólica do DMBA [86].	42
31	Laboratório de Experimentação Animal II.	47
32	Gaiola retangular completa (A), com base, tampa de arame, tampa filtrante ou microisoladora e bebedouro [9]. Tampa de arame (B) possuindo uma superfície plana (1) e uma superfície mais baixa com inclinação de 45° e uma divisória interna amovível para a ração e o bebedouro (2). Base da Gaiola (C) [97].	48
33	Ração comercial peletizada para ratos.	48
34	Ratos machos da estirpe Wistar na gaiola, com bebedouro e ração comercial peletizada suspensos na tampa de arame. Cama constituída de carolo de milho e papel utilizado como enriquecimento ambiental.	49
35	Cartão de identificação das gaiolas.	49
36	Identificação temporária dos ratos nas gaiolas: rato sem traço na base da cauda (0TC) e rato com um traço na base da cauda (1TC) [98]	49
37	Organigrama temporal do protocolo experimental do grupo controlo.	50
38	Organigrama temporal do protocolo experimental do grupo teste.	50
39	O DMBA em pó foi pesado numa balança analítica.	50
40	Preparação da solução de DMBA com a ajuda de magnetes (A) e uma placa de agitador magnético (B).	51
41	Pesagem dos animais com o auxílio de uma balança digital e de um recipiente de plástico.	51
42	Administração da solução de DMBA por via endogástrica (gavagem).	52

43	Anestesia administrada por via intraperitoneal no quadrante abdominal inferior esquerdo.	53
44	Mesa de necrópsia, com o rato colocado em decúbito dorsal e fixo na placa fria.	54
45	Início da folha de necrópsia.	55
46	Pesagem do animal sacrificado.	55
47	Determinação do comprimento do focinho-ânus e focinho-ponta da cauda do rato.	55
48	Incisão desde o mento até ao púbis através da linha média ventral e alargamento para os membros.	55
49	Exposição do tecido subcutâneo e das musculaturas cervical, torácica e abdominal.	56
50	Abertura da cavidade abdominal através de uma incisão mediana abdominal sobre a linha alba, com rebatimento do peritoneu e exposição das vísceras.	56
51	Cavidade torácica aberta através de dois cortes para-esternais, com remoção do esterno cranialmente e exposição das vísceras (timo, coração e pulmões).	56
52	Registo do peso e das dimensões dos órgãos colhidos na folha de necrópsias.	56
53	Representação dos cortes efectuados no lobo lateral esquerdo do fígado e dos fragmentos obtidos para o exame histopatológico e para extracção e quantificação do DMBA.	57
54	Código de referência topográfica.	58
55	Contentor verde do grupo III (a) e contentores amarelo e vermelho do grupo IV (b).	58
56	Processador automático de tecidos do SPE (Shandon Citadel 1000).	58
57	Máquina de inclusão de blocos de parafina.	60
58	Moldes com material que foi incluído. Blocos de parafina.	60
59	Placa fria, micrótopo e banho-maria na bancada de trabalho.	61
60	Lâminas rotuladas.	63

61	Diversos atos utilizados na preparação das lâminas histológicas (adaptado [101], [102] e [103]).	64
62	Microscópio de luz Nikon coolpix 990.	65
63	Preparação do solvente, clorofórmio e metanol (2:1).	65
64	Homogeneizador manual tipo Cruscher, constituído por um tubo e um êmbolo de vidro.	66
65	Procedimento de pesagem e homogeneização do fragmento da amostra. . .	66
66	Homogeneização com solvente.	66
67	Centrífuga de bancada (Hettich Universal II).	66
68	Microcentrífuga de bancada (Sigma 1-15).	67
69	Variação do peso corporal dos ratos do grupo controlo ao longo do tempo experimental.	68
70	Variação do peso corporal dos ratos do grupo teste ao longo do tempo experimental	69
71	Ganho de peso médio dos ratos do grupo controlo e do grupo teste.	70
72	Comprimento dos ratos à necrópsia do grupo controlo e do grupo teste. . .	71
73	Fórmula do Índice de Lee.	71
74	O coração apresenta uma forma semelhante a um cone invertido, com as respetivas fórmulas do volume. V: volume; π : pi (3,14); r: raio; h: altura; a: comprimento; b: largura; c: espessura	73
75	O baço apresenta uma forma elipsoide, com a respetiva fórmula do volume. V: volume; π : pi (3,14); a: comprimento; b: largura; c: espessura.	74
76	Corte histológico do fígado de um rato do grupo controlo com um lobulo hepático clássico delimitado. Estrutura poliédrica com a veia central (V) da qual irradiam os hepatócitos e com os espaços porta (EP) à periferia (HE, ampliação 5x do original).	75

77	Corte histológico do fígado de um rato do grupo control com os hepatócitos centrolobulares bastante uniformes e organizados em trabéculas. Predominância de hepatócitos com um único núcleo redondo, com um (1) ou dois (2) nucléolos proeminentes e alguns hepatócitos binucleados (3). Células de Kupffer visíveis (4) (HE, ampliação 20x do original).	75
78	Corte histológico do espaço porta ou tríade portal de um rato do grupo control. Ramo da artéria hepática (AH), ramo da veia porta (VP) e ducto biliar (DB) (HE, ampliação 20x do original).	76
79	Corte histológico do fígado de um rato do grupo teste, com aumento do espaço entre as trabéculas e respetiva desorganização dos hepatócitos na região periportal e centrolobular, compatível com edema (HE, ampliação 5x do original).	76
80	Corte histológico do fígado de um rato do grupo teste, com aumento do espaço entre as trabéculas e hepatócitos com núcleos muito basófilos (HE, ampliação 10x do original).	77
81	Corte histológico do fígado de um rato do grupo teste, com degenerescência da zona centrolobular. Hepatócitos com aspeto pálidos e sem contornos definidos (HE, ampliação 20x do original).	77
82	Corte histológico do fígado de um rato do grupo teste, com tumefação turva dos hepatócitos. Citoplasma diluído e aspeto rendinhado, devido à formação de vacúolos de contorno imprecisos. Núcleo permanecendo em posição central (HE, ampliação 40x do original).	78
83	Cromatograma da solução padrão controlo. Presença do pico do tempo de retenção referente ao DMBA ($tr \approx 29$ min).	79
84	Cromatograma de uma amostra de fígado de um rato do grupo controlo em que não foi quantificado o DMBA. Ausência do pico do tempo de retenção referente ao DMBA ($tr \approx 29$ min).	79
85	Cromatograma da amostra do fígado do rato 17 do grupo teste onde foi quantificado o DMBA. Presença do pico do tempo de retenção referente ao DMBA ($tr \approx 2$ min).	80

86	Cromatograma de uma amostra de tecido adiposo de um rato do grupo controlo. Ausência do pico do tempo de retenção referente ao DMBA ($tr \approx 29$ min).	80
87	Cromatograma de uma amostra do tecido adiposo de um rato do grupo teste. Presença do pico do tempo de retenção referente ao DMBA ($tr \approx 29$ min).	80

Lista de Tabelas

I	Protocolo de processamento das amostras para histologia.	59
II	Resumo da técnica de coloração de rotina de Hematoxilina e Eosina de Mayer (HE) (min - minuto; N.A. - Não aplicável).	63
III	Valores médios da pesagem (g) dos órgãos recolhidos na necrópsia dos ratos.	72

Resumo

O presente estudo tem como objetivo avaliar e verificar o potencial efeito toxicológico hepático agudo da administração oral de 20 mg/kg/dia, três vezes por semana, durante 4 semanas, do hidrocarboneto aromático policíclico, DMBA, num modelo experimental com ratos, da estirpe Wistar, machos, de 8 semanas de idade. No fim do protocolo experimental, todos os animais foram sacrificados e necropsiados. Do fígado e do tecido adiposo, foram recolhidos fragmentos para avaliação histológica e para extração e determinação quantitativa da presença do DMBA, através da técnica HPLC, de forma a relacionar a intoxicação de DMBA com alterações morfológicas ao nível do fígado e a presença do DMBA nos tecidos hepático e adiposo. Neste estudo, todos os ratos em que se administrou DMBA apresentavam uma magreza em relação ao grupo controlo e observaram-se ligeiras a moderadas alterações histopatológicas de hepatotoxicidade. A análise cromatográfica quantificou a presença de DMBA no tecido adiposo dos ratos do grupo controlo. Este estudo da administração de DMBA mostrou ter um ligeiro efeito toxicológico hepático agudo, ao provocar alterações nos diferentes parâmetros avaliados, que embora não sejam muito significativas, vão de encontro aos estudos que apontam para a hepatotoxicidade do DMBA.

Palavras-Chaves: Rato, fígado, hidrocarbonetos aromáticos (HCA), 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA).

Abstract

The present study aims to evaluate and verify the potential acute hepatic toxic effects of oral administration of 20 mg/kg/day, three times a week for four weeks, the polycyclic aromatic hydrocarbon, DMBA, an experimental model with rats, strain Wistar, male, eight weeks of age. At the end of the experimental protocol, all animals were sacrificed and necropsied. Liver and adipose tissue fragments were collected for histological evaluation and extraction and quantitative determination of the presence of DMBA by HPLC technique, in order to relate the toxicity of DMBA morphological changes in the liver and in the presence of DMBA liver and adipose tissues. In this study, all rats in which DMBA was administered showed a thinness compared to the control group were observed and mild to moderate pathological changes of hepatotoxicity. Chromatographic analysis quantified the presence of DMBA in adipose tissue of rat in the control group. This study of DMBA administration has shown a slight acute hepatic toxic effects by causing changes in the different parameters evaluated, which although not very significant, go against studies that point to the hepatotoxicity of DMBA.

Password: Rat, liver, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA).

Introdução

A localização do fígado no aparelho gastrointestinal facilita a manutenção da sua homeostase interna. O sangue venoso procedente do estômago e do intestino flui pela veia porta em direção ao fígado e em seguida ingressa na circulação sistêmica. Deste modo, o fígado é o primeiro órgão a ter contacto com os nutrientes, as vitaminas, os minerais, as substâncias químicas e os tóxicos do meio ambiente, assim como, com os produtos do metabolismo das bactérias que entram no sangue pelo sistema porta. Os processos eficientes de captação do fígado retiram esses compostos absorvidos para o metabolismo, armazenamento ou excreção biliar [1].

As principais funções do fígado podem ser alteradas pela exposição a substâncias tóxicas. As células hepáticas expostas a concentrações significativas dessas substâncias, podem sofrer alterações que levam a disfunção hepática sem que ocorra uma apreciável lesão celular, à perda de função por lesão celular e até à falência do órgão quando a exposição crônica provoca substituição do tecido normal por tecido cicatricial[1].

O presente estudo pretende avaliar e verificar o potencial efeito toxicológico hepático agudo da administração por gavagem, do hidrocarboneto aromático policíclico (HAP), 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA), num modelo experimental com ratos (*Rattus no-*

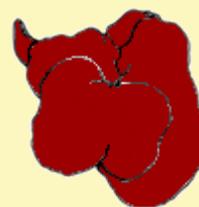


Figura 1: Fígado de rato [50]

vergicus albinus).

Para avaliar o potencial efeito toxicológico de um xenobiótico sobre o fígado, é necessário saber reconhecer uma disfunção celular e uma lesão hepática, sendo fundamental o conhecimento geral da anatomia, da organização estrutural, das funções básicas do fígado, assim como, dos processos envolvidos na eliminação das substâncias do organismo e dos mecanismos que levam à lesão celular ou à lesão do órgão [1].

O fígado é o maior órgão glandular sólido, de coloração vermelho acastanhado escuro, suave ao toque e de consistência friável, que existe em todos os animais vertebrados. A sua forma varia consideravelmente nas diferentes espécies e é em grande parte determinada pela disposição dos órgãos adjacentes. No rato, está localizado na porção cranial do abdômen, levemente deslocado para a direita e caudal ao diafragma (Figura 2) . Representa aproximadamente 5% do seu peso corporal total, enquanto nos seres humanos adultos representa 2,5%. O peso varia consoante a idade, o peso corporal e a atividade metabólica. Em ratos com peso corporal entre 250 e 300 g, o peso médio do fígado foi de 13,6 g [2], [3], [4], [5], [6],[7].

Na maioria dos vertebrados, o fígado é multilobado. As cobras são exceção a essa regra, porque a forma do corpo condiciona o fígado a uma forma simples e alongada [2]. O fígado do rato é constituído por quatro lobos de diferentes tamanhos, que terminam em bordos agudos (Figura 3). Os dois grandes lobos designam-se por lobo médio ou cístico (LM) e por lobo lateral esquerdo (LLE). Os dois pequenos lobos designam-se por lobo lateral direito (LLD) e por lobo caudado (LC) [4], [5], [6], [7], [10],[11],[12].

O lobo médio ou cístico (LM) é o maior e representa cerca de 35-40% do peso total do fígado (Madrahimov, 2005). Apresenta uma base ampla, à volta de quase metade da circunferência da veia cava. Está subdividido por uma fissura vertical profunda (fis-

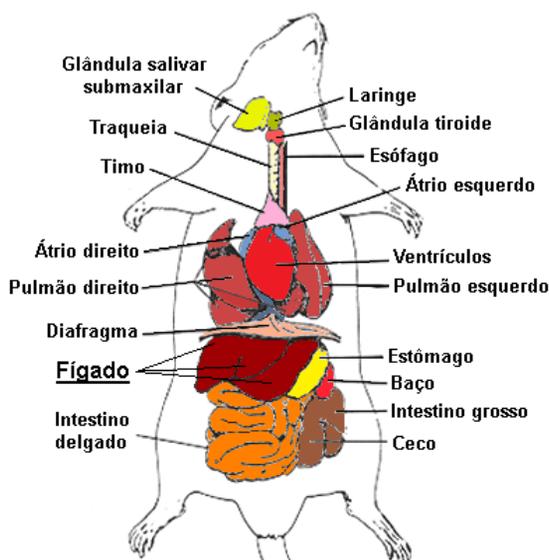


Figura 2: Esquema representativo da localização anatômica dos órgãos no rato. O fígado localiza-se caudalmente ao diafragma, na região crânio-abdominal direita (Adaptado de [8]).

sura principal, umbilical ou interlobular), num grande lobo médio direito (LMD), com cerca de 2/3 do volume do lobo e num menor lobo médio esquerdo (LME), com cerca de 1/3 do volume do lobo (Martins, 2007). Tem uma localização cranial no abdómen e está fixado à face caudal do diafragma e ao apêndice xifoide pelo ligamento falciforme, que se insere na fenda interlobular [14], [15].

O lobo lateral esquerdo (LLE) está parcialmente coberto pelo lobo médio em posição dorso-caudal e estende-se para a esquerda, cobrindo parcialmente o estômago (Figura 2). Em relação ao lobo caudado e ao estômago localiza-se em posição crânio-ventral. Representa cerca de 30-35% do peso total do fígado[14] e a sua superfície superior é ligeiramente convexa, não apresentando fissuras [7]. Os ligamentos interlobares ligam o lobo lateral esquerdo com o lobo caudado cranial [15].

Levantando ventro-cranialmente estes dois grandes lobos é possível visualizar dorsalmente o lobo lateral direito (LLD) e o lobo

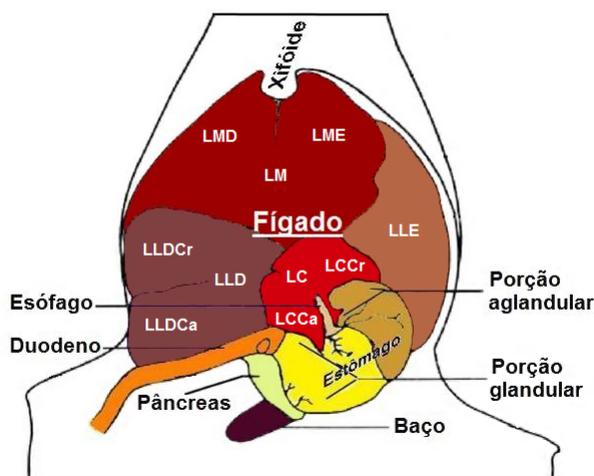


Figura 3: Orientação dos lobos do fígado na cavidade abdominal em posição ventro-dorsal e em relação com os órgãos adjacentes. O fígado relaciona-se cranialmente com o diafragma e caudalmente com o estômago, o intestino delgado, o pâncreas, o baço, o rim direito e a glândula adrenal direita. LLE: lobo lateral esquerdo; LM: lobo médio; LME: lobo médio esquerdo; LMD: lobo médio direito; LLD: lobo lateral direito; LLDCr: lobo lateral direito cranial; LLDCa: lobo lateral direito caudal; LC: lobo caudado; LCCr: lobo caudado cranial; LCCa: lobo caudado caudal (Adaptado de [13]).

caudado (LC).

O lobo lateral direito (LLD) está localizado no lado direito da veia cava, sendo quase totalmente coberto pelo lobo médio. Representa cerca de 15% do peso total do fígado e está dividido parcialmente por uma fissura horizontal em dois sub-lobos, o cranial (LLDCr) e o caudal (LLDCa) [7]. O sub-lobo cranial está fixado dorsalmente por um amplo ligamento hepato-diafragmático e o sub-lobo caudal está ligado dorsalmente ao diafragma e ventralmente à veia cava [15].

O lobo caudado (LC), também chamado de Spiegel, é o mais pequeno e localiza-se no lado esquerdo da veia porta e da veia cava inferior. Representa 8-10% do peso total do fígado [14] e está dividido em dois sub-lobos, o cranial (LCCr) e o caudal (LCCa), que envolvem o esófago (Figura 4) [5],[10],[11],[12]. O lobo caudado cranial está ligado ao lobo lateral esquerdo por um ligamento in-

terlobular fino e está completamente coberto pelo omento. O lobo caudado caudal está localizado dorsalmente ao estômago, em estreita proximidade com o pâncreas e o baço e está coberto por uma cápsula fibrosa, fixando-se à face dorsal do omento [15].

O parênquima localizado entre o lobo lateral direito e o lobo caudado é designado como sendo o processo caudado (PC) (Figura 4) [4].

Em decúbito dorsal, o fígado de rato tem três superfícies (Figura 2 e 3): cranial, caudal e dorsal. Embora o fígado de rato seja multilobado, as superfícies são bastante uniformes, pois os lobos apresentam-se encostados uns aos outros. A única exceção é o lobo caudado, que é separado do restante fígado pelo estômago. A superfície cranial (parietal) como um todo é convexa e encaixa sob a curvatura do diafragma. É constituída pela superfície cranial do lobo medial e do lobo lateral esquerdo, que é completamente coberta pelo peritoneu, exceto ao longo da linha de inserção do ligamento falciforme, que divide o lobo médio em duas partes, direito e esquerdo. A superfície caudal (visceral) é irregular e côncava e relaciona-se com o estômago, duodeno, pâncreas, baço, rim direito e glândula adrenal direita (Figura 3 e 6). Esta superfície é quase completamente revestida pelo peritoneu, que na zona do hilo hepático (fissura transversal) envolve a artéria hepática, a veia porta, o ducto hepático, os nervos e os vasos linfáticos. A superfície dorsal não é coberta pelo peritoneu, está em contacto direto com o diafragma e a parede dorsal do abdómen, estendendo-se obliquamente até ao lobo caudado. A veia cava caudal é totalmente intra-hepática [4].

O fígado de rato está ligado à superfície caudal do diafragma e à parede dorsal do abdómen por vários ligamentos, mas a principal fixação do fígado é feita através da veia cava caudal (VCCa). Esta veia estende-se crânio-caudalmente e divide-se em três partes: uma porção crânio-hepática (VCCa-Cr), que se localiza crani-

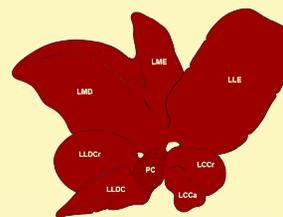


Figura 4: Lobos do parênquima hepático do rato e processo caudado (zona ponteadada). LM: lobo médio (LMD: lobo médio direito; LME: lobo médio esquerdo); LLE: lobo lateral esquerdo; LLD: lobo lateral direito (LLDCr: lobo lateral direito cranial; LLDCa: lobo lateral direito caudal); LC: lobo caudado (LCCr: lobo caudado cranial; LCCa: lobo caudado caudal); PC: processo caudado (Adaptado de [4].

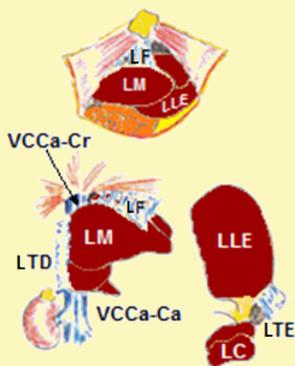


Figura 5: Principais ligamentos do fígado de rato. LF: ligamento falciforme; LTD: ligamento triangular direito; LTE: ligamento triangular esquerdo; LM: lobo médio; LLE: lobo lateral esquerdo; LLDCr: lobo lateral direito cranial; LC: lobo caudado; VCCa-Cr: veia cava caudal crânio-hepática; VCCa-Ca: veia cava caudal caudo-hepática (Adaptado de [4]).

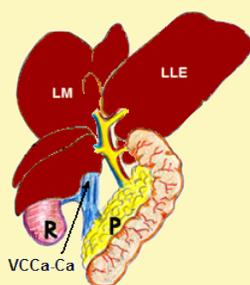


Figura 6: O hilo hepático é exposto deslocando cranialmente o lobo médio (LM) e para a esquerda o lobo lateral esquerdo (LLE) e o duodeno. R: rim direito; VCCa-Ca: veia cava caudal caudo-hepática; P: pâncreas [16]

almente ao fígado e caudalmente ao diafragma, uma porção média ou intra-hepática (VCCa-IH), uma vez que é completamente rodeado pelo parênquima hepático e uma porção caudal ou caudo-hepática (VCCa-Ca), que se localiza caudalmente ao fígado e cujo limite caudal é estabelecido pela drenagem da veia renal direita (Figura 5 e 6). As pregas peritoneais colaboram com a veia cava caudal na fixação do fígado, que formam os ligamentos que o ligam e sustentam ao abdômen e às vísceras adjacentes. O ligamento falciforme (LF) (Figura 6) é o ligamento mais cranial e é constituído por uma dobra peritoneal fina, que se estende a partir da face caudal do diafragma e do apêndice xifoide até à superfície convexa do LM, formando a fenda interlobular. O ligamento coronário consiste de uma camada superior e uma camada inferior. A camada superior também liga o fígado à superfície inferior do diafragma (Martins et al., 2007). Os ligamentos triangulares (LT) constituem um reforço lateral da parede peritoneal. O da esquerda é longo e localiza-se no lado dorsal do LLE, formando o ligamento triangular esquerdo (LTE). O direito é curto e localiza-se na vertente dorsal do LLDCr. Um ligamento interlobar fino liga o LLE ao LCCr. O ligamento redondo é um cordão fibroso resultante da obliteração da veia umbilical. O fígado também está ligado à pequena curvatura do estômago, pelo ligamento hepatogástrico e no duodeno através do ligamento hepato-duodenal. Por último, o omento contém o ducto biliar comum, a artéria hepática e a veia porta. Este é o ligamento mais caudal do fígado e tem vasos linfáticos e nervos independentes [4], [7], [14], [15].

O parênquima hepático está contido num invólucro especial sem interrupção de tecido conjuntivo, a cápsula de Glisson, que na parte mais próxima do hilo hepático envolve a artéria hepática, a veia porta e a via biliar (Figura 6 e 8). Estes três elementos formam a tríade portal, que se ramificam pelo estroma. Nela estão também presentes vasos linfáticos e nervos. Embora o tecido he-

pático seja muito friável, a cápsula que o recobre é extremamente resistente e diminui a possibilidade de lesões traumáticas [2].

O sistema circulatório do fígado (Figura 7) é diferente do observado em qualquer outro órgão, porque recebe através da zona hilar um duplo fluxo sanguíneo, sendo 25% de sangue arterial rico em oxigênio proveniente da artéria hepática e 75% de sangue venoso rico em nutrientes provenientes da veia porta, que resulta da drenagem do estômago, baço, pâncreas e intestino [17]. Esta particularidade permite ao fígado controlar as substâncias que são absorvidas em todo o intestino e determinar quais delas vão entrar e como vão entrar na circulação sistêmica. No parênquima hepático, o sangue arterial e venoso misturam-se quando entram nos sinusoides, que são canais vasculares fenestrados limitados por células endoteliais, que se situam entre as células hepáticas (hepatócitos). Deste modo, os hepatócitos estão comumente expostos ao sangue venoso portal, mas também a sangue arterial. Todo o sangue distribuído ao fígado é colhido por um único conjunto de veias, das quais as veias centrais dos lóbulos hepáticos são os ramos iniciais da veia hepática. Estas acabam por formar a veia hepática que se abre na veia cava caudal, que atravessa o parênquima hepático e distribui os nutrientes do metabolismo hepático para todo o corpo. A biliar é produzida no fígado e drenada através do trato biliar extra-hepático para o intestino (Figura 7) [18] [19].

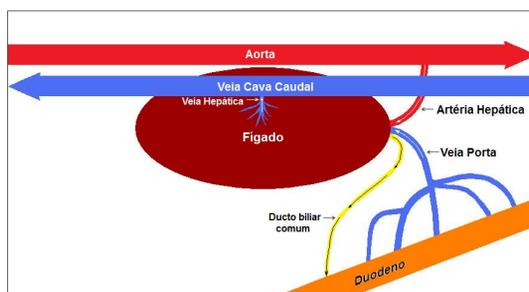


Figura 7: Vascularização hepática e trato biliar extrahepático do rato (adaptado de [17])

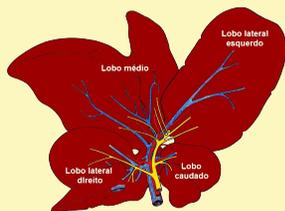


Figura 8: Anatomia do hilo hepático em rato. Vascularização venosa portal (azul), arterial (vermelho) e drenagem biliar (amarelo). Ducto biliar ventral à artéria hepática. Artéria hepática ventral à veia porta [5].

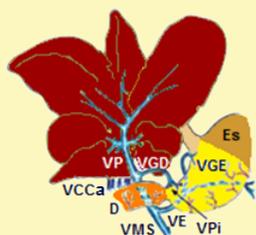


Figura 9: Veia porta no rato. VMS: veia mesentérica superior; VE: veia esplênica; VP: veia porta; VGD: veia gastro-duodenal; VGE: veia gástrica esquerda; VPI: veia pilórica; Es: estômago; D: duodeno; VCCa: veia cava caudal (Adaptado de [4]).

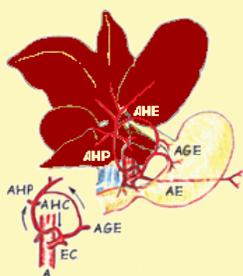


Figura 10: Vascularização arterial hepática em ratos. A: aorta; EC: eixo celíaco; AHC: artéria hepática comum; AHP: artéria hepática própria; AGE: artéria gástrica esquerda; AE: artéria esplênica; AHE: artéria hepática esquerda (adaptado de [4]).

Os lobos hepáticos no rato têm vascularização portal e arterial independentes e circulação biliar separada. No hilo hepático, o ducto biliar é ventral aos ramos da artéria hepática, assim como, os ramos da artéria hepática em relação aos ramos da veia porta (Figura 8) [5], [20].

A veia porta (VP) (Figura 9) é formada pela confluência das veias mesentérica superior (VMS) e esplênica (VE). A VE é menor do que a VMS e em ratos com peso corporal de 250 g tem cerca de 1 mm de diâmetro. A VP tem cerca de 5 mm de diâmetro e recebe a veia gastro-duodenal (VGD) que resulta da confluência das veias gástrica direita, pilórica (VPI) e pancreática-duodenal superior [4].

A primeira ramificação lobar da veia porta vai para o LLD, a segunda para o LC, em seguida, ramificam-se em dois ramos, que vascularizam o LM e ainda é emitida uma última ramificação para o LLE. O PC recebe pedículos secundários dos ramos portais do LLD e do LC (Figura 9). Assim, os LLD, LLE e LC têm apenas um ramo portal principal, ao passo que o LM tem dois ramos portais [4] [5].

O fígado de rato é irrigado por duas artérias, a artéria hepática própria (AHP) e artéria hepática esquerda (AHE) (Figura 10). A artéria hepática comum (AHC) divide-se em VGD e na AHP, que se origina no eixo celíaco (EC). A AHC vai ventralmente na parte dorsal do omento. Existem fortes aderências entre a VP e a AHP. Esta artéria passa ventralmente à VP entre o ducto biliar e a veia. A AHE é um ramo da artéria gástrica esquerda (AGE) [4].

A AHP emite primeiro dois ramos, um direito para o LLD e um esquerdo para o LC. Segue em direção cranial, na qual a AHE drena. Tem dois ramos direitos para o LMD e para o LME, respectivamente, e um ramo esquerdo para o LLE. Os pedículos arteriais secundários vascularizam o trato biliar extra-hepática, bem como o PC [4].

No rato, as vias biliares extra-hepáticas são o elemento mais

superficial do hilo hepático e a característica mais importante é a não-existência de vesícula biliar (Figura 6, 8 e 11). O trato biliar do rato tem muitas variações anatómicas. Cada lobo é drenado pelo seu próprio ducto biliar. O LLE pode ter um (30%), dois (62,5%) ou três (7,5%) ductos biliares hepáticos. A drenagem do LM faz-se por um ou quatro ductos biliares do LMD, sendo esta última a morfologia mais frequente, e por um do LME. Também tem sido observado que existe normalmente uma confluência dos ramos resultantes do LME e do LLE. Existem outros ductos biliares do PC que drenam para os ductos biliares hepáticos do LLD e do LC, assim como, a existência de uma rede biliar extra-hepática. Os ductos biliares hepáticos de cada lobo unem-se para formar o ducto biliar comum (DBC). A origem deste ducto é considerada como sendo o fim da extremidade mais distal do ducto biliar hepático, que corresponde em 40% dos casos ao ducto biliar hepático do LLD e em 22,5% ao ducto biliar hepático do LC. Nos restantes casos, corresponde à drenagem biliar de ambos os lobos simultaneamente ao nível do PC. O DBC tem aproximadamente 30 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro, descendo à esquerda da artéria hepática e da VP na superfície do PC, atravessando a primeira parte do duodeno e passando pelo pâncreas. O ducto biliar comum recebe os 2 a 8 grandes ductos principais, que drenam as glândulas acinares do pâncreas exócrino, formando o ducto hepato-entérico (DHE) que termina através do esfíncter de Oddi na segunda porção do duodeno a cerca de 25 a 30 mm de distância do piloro (Figura 6 e 11). As espécies sem vesícula biliar apresentam esfíncter de Oddi menos desenvolvido, permitindo um fluxo contínuo da bÍlis hepática para o duodeno (Figura 12.A). Desta forma, a bÍlis não é concentrada e armazenada na vesícula biliar como nos outros roedores (por exemplo, no murganho (Figura 12.B) [4],[7],[10], [11],[12],[21],[22].

O tecido hepático está constituído por células parenquimatosas (hepatócitos) e células não parenquimatosos (do ducto biliar,

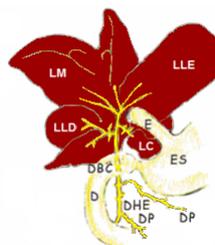


Figura 11: Distribuição mais frequente dos ductos biliares hepáticos nos lobulões no rato. DBC: ducto biliar comum; DP: ducto pancreático; DHE: ducto hepato-entérico; E: esôfago; ES: estômago; D: duodeno; LLE: lobo lateral esquerdo; LM: lobo médio; LLD: lobo lateral direito; LC: lobo caudado (adaptado de [4])

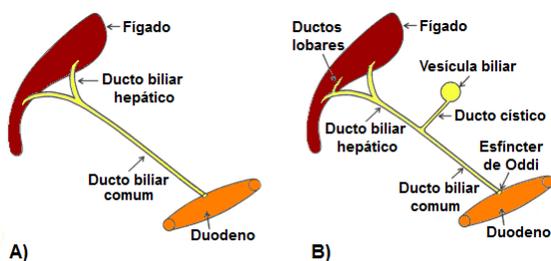


Figura 12: Sistema biliar esquemático de espécies sem vesícula biliar (A) e com vesícula biliar (B), respectivamente (Adaptado de cite20).

do endotélio, de Küpffer, de Ito e de miofibroblastos). A sua microarquitetura bidimensional pode ser vista a partir de várias perspectivas. Segundo os histologistas, há três conceitos da arquitetura do lóbulo do fígado. O conceito clássico de lóbulo hepático, que é baseado em parâmetros estruturais, o conceito de lóbulo portal, que é baseado na drenagem da secreção biliar a partir de lóbulos adjacentes em direção ao mesmo ducto biliar e o conceito de ácino hepático, que é baseado no gradiente de oxigenação a partir dos sinusoides situados em lóbulos adjacentes (Figura 13) [21], [23], [24].

Numa perspetiva anatómica, o parênquima hepático é dividido por meio de uma pequena quantidade de tecido intersticial em lóbulos clássicos que são idênticos e que constituem a unidade morfológica hepática (Krinke, 2000). O lóbulo hepático clássico é ge-

ralmente descrito como uma estrutura poliédrica que varia consoante o número de espaços porta, com uma veia central da qual irradiam os hepatócitos (Figura 14). Apresenta-se como uma unidade estrutural hexagonal bem definida nalgumas espécies como no porco, camelo, urso polar e foca, porque é delimitada por seis espaços porta e por uma elevada quantidade de tecido conjuntivo fibroso perilobular. Nas outras espécies, não existe uma definição estrutural tão nítida, porque não há uma separação de tecido conjuntivo entre os lóbulos, de modo que as trabéculas de um lóbulo parecem continuar-se com as vizinhas. Nos seres humanos e nos primatas não-humanos, esta organização geométrica é pouco definida, porque o tecido conjuntivo perilobular não é abundante. No entanto, o reconhecimento dos componentes do espaço porta, ajudam na determinação dos limites do lóbulo hepático, podendo ser delimitados fazendo uma linha imaginária entre os espaços porta que se dispõem ao redor de uma veia central. No fígado humano, três a seis espaços portais podem ser vistos por lóbulo [19],[21],[24],[25],[26],[27].

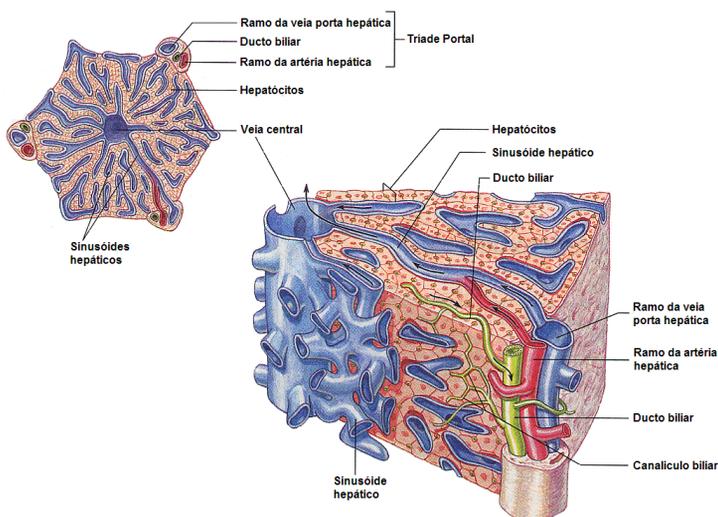


Figura 14: Estrutura básica de um lóbulo hepático clássico, com setas a indicar o sentido da circulação do sangue e da biliar (Adaptado de [28]).

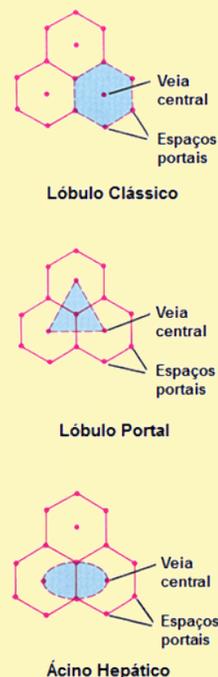


Figura 13: Desenho esquemático dos três conceitos de lóbulo hepático: o lóbulo clássico, o lóbulo portal e o ácino hepático (ácino de Rappaport), indicados a azul [25].

Os hepatócitos são bastante uniformes em termos morfológicos e estão organizados em trabéculas ou placas hepatocelulares, que têm normalmente espessura formada por dois hepatócitos (Figura 14 e 15). São as principais células funcionais do fígado, que executam um número surpreendente de funções metabólicas endócrinas e exócrinas. Apresentam-se como células grandes poligonais, com núcleos distintamente redondos e um ou dois nucléolos proeminentes. A maioria têm um único núcleo, mas os hepatócitos binucleados são comuns. Ocasionalmente os núcleos são poliplóides (contêm mais do que um conjunto de cromossomos). O citoplasma dos hepatócitos é bastante acidófilo por conter muitas mitocôndrias e algum retículo endoplasmático liso (REL), com áreas de basofilia que corresponde ao retículo endoplasmático rugoso (RER). O RER e o aparelho de Golgi estão relacionado com a síntese de proteínas, tais como a albumina, fibrinogênio, globulina e protrombina. O REL está associado com o metabolismo das hormonas esteróides e também é responsável pelos processos de oxidação, metilação e conjugação necessários para a inativação ou a desintoxicação de várias substâncias antes da sua excreção pelo organismo [21],[24],[29].

As trabéculas estão dispostas radialmente ao redor da veia central, que se localiza no meio de cada lóbulo e é o ramo inicial da veia hepática. À periferia do lóbulo encontram-se os espaços porta ou tríade portal (Figura 15) posicionados nos ângulos da estrutura poliédrica, constituídos por ramo da artéria hepática (rico em sangue oxigenado), ramo da veia porta (rico em nutrientes), ducto biliar (através do qual circula a bÍlis), nervos e vasos linfáticos [21],[29].

Entre os hepatócitos adjacentes, encontram-se pequenos canáliculos biliares (Figura 14 e 15), que se fundem para formar os dúctulos biliares ou canais de Hering, permitindo a excreção da bÍlis pelos ductos biliares do espaço porta. Entre as trabéculas

curtam os sinusóides sanguíneos hepáticos (Figura 14 e 15), que são espaços delimitados por células endoteliais com poros e fenestrações, que respondem a estímulos para aumentar ou diminuir o fluxo sanguíneo. Nestes espaços sinusoidais, estão ancorados macrófagos residentes do fígado, designados por células de Kupffer (Figura 16), que têm a capacidade de fagocitar bactérias, detritos, eritrócitos velhos e fragmentos celulares presentes na corrente sanguínea [21],[29],[30],[31].

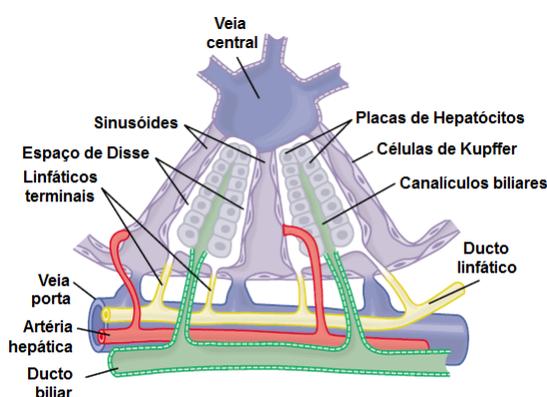


Figura 15: Estrutura básica de um lóbulo hepático, mostrando as placas hepatocelulares, os vasos sanguíneos, o sistema coletor da biliar e o sistema de fluxo linfático, composto pelo espaço de Disse e pelos ductos linfáticos [29].

O endotélio dos sinusóides é muito fenestrado, com membrana basal reduzida e modificada, o que permite o livre acesso do plasma e da albumina às microvilosidades dos hepatócitos, facilitando a passagem de moléculas ligadas à albumina para dentro da célula hepática (Figura 16) [21],[29].

Entre o endotélio sinusoidal e os hepatócitos existe o espaço de Disse ou espaço perissinusoidal (Figura 15 e 16). O plasma que sai dos sinusóides tem livre acesso a este espaço, que se interliga com os vasos linfáticos do espaço porta, permitindo que o excesso de líquido seja removido. Os hepatócitos não entram em contacto com a circulação sanguínea, em vez disso, o espaço de Disse age como um compartimento intermediário entre eles, onde

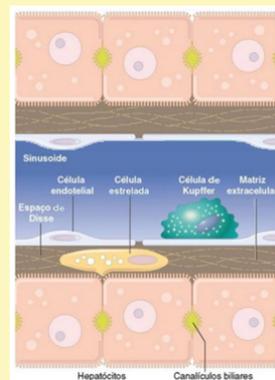


Figura 16: Diagrama esquemático de um sinusóide hepático, do espaço de Disse, dos hepatócitos e da localização das células de Kupffer e das células estreladas (Adaptado de [32]).

as microvilosidades dos hepatócitos ocupam grande parte desse espaço, o que facilita a troca de substâncias [21],[29],[34]

As células de Ito (Figura 16), também conhecidas por células estreladas ou lipócitos hepáticos, estão localizadas no espaço de Disse e armazenam lípidos e vitaminas lipossolúveis no organismo, como a vitamina A sob a forma de esteres de retinol. Estas células segregam fatores de crescimento necessários à formação de novos hepatócitos. Quando a função hepática está comprometida, os hepatócitos libertam o fator de crescimento tumoral β e, em resposta, as células de armazenamento de gordura podem dividir-se, alterando o seu fenótipo, começando a sintetizar e a libertar colagénio para o espaço de Disse. Deste modo, forma-se tecido conjuntivo fibroso que substitui os hepatócitos lesados pela ação de toxinas. Quando necessário, estas células diferenciam-se em miofibroblastos, que controlam o fluxo de sangue para os sinusóides. Na cirrose hepática, a fibrose perisinusoidal deposita-se de forma excessiva [30],[31],[33],[34].

No espaço de Disse, observam-se também células semelhantes a grandes linfócitos denominadas de células Pit, que apresentam curtos pseudópodos e grânulos citoplasmáticos, que se acredita que sejam células *Natural Killer*, que destroem células tumorais, bem como células necrosadas. Elas possuem um nível elevado de citotoxicidade contra uma variedade de linhas de células tumorais. A morte das células tumorais é reforçada quando as células Pit atuam sinergicamente com as células de Kupffer. A proporção de células Pit em relação às células de Kupffer é de 2:10 [30],[33],[34],[35].

No lóbulo hepático, o sangue flui centralmente dos respetivos ramos da tríade portal, atravessando os sinusóides até à veia centrolobular, que é o ramo inicial da veia hepática (Figura 17). O sangue sai do fígado através da veia hepática até à veia cava. Como o sangue flui através dos sinusóides, uma quantidade considerá-

vel de plasma é filtrada para dentro do espaço entre o endotélio e os hepatócitos (espaço de Disse), contribuindo para a formação de uma fração importante da linfa do organismo. A linfa proveniente diretamente do espaço de Disse apresenta sentido retrógrado para o espaço porta e daí para o hilo hepático (Figura 15). A bÍlis é segregada pelos hepatócitos para o espaço de Disse e é drenada periféricamente para dentro dos canaliculos biliares e finalmente para os ductos biliares na tríade portal (Figura 17). Obviamente, este conceito morfológico tem falhas, porque o sangue dos espaços porta na realidade flui em todas as direções [21],[28],[29].

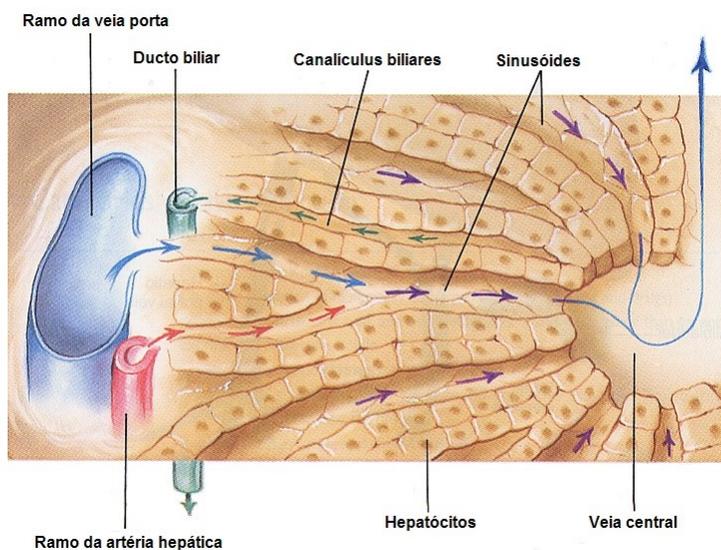


Figura 17: Circulação do sangue e da bÍlis num lóbulos hepático. O sangue arterial (seta vermelha) e venoso (seta azul) entra no lóbulos hepático através dos vasos do espaço porta, passa através dos sinusóides hepáticos (seta roxa) e deixa o lóbulos através da veia central (seta azul). A veia central converge para a veia hepática que transporta o sangue venoso do fígado. A bÍlis é secretada pelos hepatócitos para os canaliculos biliares (seta verde), que drenam para os ductos biliares do espaço porta (Adaptado de [28]).

Numa perspectiva funcional de secreção exócrina da bÍlis, o parênquima hepático é dividido em lóbulos portais (Figura 18). Em corte histológico, o lóbulos portal é definido como uma região triangular centrada em torno de um espaço porta e cuja periferia é

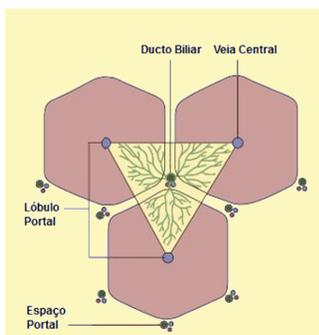


Figura 18: Lóbulo portal (Adaptado de [31]).

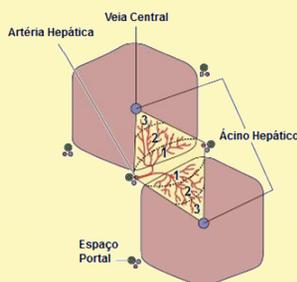


Figura 19: Ácino hepático (Adaptado de [31]).

delimitada por linhas retas imaginárias unindo as três veias centrais, que formam os três ápices do triângulo. Contém porções de três lóbulos hepáticos clássicos e é definido em termos de fluxo biliar. Este conceito permite uma descrição da estrutura do parênquima hepático comparável ao de outras glândulas exócrinas, pois o conceito de uma secreção exócrina fluindo para a periferia de um lóbulo não é consistente com a situação dos ácidos da maioria das glândulas, nas quais a secreção vai para o lúmen no centro do ácino. Por isso, os histologistas sugeriram que todos os hepatócitos, que lançam a sua bÍlis num ducto biliar interlobular determinado, constituem um lóbulo, denominado lóbulo portal. Neste conceito de lobulação do fígado, o ducto biliar está no centro do lóbulo cite30, [24],[25],[31].

Numa perspetiva funcional da actividade metabólica e do fluxo sanguíneo, o parênquima hepático é dividido em ácidos hepáticos (ácinos de Rappaport) (Figura 19), que representam as unidades funcionais hepáticas. Cada uma destas unidades funcionais está centrada sobre a linha que liga dois espaços porta e estende-se para fora, para as duas veias centrais adjacentes, com a forma semelhante a uma elipse ou a um losango, englobando duas secções triangulares de dois lóbulos hepáticos clássicos adjacentes. O sangue flui dos espaços porta pelos sinusoides até às duas veias centrais e a bÍlis flui do canalículos biliares para o ducto biliar do espaço porta. Esta representação é mais precisa quanto à função do fígado, porque é orientada à volta do sistema vascular aferente, mas é mais difícil de definir histologicamente. Serve também como unidade de secreção para o transporte de bÍlis [21],[24],[30],[33].

Os ácidos simples são agrupados em ácidos complexos, que são por sua vez agrupados em aglomerados acinares (Figura 20). A estrutura geral destes aglomerados assemelha-se a um cacho de uvas (Figura 20), mas na realidade é apenas um agrupamento funcional do parênquima hepático, que é uniforme, liso e contínuo.

Estes são abastecidos por um ramo da veia porta e um ramo da artéria hepática [33].

Considera-se o parênquima hepático do ácino dividido em três zonas concêntricas mal definidas (Figura 19 e 21), que recebem sangue sinusoidal com determinada sequência, resultando numa variação do gradiente de oxigênio, da atividade metabólica e da distribuição das enzimas dos hepatócitos. Este conceito, de grande importância fisiopatológica, explica o aparecimento de alterações histopatológicas que ocorrem no fígado e a ordem na qual os hepatócitos degeneram após uma agressão tóxica ou por hipoxia. É importante para a descrição e para a interpretação dos padrões de degenerescência, de regeneração e dos efeitos tóxicos específicos no parênquima hepático. A distribuição das lesões no fígado como resultado da isquemia e da exposição às substâncias tóxicas podem ser explicadas utilizando esta interpretação zonal [24],[25],[30].

A zona 1 (periportal) (Figura 19 e 21) é a mais próxima do espaço porta e os hepatócitos desta zona recebem o sangue que acabou de fluir dos ramos da veia porta e da artéria hepática, tendo acesso às maiores concentrações de diversas substâncias, tanto boas (oxigênio e nutrientes) como prejudiciais (fármacos e toxinas) absorvidas pelo aparelho gastrointestinal. Recebendo sangue mais oxigenado, estes hepatócitos tornam-se menos sensíveis à lesão isquêmica e estando sujeitas a elevadas concentrações de substâncias tóxicas diretas são os que sofrem o maior impacto. Os hepatócitos da zona 1 são os mais sensíveis às lesões oxidativas, porque são ricos em mitocôndrias e são especializados nas funções oxidativas do fígado, tais como a gliconeogénese, a β -oxidação dos ácidos gordos, a síntese do colesterol e a desintoxicação da amónia em ureia. Sendo estas células as primeiras a receber oxigênio, nutrientes e toxinas do sangue sinusoidal, são as primeiras a mostrar alterações morfológicas após oclusão do ducto

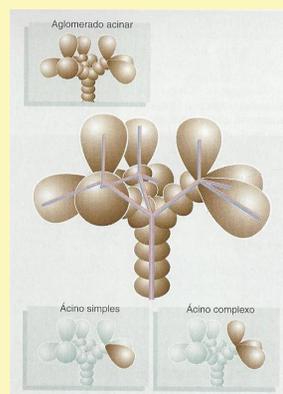


Figura 20: Desenho de um aglomerado acinar [33].

biliar (estase biliar). São também as últimas a morrer se a circulação for prejudicada e as primeiras a serem regeneradas (Ross et al., 2006). A zona 3 (pericentral) (Figura 19 e 21), localizada perto da veia central, é a mais distante e recebe sangue com menor quantidade de oxigênio e de substâncias diretas (nutrientes, fármacos e toxinas absorvidos pelo trato gastrointestinal). A menor quantidade de oxigênio recebida por esta zona torna-a mais suscetível à lesão isquêmica (necrose centrolobular) em situações de perfusão reduzida, sendo a primeira a mostrar acumulação de gordura. Estes hepatócitos são os últimos a responder a substâncias tóxicas diretas e à estase biliar e são os mais importantes para a glicólise, a lipogênese e a desintoxicação de substâncias baseadas na proteína do citocromo P-450, pois é onde se encontram os níveis mais elevados desta enzima no ácino. Os hepatócitos da zona 3 são os que recebem as maiores concentrações de produtos do metabolismo hepático, que são libertados na corrente sanguínea pelos hepatócitos das outras zonas. As substâncias tóxicas geradas em consequência deste metabolismo hepático causam mais lesões nos hepatócitos da zona 3, devido a atingir aí maiores concentrações. Entre as duas zonas descritas anteriormente, situa-se a zona 2 (de transição) (Figura 19 e 21), que tem características funcionais e morfológicas intermédias. [25],[33],[36],[37].

Esta distribuição funcional por zonas aplica-se apenas aos processos realizados na presença de substâncias difusíveis. No entanto, o fígado também está envolvido em numerosas vias que participam na captação de substâncias mediadas por recetores e por transporte ativo, que são incapazes de sofrer livre difusão nas células. Essas substâncias penetram em qualquer hepatócito que tenha transportadores apropriados, independentemente da zona em que se encontra. O mesmo acontece para as substâncias altamente ligadas a proteínas transportadoras, para as quais o fígado não possui recetores [36].

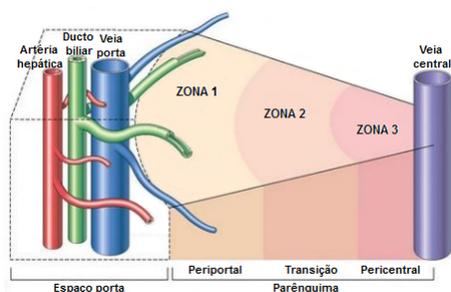


Figura 21: Representação esquemática das zonas de um ácino hepático [32].

Algumas características do fígado, como o peso, a atividade mitótica, o conteúdo de glicogênio e de lipídios podem variar devido ao ritmo circadiano dos animais. Alterações comuns do fígado, como a presença do pigmento de lipofuscina e de hemossiderina nos hepatócitos e nas células de Kupffer, variações na poliploidia dos hepatócitos e formação de corpos de pseudo-inclusão intranucleares, podem ser associadas à idade. A poliploidia é uma característica morfológica comum no animal adulto e o número de células binucleares aumenta com a idade. Além disso, o envelhecimento é frequentemente associado com colangiofibrose e formação ocasional de quistos biliares, especialmente em fêmeas [21].

À semelhança do pâncreas, o fígado é classificado como uma glândula mista, mas ao contrário, a mesma célula do fígado (hepatócito) é responsável pela componente exócrina ao produzir biliar, que é excretada para o duodeno e pela componente endócrina, porque a maioria dos seus produtos são libertados na corrente sanguínea [19],[26].

O fígado do rato desempenha inúmeras funções essenciais inter-relacionadas para manter o ambiente interno do organismo, realizando diversos processos químicos como parte do metabolismo normal. O metabolismo, conjunto de transformações que as substâncias químicas sofrem no interior dos organismos vivos, é constituído por reações anabólicas ou de síntese e reações cata-

bólicas ou de decomposição. As reações anabólicas são reações químicas que produzem nova matéria orgânica nos seres vivos, sintetizando novos compostos (moléculas mais complexas) a partir de moléculas simples, com consumo de energia sob a forma de trifosfato de adenosina (ATP). As reações catabólicas são reações químicas que produzem grandes quantidades de energia (ATP) a partir da decomposição ou degradação de moléculas mais complexas (matéria orgânica). Quando o catabolismo supera em atividade o anabolismo, o organismo perde massa, o que acontece em períodos de jejum ou doença, mas se o anabolismo superar o catabolismo, o organismo cresce ou ganha massa. Se ambos os processos estão em equilíbrio, o organismo encontra-se em homeostase [38].

O fígado é o órgão que apresenta maior taxa metabólica, sendo-lhe atribuído funções metabólicas dos hidratos de carbono, proteínas, lípidos, hormonas e substâncias estranhas, para manter o balanço entre a produção e a eliminação de substâncias endógenas (sais biliares, bilirrubina e hormonas) e exógenas (nutrientes, drogas e toxinas). Normalmente, metaboliza substâncias úteis para o organismo, tais como a glicose na forma de glicogénio, aminoácidos, lípidos e vitaminas, mas também tem um papel fundamental na biotransformação de substâncias estranhas, que não são encontradas naturalmente no organismo e que tanto podem ser benéficas ou prejudiciais, os designados xenobióticos, tais como, produtos industriais, fármacos, tóxicos, aditivos de alimentos e compostos inorgânicos. O termo biotransformação tem sido utilizado para expressar todas as transformações químicas que ocorrem somente com os compostos considerados xenobióticos, reservando a expressão metabolismo para indicar as reações químicas que ocorrem com os compostos endógenos ou exógenos essenciais à vida [11],[12],[39].

O fígado é órgão central da homeostase da glicose, respon-

dendo rapidamente às flutuações dos seus níveis sanguíneos, o que o torna importante para a manutenção de uma concentração normal de glicose no sangue. Os glúcidos ingeridos são transformados em moléculas de glicose, que é a principal fonte de energia das células. No estado prandial, o excesso de glicose no sangue é desviado para o fígado para ser armazenado sob a forma de glicogénio e durante o jejum a glicose sanguínea diminui abaixo do normal, sendo estabilizada pelos hepatócitos que hidrolisam o glicogénio em glicose, processo denominado de glicogenólise. O excesso de glicogénio no fígado pela contínua ingestão de glúcidos leva à sua transformação em triglicerídeos (lipogénese) e acumulação nos tecidos. Os hepatócitos também podem sintetizar glicose de outros açúcares, como a frutose e a galactose, ou de compostos não pertencentes ao grupo dos glúcidos, como os aminoácidos, o lactato e o glicerol, por um processo denominado neoglicogénese hepática, ajudando assim a manter uma concentração relativamente normal de glicose no sangue, quando necessário [29],[33],[40],[41].

O organismo não pode dispensar a contribuição do fígado para o metabolismo das proteínas, pela sua capacidade de sintetizar aminoácidos e outros compostos químicos importantes a partir destes. Os aminoácidos não essenciais podem ser todos sintetizados no fígado. Para serem utilizados para produzir energia ou serem convertidos em glúcidos ou lípidos é necessária a sua desaminação, processo que ocorre essencialmente no fígado. Uma pequena quantidade da desaminação pode ocorrer noutros tecidos do corpo, sobretudo nos rins, mas esta é muito menos importante. Grandes quantidades de amónia são formadas pelo processo de desaminação e quantidades adicionais são continuamente formadas no intestino por ação de bactérias e em seguida absorvidas pelo sangue. Uma das funções essenciais do fígado é a eliminação de amónia do sangue por conversão em ureia, que é muito

menos tóxica e é excretada pela urina. Se o fígado não formar a ureia, a concentração de amônia no plasma sobe rapidamente e resulta em encefalopatia hepática e eventual morte [40],[41].

Os hepatócitos também sintetizam a partir dos aminoácidos a maioria das proteínas plasmáticas, cerca de 90%, tais como albumina, alfa e beta globulinas (excepto as gama globulinas que são no tecido linfóide), fatores de coagulação (fibrinogénio, protrombina), proteínas transportadoras de ligação específica (ferro, cobre e vitamina A), proteínas transportadoras de hormonas (proteínas de ligação de esteroides e de hormonas da tiróide) e proteínas necessárias para as reações do complemento. A diminuição das proteínas plasmáticas provoca uma elevada taxa de mitoses das células hepáticas, provocando o crescimento do fígado. Este efeito está associado com uma rápida produção de proteínas, de forma a permitir que a concentração no plasma volte ao normal. A albumina é a principal fonte de pressão oncótica do plasma. A sua diminuição nas doenças crónicas do fígado leva a edema e ascite. O fígado tem também um papel importante na manutenção da homeostase, pelo papel importante na coagulação e no sistema fibrinolítico. A coagulação sanguínea requer a produção contínua de fatores de coagulação, a maioria dos quais, incluindo protrombina e fibrinogénio, são produzidos pelos hepatócitos. A vitamina K é necessária nos processos metabólicos do fígado para a formação de várias dessas substâncias, especialmente a trombina e os fatores VII, IX e X. Na ausência de vitamina K, as concentrações de todas essas substâncias diminuem acentuadamente, o que quase impede a coagulação do sangue [19],[29],[33],[36],[40],[41].

Embora a maioria das células do corpo metabolizem os lípidos, certos aspetos do seu metabolismo ocorrem principalmente no fígado. As suas funções específicas no metabolismo dos lípidos incluem a oxidação dos ácidos gordos para fornecer energia para as outras funções corporais, a síntese de grandes quantidades de

colesterol, fosfolípidos, da maioria das lipoproteínas e a síntese de lípidos a partir de hidratos de carbono e proteínas. Para obter energia a partir dos lípidos, eles são primeiramente desdobrados em glicerol e ácidos gordos. Os ácidos gordos são divididos por beta-oxidação, formando a acetil-coenzima A (acetil-CoA), que ao entrar no ciclo do ácido cítrico e ao ser oxidada liberta grandes quantidades de energia. A beta-oxidação pode ocorrer em todas as células do corpo, mas ocorre de forma particularmente rápida nas células hepáticas. O fígado em si não pode usar toda a acetil-CoA que é formada, sendo esta é convertida em ácido acetoacético pela condensação de duas moléculas de acetil-CoA. Este ácido é altamente solúvel, que passa das células hepáticas para o fluido extracelular e é transportado ao longo do organismo para ser absorvida pelos diversos tecidos. Estes tecidos reconvertem o ácido acetoacético em acetil-CoA e, em seguida, oxidam-na para ser utilizada. No processo de controlo dos níveis de colesterol no organismo, o fígado segrega e capta várias partículas de lipoproteínas. Algumas dessas partículas de lipoproteínas de densidades muito baixa (VLDL) servem para distribuir os lípidos no tecido adiposo para armazenar na forma de gordura ou noutros tecidos para uso imediato. Durante essas funções, a estrutura das partículas das VLDL é modificada pela perda de componentes lipídicos e proteicos. As partículas resultantes de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) retornam ao fígado, em razão da sua afinidade por um recetor específico, o recetor de LDL, presente na superfície de várias células do organismo, incluindo os hepatócitos. Os fosfolípidos são também sintetizados no fígado e transportados principalmente pelas lipoproteínas. O colesterol e os fosfolípidos são usados pelas células para formar as membranas, as estruturas intracelulares e várias substâncias químicas que são importantes para a função celular. Outras partículas de lipoproteínas de alta densidade (HDL) são sintetizadas e segregadas pelo fígado e eliminam o excesso de

colesterol e de triglicérides de outros tecidos e da corrente sanguínea, que retornam ao fígado, onde são excretados. A maioria do colesterol sintetizado no fígado é convertido em sais biliares, que são excretados para a bÍlis. Por conseguinte, tanto a secreção de HDL quanto a remoção de LDL são mecanismos pelos quais o excesso de colesterol é removido da circulação [29],[36],[40],[41].

O fígado é um importante lugar de armazenamento de glicogênio, triglicérides, vitaminas lipossolúveis, ferro e cobre. Os glúcidos no fígado são armazenados sob a forma de glicogênio e constituem uma fonte importante de reserva de glicose no organismo. Os lípidos também são armazenados no fígado sob a forma de triglicérides. A vitamina armazenada em maior quantidade no fígado é a vitamina A, mas as vitaminas D, B12, E e K também estão presentes em quantidades substanciais. O fígado contém reservas destas vitaminas suficientes para impedir a sua deficiência durante bastante tempo. O ferro está presente na hemoglobina do sangue, sendo também armazenado no fígado, sob a forma de ferritina. Os hepatócitos contêm grandes quantidades de uma proteína chamada apoferritina, que é capaz de se combinar de forma reversível com o ferro. Quando o ferro está disponível em excesso no sangue, combina-se com apoferritina para formar ferritina e é armazenado sob esta forma nas hepatócitos até ser necessário. Quando o ferro atinge um nível baixo na circulação sanguínea, a ferritina liberta o ferro. Outras funções do fígado em relação ao metabolismo do ferro é a formação de glóbulos vermelhos. Juntamente com a medula óssea e o baço, o fígado participa na produção de células sanguíneas. Por ser um grande órgão passível de expansão, o fígado tal como o baço, tem a capacidade de armazenar grande quantidade de sangue nas veias e nos sinusoides. É um importante reservatório de sangue em épocas de volume sanguíneo excessivo, sendo capaz de fornecer quantidades adicionais de sangue em situações de redução do volume sanguíneo

[19],[29],[41].

A concepção do sistema hepático é de tal forma que todo o sangue que flui através do tubo digestivo, baço e pâncreas, chega até ao fígado através da veia porta, passando pelos sinusoides, deixando o fígado através das veias hepáticas e da veia cava para a circulação geral. Este fluxo de sangue através do fígado, antes de se esvaziar para a veia cava, permite que as células reticuloendoteliais que revestem os sinusoides (células de Kupffer) fagocitem as bactérias e outras partículas que podem entrar no sangue a partir do trato gastrointestinal, prevenindo o transporte direto de agentes potencialmente nocivos. Por isso, o fígado é um órgão essencial para a filtração de contaminantes a partir do sangue [19],[29].

Apesar do fígado não ser considerado um órgão do sistema endócrino tem também a capacidade de transformar importantes hormonas e vitaminas numa forma mais activa. Destaca-se a hidroxilação inicial da vitamina D, a desiodinização da tiroxina (T4) em triiodotironina (T3) e a síntese de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) em resposta à hormona de crescimento produzida na hipófise. Para além disso, tem também um papel importante na degradação de diversas hormonas segregadas pelas glândulas endócrinas, tais como a tiroxina e todas as hormonas esteroides (estrogénio, cortisol e aldosterona) que são quimicamente alteradas e excretados pelo fígado. A agressão do fígado pode levar à acumulação excessiva de uma ou mais dessas hormonas nos fluidos corporais, podendo causar hiperatividade dos sistemas endócrinos [29].

O principal produto de excreção do fígado é a bília, uma mistura aquosa de bilirrubina conjugada, ácidos biliares, fosfolípidos, colesterol e eletrólitos, cuja função vital é emulsionar os lípidos do sistema digestivo, para torná-los mais facilmente absorvidos, permitindo também eliminar produtos do catabolismo do grupo heme

(bilirrubina), toxinas, carcinogénios, medicamentos, metabólitos, cálcio e cobre [33],[40],[41].

Embora o fígado seja, em termos quantitativos, o órgão mais importante na biotransformação dos xenobióticos, outros tecidos do corpo também são capazes de biotransformar os xenobióticos. Os locais particularmente ativos incluem a pele, pulmões, rins e aparelho gastrintestinal. A capacidade do fígado e de outros tecidos extra-hepáticos biotransformarem os xenobióticos, produzindo metabólitos inativos, menos ativos ou mais ativos antes de alcançarem a corrente sanguínea, é denominado efeito pré-sistémico de primeira passagem [39],[42].

Os xenobióticos apresentam graus variáveis de hidrossolubilidade e lipossolubilidade. Os hidrossolúveis são substâncias polares e ionizáveis nos valores fisiológicos de pH dos diversos compartimentos do organismo, que atravessam as membranas biológicas com grande dificuldade, estando presentes no filtrado glomerular e sendo facilmente excretadas. Os lipossolúveis são substâncias não polares e não ionizáveis nos diversos compartimentos do organismo, atravessando rápida e eficazmente as membranas biológicas, especialmente por difusão passiva. Embora sejam filtrados nos glomérulos renais, são prontamente reabsorvidos nos túbulos renais, na fase reabsortiva de formação da urina, retornando à circulação sistémica. A mesma propriedade química que aumenta a biodisponibilidade destas substâncias, também pode dificultar a sua excreção renal, visto que a depuração pelo rim exige que se tornem mais polares e hidrofílicas, de modo a poderem ser dissolvidas na urina aquosa e excretadas. Por isso, os xenobióticos lipossolúveis necessitam de passar por um processo de biotransformação para produzir compostos mais polares e hidrofílicos, passíveis de serem excretados por via biliar ou renal. Este processo é o principal responsável pela concentração sanguínea e tecidual de todos os compostos químicos que foram introduzidos

no organismo. Desta forma, os xenobióticos absorvidos podem ser eliminados sem biotransformação ou sob a forma de metabólitos biotransformados [39].

Para realizar as suas funções, os hepatócitos contêm uma grande quantidade de enzimas com funções oxidativas e redutíveis, entre as quais se encontram o sistema do citocromo da proteína 450 (P-450), flavina-monooxigenases, peroxidases, hidroxilases, esterases e amidases. Outras enzimas também presentes são as glicoriltransferases, sulfattransferases, metilases, acetiltransferases e tioltransferases. Os sistemas enzimáticos envolvidos nas reações de biotransformação hepática dos xenobióticos estão localizados em diversos compartimentos do hepatócito, como os microsomas, mitocôndrias, citosol, peroxissomas e lisossomas. Todas estas enzimas têm grande importância na biotransformação dos xenobióticos, porque podem alterar essas substâncias de várias maneiras, tornando-as benéficas, prejudiciais ou simplesmente ineficientes. No caso dos fármacos, substâncias utilizadas para modular funções corporais com fins terapêuticos, o fármaco ativo pode ser convertido em fármaco inativo ou num metabólito ativo ou tóxico, assim como, um pró-fármaco inativo pode ser convertido num fármaco ativo e um fármaco não excretável pode ser convertido num metabólito passível de excreção por via biliar ou renal. Quando se trata de substâncias tóxicas, nalguns casos, a sua biotransformação converte-as em substâncias menos tóxicas ou não tóxicas de fácil excreção, exercendo o fígado funções de desintoxicação do organismo. Por vezes, resulta na produção de um metabólito que é mais tóxico que o composto original, denominando-se este processo de bioativação. Este efeito lateral indesejável da biotransformação ocorre quando se produzem espécies químicas muito reativas, usualmente compostos electrofilicos com grande afinidade para os nucleófilos (DNA, proteínas e lípidos), que modificam essencialmente as macromoléculas celulares, resultando em efeitos

tóxicos e carcinogénicos. A lesão é sempre consequência da alteração da estrutura, seja da membrana celular ou secundária a alterações diretas de enzimas ou de transportadores vitais para a célula [26],[39],[42],[43],[44],[45],[48].

Acredita-se que a maioria dos agentes carcinogénicos induzem neoplasias malignas alterando direta ou indiretamente o ADN, especialmente o ADN associado com a síntese ou a regulação de proto-oncogenes e genes supressores de tumores [46].

O processo de carcinogénese envolve uma série de etapas definíveis e reprodutíveis, sendo teoricamente definidas como iniciação, promoção e progressão (Figura 22).

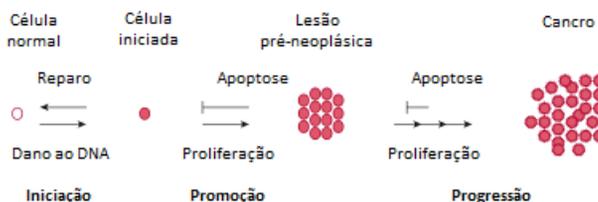


Figura 22: Etapas da carcinogénese [37].

A primeira etapa da carcinogénese consiste num processo rápido e irreversível resultante da ação mutagénica de um carcinogénio. Os carcinogénios químicos e físicos que estabelecem ligações covalentes com o ADN e formam adutos levam a alterações genéticas (mutações e deleções) e são conhecidos como agentes iniciantes ou iniciadores. A iniciação torna-se definitiva quando a lesão do ADN não é corrigida ou reparada completamente antes da síntese do ADN e da divisão celular. A célula iniciada pode permanecer estática, não proliferando ou pode adquirir mutações incompatíveis com a viabilidade e/ou funções normais, podendo assim, ser eliminada por mecanismos apoptóticos ou ainda a célula pode iniciar o ciclo de divisão celular e proliferar [37].

A segunda etapa da carcinogénese envolve a expansão clonal das células iniciadas para o desenvolvimento de lesões pré-

neoplásicas, por meio de agentes promotores que atuam por diversos mecanismos envolvendo alterações na expressão gênica que estimulam a proliferação celular e inibem a apoptose. A promoção é reversível quando se remove o estímulo promotor e as lesões pré-neoplásicas podem então regredir a células únicas iniciadas [37].

A progressão envolve a conversão de lesões pré-neoplásicas em neoplásicas. Nesta etapa, há um aumento da síntese de ADN e da proliferação celular das lesões pré-neoplásicas e podem ocorrer outros eventos genotóxicos, como aberrações cromossômicas e translocações, que resultam em mais lesões do ADN. A etapa de progressão é irreversível na formação de neoplasias, sejam benignas ou malignas. As células param de responder aos estímulos de controlo de crescimento e ocorre proliferação celular autónoma. A progressão espontânea pode ocorrer a partir de alterações cariotípicas espontâneas que ocorrem em células mitoticamente ativas iniciadas durante esta etapa [37],[48].

Os xenobióticos que iniciam e promovem a formação de tumores são agentes carcinogénicos completos. Outros apenas têm a capacidade de iniciar a sua formação, sendo considerados agentes carcinogénicos incompletos, que necessitam da contribuição de outros xenobióticos com ação promotora para o desenvolvimento de neoplasias [47].

São exemplos representativos de vários xenobióticos específicos que são ativados metabolicamente em carcinogénicos e tóxicos, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP's), compostos nitrogenados (nitrosaminas, arilaminas, arilamidas, compostos nitro e hidrazinas), compostos halogenados e compostos sulfurados [47],[48].

As reações químicas envolvidas na biotransformação hepática dos xenobióticos são categorizadas, não somente pela natureza envolvida, mas também pela sequência normal com que elas ocor-

rem. Estas reações catalisadas pelas enzimas biotransformadoras de xenobióticos são classificadas em reações de fase I (ou pré-sintéticas) e reações de fase II (sintéticas ou de conjugação) [39],[43],[44],[45].

As reações pré-sintéticas ou de fase I são essencialmente de oxidação, redução e hidrólise. São reações catabólicas, que introduzem ou modificam um grupo funcional polar na substância original, como o hidroxilo (-OH), a amina (-NH₂), o carboxilo (-COOH) ou o tiol (-SH), resultando num pequeno aumento da hidrofília. Com frequência, esses metabólitos podem ser excretados sem qualquer modificação adicional. Outras vezes, as reações oxidativas da fase I são o passo inicial da biotransformação dos xenobióticos e as reações da fase II seguem-se às de fase I. Nesse processo, os seus metabólitos são convertidos em componentes mais hidrossolúveis, que podem ser mais facilmente eliminados pela biliar ou pelos rins. A maioria das reações oxidativas são mediadas pelas isoenzimas do citocromo P450 (Figura 23), existentes no microssoma celular, parte integrante do retículo endoplasmático liso das células, e pela associação da enzima NADPH-citocromo P450 redutase. O xenobiótico combina-se com o citocromo P450+3 oxidado para formar o complexo xenobiótico-citocromo P450+3. Este complexo é então reduzido para o complexo xenobiótico-citocromo P450+2, catalisado pela enzima NADPH-citocromo P450 redutase. O complexo reduzido combina-se com o oxigénio molecular para formar intermediários oxigenados. Um oxigénio molecular combina-se com dois átomos de H⁺ e um electrão para forma uma molécula de água. O outro átomo de oxigénio permanece ligado ao complexo xenobiótico-citocromo P450+3 e é transferido para o citocrome P450+3 da molécula do xenobiótico. O xenobiótico com um oxigénio molecular incorporado é libertado do complexo. O citocromo P450+3 é libertado, podendo ser reciclado para a oxidação de outras molécula de xenobiótico [39],[43],[44],[45],[49].

As reações de fase II, também designadas por reações de conjugação, são de natureza sintética e mais rápidas que as reações de fase I. Estas incluem as reações de glucuronidação, sulfatação, acetilação, metilação e conjugação com compostos endógenos como os aminoácidos (glicina e taurina) e sulfatos, para formar glucuronídeos, acetatos e outros adutos, que são inativos, altamente polares, hidrossolúveis e facilmente excretáveis pela biliar e pelos rins. As reações de fase II seguem-se às de fase I (Figura 23), mas poderão ainda ocorrer antes da fase I ou simultaneamente. As reações de fase II aumentam a hidrossolubilidade dos xenobióticos para facilitar a eliminação renal. A maioria das enzimas de conjugação, como a sulfotransferase e a S-transferase, estão localizadas no citosol, excepto a UDP-glucuronosiltransferase, que é uma enzima microsomal [39],[43],[44],[45],[49].

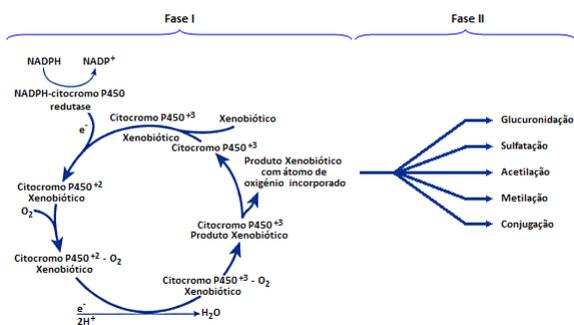


Figura 23: Ilustração das reações de fase I, mediadas pelas isoenzimas do citocromo P450 e das reações de fase II (adaptado de [49]).

Como consequência das funções de biotransformação desempenhadas, o fígado torna-se um órgão alvo de toxicidade e de carcinogénese, mas apresenta uma capacidade regenerativa superior a outros órgãos. A regeneração hepática representa um mecanismo de proteção orgânica contra a perda de tecido hepático funcional por lesão induzida por compostos químicos (toxinas), agentes infecciosos (vírus da hepatite B) ou mecânicos (trauma ou

hepatetomia parcial) [29],[40].

A regeneração hepática ocorre através da proliferação organizada de todos os tipos de células residentes, através da hiperplasia e hipertrofia celular, resultando na regeneração da sua arquitetura, do seu tamanho e no restabelecimento da sua função. Não há propriamente uma reconstituição da estrutura prévia à lesão, mas sim um crescimento compensatório, que leva à formação de uma nova anatomia lobar, não havendo na realidade uma reconstituição da anatomia inicial (Figura 24). Os défices de tecido hepático são prontamente e rapidamente restabelecidos em apenas uma ou duas semanas nos roedores, mesmo quando ocorre uma extensa perda da sua massa. Durante a regeneração do fígado, os hepatócitos são estimulados a replicarem-se e depois do tamanho e volume do fígado original ser alcançado, os hepatócitos reverterem ao seu estado de repouso normal [29].

Este mecanismo de regeneração é ainda pouco conhecido, mas sabe-se que é controlado por fatores de transformação de crescimento, tais como o fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), fator de crescimento da epiderme e interleucina-6. O fator de crescimento dos hepatócitos parece ser o fator mais importante que causa a divisão e o crescimento das células e é produzido por células mesenquimatosas no fígado e noutros tecidos, mas não pelos hepatócitos. Os níveis sanguíneos do HGF sobem significativamente após uma hepatectomia parcial, mas as respostas mitogénicas são normalmente encontrados apenas no fígado, o que sugere que o HGF só é ativado no próprio órgão. Outros fatores, como o fator de crescimento da epiderme e as citocinas, tais como o factor de necrose tumoral e a interleucina-6, também podem estar envolvidos na estimulação da regeneração de células do fígado e são libertados pelas células de Ito, situadas no espaço de Disse. Na maioria dos casos, a capacidade de replicação dos hepatócitos restantes é responsável pela regeneração. Quando a lesão

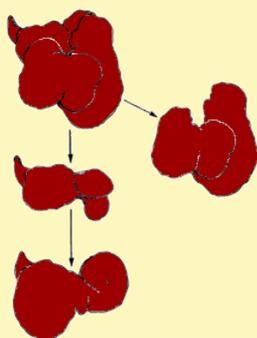


Figura 24: Regeneração do fígado de rato, com restauração da massa original e não da forma, pela extensa proliferação celular dos lobos residuais, após hepatectomia do LLE e LM (adaptado de [50]).

hepatotóxica é demasiadamente grande, a regeneração do fígado ocorre pela atividade mitótica das células ovais dos colangíolos e dos canais de Hering [29],[49].

O crescimento do fígado é regulado por um sinal desconhecido, relacionado com o tamanho do corpo, de modo que a proporção do peso do fígado em relação ao peso corporal é mantida para uma função metabólica ideal. Depois do fígado voltar ao seu tamanho original, o processo de divisão celular hepático é terminado. Mais uma vez, os factores envolvidos não são bem compreendidos, embora o factor de crescimento transformante- β , que é uma citocina segregada por células hepáticas, é um potente inibidor da proliferação celular do fígado e tem sido sugerido como o principal terminador da regeneração hepática [29],[49].

Nas agressões contínuas ou repetidas aos hepatócitos durante um longo período de tempo, a multiplicação de células do fígado é seguida por um aumento acentuado da quantidade de tecido conjuntivo. Nestas situações, os hepatócitos libertam o fator de crescimento tumoral β e, em resposta, as células de Ito alteram o seu fenótipo, dividem-se e começam a sintetizar colagénio para o espaço de Disse. Deste modo, forma-se tecido conjuntivo fibroso que substitui os hepatócitos danificados. O excesso de tecido conjuntivo perisinusoidal resulta na desorganização da estrutura do fígado, tornando-se num processo progressivo e irreversível, que leva a uma insuficiência hepática [29],[30],[31],[33],[34].

Neste estudo, utilizou-se o hidrocarboneto aromático policíclico (HAP), 7,12 -Dimetilbenz(a)antraceno, também conhecido como 7,12-DMBA ou DMBA (Figura 25), com o objectivo de avaliar o seu potencial efeito toxicológico hepático agudo.

Os HAP's são um grupo de compostos orgânicos que na sua constituição contêm apenas átomos de carbono e hidrogénio, formando dois ou mais anéis aromáticos de benzeno fundidos ou agrupados entre si e organizados sob a forma linear ou angular,

DMBA - Di
Metil
Benz(a)
Antraceno

Figura 25: A sigla DMBA refere-se à abreviatura do nome químico da substância 7,12-Dimetilbenzantraceno

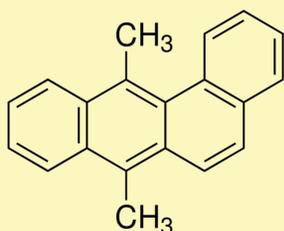


Figura 26: Estrutura química do DMBA [57].

o que lhes conferem diferentes propriedades. Neste caso específico, o DMBA é constituído por quatro anéis aromáticos organizados de forma angular e dois grupos metil (Figura 26). É um HAP de massa molecular 256,34 g/mol e ponto de fusão de 122 a 123 °C [51],[52],[53],[54],[55],[56],[57].

A estrutura química do DMBA deriva do antraceno (molécula com uma organização linear), pela adição de dois grupos metilo à região L e pela adição do núcleo benzénico à região K (Figura 27). Esta particularidade confere à molécula maior efeito carcinogénico, que mais adiante será caracterizada [55].

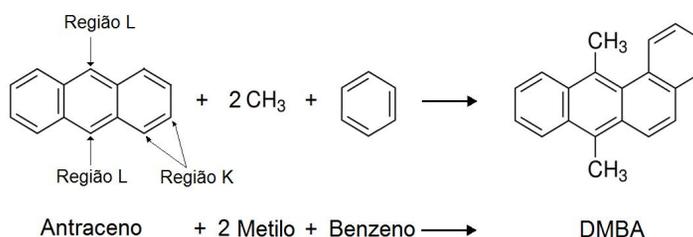


Figura 27: Formação do DMBA a partir de uma molécula de antraceno (adaptado de [55],[57])

Na literatura podemos encontrar para o nome químico da substância 7,12-Dimetilbenzantraceno, uma variedade de sinónimos, tais como: Dimetilbenzantraceno; 7,12 - Dimetilbenzantraceno; 7,12- Dimetilbenz(a)antraceno; 7,12- Dimetilbenzo(a)antraceno; 7,12 -Dimetil-1,2-benzantraceno; 7,12-Dimetil-1,2-benz(a)antraceno; 1,4-Dimetil-2,3-benzofenantreno; 6,7-Dimetil-1,2-benzantraceno; 9,10-Dimetilbenzantraceno; 9,10-Dimetil benz(a)antraceno; 9,10-Dimetil-1,2-benzantraceno; 9,10-dimetil-1,2-benz(a)antraceno [56].

O DMBA é um composto muito pouco hidrosolúvel, mas é altamente lipofílico, sendo por esta razão, rapidamente absorvido e distribuído no organismo. É solúvel na maioria dos solventes orgânicos (tolueno, clorofórmio, diclorometano, etanol, éter dietílico, n-octanal) [56],[58],[59].

O DMBA, como todos os HAP's, é conhecido por ser um con-



Figura 28: Principais vias de exposição ao DMBA ([64], [65]).

taminante ambiental ubíquo e é considerado como um dos fatores etiológicos de neoplasias malignas em humanos. Está presente no fumo do cigarro, do carvão, da madeira queimada, do alcatrão de carvão e dos motores a gasolina e a diesel (Figura 28). Desta forma, ele pode estar presente no ar e nalguns alimentos grelhados a carvão. Pode ser absorvido através da pele, do aparelho respiratória e do aparelho gastro-intestinal, mas a principal via de exposição humana é pela inalação do fumo do cigarro e do charuto. Na experimentação animal, pode ser administrado por via intravenosa (IV), intraperitonal (IP), subcutânea (SC), oral (gavagem) e inalatória. Calcula-se a dose letal para 50% dos animais (LD50), a dose da substância que produz a morte de 50% dos animais. A LD50 é de 340 mg/kg por via oral em murganhos, de 327 mg/kg por via oral na ratazana e de 54 mg/kg por via intravenosa em ratos [56],[57],[58],[60],[61],[63].

Tem-se-lhe atribuído vários efeitos toxicológicos, imunotóxicos, mutagénicos, teratogénicos e carcinogénicos. Induz a transformação maligna nos sistemas de transformação de células *in vitro*, sendo mutagénico para as bactérias e para as células dos mamíferos. Por todos estes efeitos, este composto químico é utilizado na investigação médica e farmacêutica e tem sido alvo de muitos estudos experimentais. No Laboratório, o DMBA é utilizado em experimentação animal nos modelos experimentais, como um indutor

e promotor de neoplasias, independentemente da via de administração. É descrito como um potente carcinogénico completo, pois age tanto na iniciação como na promoção, o que justifica a sua ampla utilização no estudo da oncogénese química, visto que garante o desenvolvimento de todo o processo sem a necessidade de outras substâncias coadjuvantes [56],[58],[61],[62],[66].

A biotransformação do DMBA e de outros hidrocarbonetos policíclicos é um passo essencial para o início da carcinogénese. A conversão do DMBA nos seus metabólitos finais carcinogénicos é conseguido principalmente pelas enzimas da família 1 do citocromo P450 (CYP). Em particular, as isoformas CYP1A são responsáveis pela sua bioativação no fígado, o órgão principal do metabolismo do DMBA, ao passo que as enzimas CYP1B exercem a sua atividade predominantemente em tecidos extra-hepáticos, como por exemplo na glândula mamária. O fígado desempenha um papel central na produção de agentes mutagénicos que podem ser transportados para outros tecidos, onde podem também ser metabolicamente ativados em metabólitos reactivos com o ADN. Os metabólitos tóxicos do DMBA incluem epóxidos-diol que são capazes de se ligar a resíduos de adenina do ADN, provocando lesões cromossómicas, induzindo neoplasias em diversos tecidos alvo [67],[68].

Experimentalmente, o DMBA tem sido utilizado para a indução de tumores orais em hamster. O modelo experimental para o estudo do carcinoma da boca, que imita a nível morfológico, histológico e molecular o tumor oral humano, foi estabelecido por Salley, através da utilização de uma solução de DMBA a 0,5%, aplicada na bolsa da bochecha de hamsters, três vezes por semana. O DMBA medeia a carcinogénese em hamsters induzindo a inflamação crónica, gerando um excesso de stresse oxidativo, que prejudica a defesa antioxidante e as enzimas de desintoxicação que são importantes na activação e excreção dos carcinogénicos e seus

metabólitos [66],[69],[70] .

No estudo experimental para induzir neoplasias das glândulas salivares, têm sido utilizados como animais de pesquisa o murgelho, o rato, o hamster e coelho. O carcinogénico químico mais utilizado tem sido o DMBA. Nestes estudos, é necessária a exposição cirúrgica das glândulas salivares para inserir o DMBA na forma de implantes em esponjas, na forma de pellet ou ainda injectado na forma de solução em diferentes veículos como vaselina e acetona. O seu uso por outra via, que não a implantação direta ou a injeção no parênquima glandular, somente provoca neoplasias noutros locais anatómicos. No entanto, as alterações descritas pelos vários autores têm sido conflituais e não consistentes, porque divergem quanto aos modelos animais e, às vezes, quanto às lesões causadas no mesmo modelo, utilizando-se a mesma metodologia. Essas discrepâncias sugerem que a carcinogénese nas glândulas salivares é de difícil reprodutibilidade [71].

No estudo da neoplasia maligna da mama humano, o DMBA também tem sido utilizado para induzir quimicamente a carcinogénese mamária em modelos experimentais com fêmeas de ratos da estirpe Sprague-Dawley. Nesta estirpe, ocorre o aparecimento espontâneo de tumores mamários, verificados em estudos de envelhecimento. Além disso, as suas glândulas mamárias são suscetíveis à transformação induzida por este agente carcinogénico químico. Este modelo foi desenvolvido a partir dos trabalhos de Huggins, que demonstrou a capacidade do DMBA em produzir adenocarcinomas mamários hormono-dependentes em estirpes de fêmeas de ratos selecionadas, pela administração de uma dose única de 30 mg (em óleo) por via oral ou 5 mg por via endovenosa (emulsão lipídica). Além de induzir tumores mamários, também provocou necrose massiva da supra-renal. Quando administrado em várias doses com intervalos de poucos dias, aumentou a quantidade de neoplasias. Russo & Russo aprimoraram este

modelo através da administração do DMBA por gavagem em dose única de 2,5 a 20 mg, para induzir tumores com latências que variaram geralmente entre as 8 e as 21 semanas, com uma incidência de tumores finais de quase 100%, quando existiu tempo suficiente decorrido antes da necrópsia. O uso do DMBA como indutor de carcinoma mamário demonstrou ter a vantagem de ser efetivo após administração de uma dose única comparada com protocolos de doses múltiplas com outros carcinogênicos. No tecido mamário, o DMBA é convertido em epóxidos, que são metabólitos ativos com uma capacidade de lesar a molécula de ADN, que é o principal evento na iniciação da carcinogênese [72],[73],[74],[75].

A indução de tumor mamário pelo DMBA depende também do estado hormonal do animal, que se observa na resistência à indução de tumores nos machos adultos e nas fêmeas ovariectomizadas. Esta resistência parece ser devida em parte, à ausência das hormonas ováricas na promoção do tumor. Um possível mecanismo para a ação das hormonas ováricas é o efeito sobre o metabolismo da substância carcinogénica. É amplamente aceite que a transformação metabólica do DMBA e de outros hidrocarbonetos policíclicos é um passo essencial para o início da carcinogénese. Demonstrou-se que o epitélio mamário tem a capacidade de metabolizar o DMBA, no entanto, a possível importância do metabolismo hepático no processo de iniciação do cancro não deve ser subestimado, porque o fígado é um dos principais órgãos onde ocorre o metabolismo e a distribuição *in vivo* de xenobióticos. Além disso, as alterações no metabolismo hepático podem afetar o equilíbrio entre os níveis dos produtos de desintoxicação e dos metabólitos carcinogénicos. O metabolismo hepático no rato é conhecido por ser influenciado também pelas hormonas sexuais. Os maiores níveis de citocromo P-450 e NADPH-citocromo P-450 redutase no fígado são encontrados mais em ratos machos do que em fêmeas. Existe também diferenças sexuais no perfil do citocromo P-450 no

fígado de rato [68].

Os tumores mamários em ratos surgem no epitélio da extremidade do botão terminal (*Terminal End Buds - TEB*) (Figura 29), que são estruturas comparáveis às unidades lobulares ductais terminais (*Terminal Ductal Lobular Unit - TDLU*) no tecido mamário humano. O grau de diferenciação lobular é de extrema importância na suscetibilidade à carcinogénese. O DMBA atua nas células intermédias da extremidade do botão terminal (TEB) e é a partir desta estrutura que se desenvolve a proliferação intraductal, o carcinoma *in situ* e o carcinoma invasivo. A fase da organogénese ativa do tecido mamário e do elevado índice de proliferação das TEB, corresponde à idade de início da maturação sexual, que ocorre entre os 45 e os 60 dias de idade. É nesta fase que se deve realizar a administração do DMBA [72],[75].

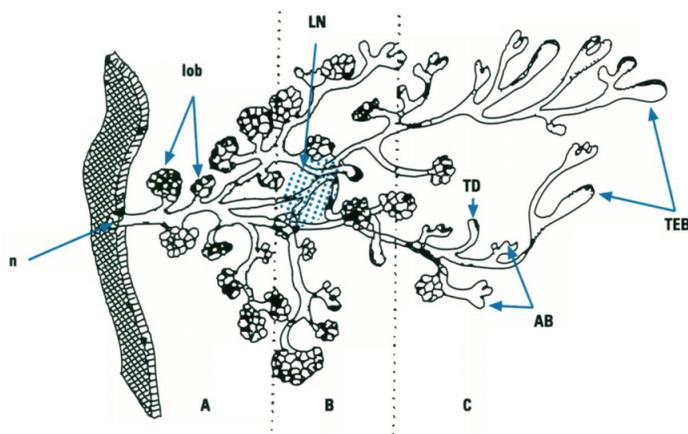


Figura 29: Esquema representativo da glândula mamária de uma fêmea de rato com 55 dias de idade. A glândula está dividida em três zonas: a zona A, é proximal ao mamilo (n) e contém a maioria dos lóbulos do tipo 1 (lob); a zona B, é mediana e contém o gânglio linfático (LN); a zona C, é distal ao mamilo e contém a maioria do crescimento ativo dos TEB e também estão presentes botões alveolares (AB) e ductos terminais (TD) [76]

O epitélio mamário dos animais e dos seres humanos está incorporado numa massa de tecido adiposo, que serve como um reservatório eficaz para a libertação lenta e sustentada do carcino-

géneo lipofílico e dos seus metabólitos, com pouca hipótese de desintoxicação por conjugação. Esta particularidade pode contribuir para uma maior susceptibilidade do DMBA para a carcinogénese mamária [77].

Apesar da sua origem não humana, este modelo experimental, tem sido amplamente utilizado, pois reflete vários aspectos da biologia do cancro da mama. De acordo com a literatura, a estrutura histológica predominantemente ductal dos tumores mamários dos ratos assemelham-se aos dos humanos. No entanto, de acordo com Murad e von Haam, nos ratos a proliferação de células epiteliais e mioepiteliais ocorre em proporções relativamente iguais, enquanto que nos carcinomas da mama humanos, a proliferação ocorre quase exclusivamente em células epiteliais. Estes autores utilizam este argumento para justificar a ausência de metástases tumorais nos ratos, sendo esta a principal desvantagens do modelo de indução de neoplasias mamárias pelo DMBA. Apesar desta objeção, não deixa de ser uma ferramenta útil para o estudo da patogénese da neoplasia maligna e dos mecanismos moleculares envolvidos na iniciação e progressão do processo neoplásico [72],[73],[75],[78],[79].

A neoplasia maligna da pele, sendo a forma mais comum de cancro diagnosticado no ser humano, evolui através de três fases distintas, a iniciação, a promoção e a progressão. Começa pelas lesões pré-cancerosas e na iniciação da carcinogénese as toxinas ambientais desempenham um papel crucial. Por isso, na experimentação animal, têm sido realizados vários estudos relativos à indução com DMBA de tumores da pele em murgalhos albinos Swiss. Está demonstrado, que podem ser induzidos no modelo de carcinogénese completa, que requer múltiplas aplicações tópicas de DMBA, que funciona como iniciador e promotor, ou por um modelo de carcinogénese de duas fases, em que se inicia por uma dose de DMBA subcarcinogénica, seguida por várias

aplicações a longo-prazo de um promotor de tumores, tal como o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) ou o óleo de cróton. O modelo de carcinogénese de duas fases, provoca a formação predominante de tumores benignos (papilomas) e também de alguns carcinomas, enquanto que no modelo de carcinogénese completa leva ao desenvolvimento de uma proporção muito mais elevada de carcinomas [80],[81],[82],[83],[84],[85].

O DMBA requer ativação metabólica para induzir a sua carcinogenicidade na pele dos murganhos. Esta ocorre nas células pela ação do CYP1A1 CYP1B1 da enzima CYP450 do citocromo, que origina o metabólito carcinogénico final 1,2-epóxido-3,4-diol DMBA, responsável pela formação de adutos com o ADN. Os adutos levam a mutações, que são pré-requisitos para o desenvolvimento de tumores (figura 30). Além disso, medeia o processo carcinogénico pela indução de inflamação crónica e excessiva produção das espécies reativas de oxigénio (ROS), desencadeando a lesão oxidativa do ADN (Figura 30). Os promotores tumorais estimulam a produção de peróxido de hidrogénio (H₂O₂), de superóxido (O₂⁻) e de óxido nítrico (NO) nas células de Langerhans, macrófagos e células não fagocíticas. O stresse oxidativo desempenha um papel determinante na ativação e ampliação do processo de promoção de tumores, ao induzir a peroxidação lipídica e a quebra na cadeia de ADN através da modulação das diferentes expressões génicas das vias metabólicas [86],[87],[88].

A grande aplicação dos modelos da carcinogénese na pele tem sido no estudo do potencial quimiopreventivo de substâncias naturais e sintéticas, que é considerado atualmente como uma das estratégias mais importantes para o controlo do cancro. Pretende-se com a quimioprevenção evitar os eventos de iniciação e de promoção que ocorrem durante o processo de desenvolvimento neoplásico, visando modular diretamente os passos específicos no processo carcinogénico. Desta maneira, bloqueia-se o efeito mu-

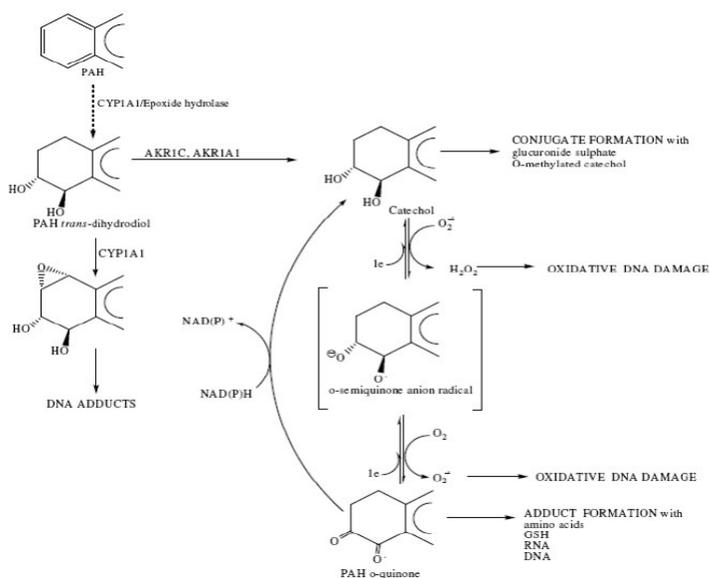


Figura 30: Via metabólica do DMBA [86].

tagénico dos carcinogénios, evita-se a lesão no ADN por radicais livres, suprime-se a diferenciação de células epiteliais e a apoptose [60],[81],[86].

O DMBA além de ser um potente carcinogénico, também pode provocar uma extensa necrose hormono-dependente do córtex da glândula adrenal do rato. A sua acção adrenocorticolítica foi descoberta durante estudos carcinogénicos, proporcionando um dos primeiros modelos animais da necrose adrenal. A sua aplicação como um medicamento adrenocorticolítico não tem sido amplamente utilizado por causa do seu efeito carcinogénico. Huggins demonstrou que uma única dose de DMBA dissolvida em óleo de sésamo, administrada por via endogástrica (gavagem) em ratos da estirpe Sprague-Dawley, com idade de 50 dias, provocava apoplexia e necrose maciça da glândula adrenal. Submeteu vários grupos de 10 ratos a doses crescentes de 10 a 100 mg e verificou que todos os ratos que receberam uma dose igual ou superior a 60 mg de DMBA morreram em 7 dias ou menos. A LD50 calculada foi de

27 mg/100 g para uma única administração endogástrica, em ratos machos da estirpe Sprague-Dawley. Quando administrou a dose de 20 mg (12 mg/100 g), produziu necrose adrenal em 79% dos ratos fêmeas da estirpe Sprague-Dawley, com idade de 50 dias. A dose óptima de DMBA para a indução de necrose adrenal por uma única administração endogástrica foi de 30 mg (18mg/100g), porque nenhum rato morreu após esta dose e todos os animais desenvolveram hemorragia e necrose da glândula adrenal, apesar de ter sido observado uma diarreia leve em todos eles. A mesma experiência foi efetuada por via intravenosa, com doses graduadas de DMBA, de 1 a 20 mg. A LD50 de DMBA por via intravenosa em ratos machos da estirpe Sprague-Dawley foi de 4,75 mg/100 g. A dose óptima para a indução da necrose adrenal sob estas condições foi de 5 mg (3 mg/100g). Nenhum rato injectado com esta quantidade morreu, todos desenvolveram hemorragia e necrose da glândula adrenal e desenvolveram uma diarreia ligeira no dia 2 [89],[90],[91].

A indução química de adenocarcinomas pancreáticos em modelos animais também tem sido usada na investigação da neoplasia maligna pancreática humana. Os primeiros modelos foram desenvolvidos na década de 1979 em ratos usando o DMBA, a azaserina e o N-nitroso-bis (2-oxipropil) amina, através da injeção intraperitoneal. No entanto, estes modelos também desenvolveram efeitos fora do órgão alvo, nomeadamente tumores nos pulmões e no fígado, devido à livre difusão das substâncias cancerígenas por todo o organismo. Para evitar este efeito, passou-se a implantar directamente no próprio órgão dos ratos e dos murganhos através de uma laparotomia mediana, conforme descrito por Dissin e cols, Bockmen e cols e Rivera e cols. Apenas o modelo usando o DMBA teve êxito na indução do adenocarcinoma ductal, com características histológicas semelhantes ao cancro pancreático humano, sintetizando a progressão da doença humana. As outras substâncias

cancerígenas clássicas mostraram-se ineficientes. Este modelo com DMBA é utilizado na investigação da carcinogénese para estudar a progressão molecular das lesões precursoras até ao adenocarcinoma [92],[93],[94],[95],[96].

No fígado, diversos estudos demonstraram que o DMBA induz lesões tóxicas e carcinogénicas. Num estudo, com ratos em que foi administrado intraperitonealmente uma dose única de 40 mg/kg por peso corporal de DMBA, foram encontradas lesões hepatocelulares, nomeadamente desorganização estrutural, cirrose hepática, congestão dos vasos sanguíneos, hemorragia intercelular, núcleos picnóticos dos hepatócitos, ativação das células de Kupffer e dilatação dos sinusóides sanguíneos. Na matriz extracelular foi observado uma excessiva deposição de colagénio ao redor dos capilares sanguíneos venosos, característica da fibrose e cirrose. Estas alterações estão de acordo com o encontrado por muitos outros investigadores e são atribuídas à maior produção de espécies reactivas de oxigénio e à inibição ou à perturbação da produção das enzimas anti-oxidantes. O DMBA produz uma concentração muito mais elevada de radicais livres do que os compostos não carcinogénicos. Estes radicais livres podem resultar em ligações cruzadas do ADN, proteínas e lípidos ou lesão oxidativa de diferentes grupos funcionais de importantes macromoléculas, causando lesões moleculares e celulares. Além disso, os metabolitos tóxicos do DMBA incluindo o epóxido-diol no tecido hepático são capazes de se ligarem a resíduos de adenina do ADN, provocando lesões cromossómicas. Em 2011, Jesus efetuou um trabalho experimental com ratos Wistar que utilizou metade da dose referida anteriormente (20 mg/Kg, três vezes por semana, durante quatro semanas) e encontrou igualmente alterações histopatológicas hepáticas relacionadas com o DMBA [55],[61],[67].

Objectivos

Tendo como base os fundamentos expostos, procurou-se avaliar a reprodutibilidade dos efeitos toxicológicos hepáticos agudos da administração de DMBA por gavagem, na dose 20 mg/kg de DMBA, três vezes por semana, pela análise histopatológica das amostras recolhidas do fígado dos ratos sujeitos ao protocolo experimental e pela quantificação do DMBA no tecido hepático e adiposo por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).

Materiais e Métodos

O presente estudo *in vivo* foi realizado em colaboração com o Serviço de Patologia Experimental e o Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC) do Pólo I e o Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra, no âmbito da Tese de Dissertação Final de Mestrado em Patologia Experimental, apresentado à FMUC e teve em conta todas as normas legais e éticas na experimentação animal, em vigor em Portugal.

Foram utilizados 18 animais saudáveis da espécie *Rattus norvegicus albinus*, da estirpe Wistar, machos, com idade média de 8 semanas, provenientes do biotério Charles-River de Barcelona (Espanha) e transferidos para o Laboratório de Experimentação Animal II (LEA II) (Figura 1), do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC) do Pólo I, onde foram mantidos em regime experimental sob condições de manutenção e manipulação padrão e idênticas. Todos os animais foram submetidos a um período prévio de quarentena de sete dias, com a finalidade de aclimatização e de exclusão de qualquer tipo de patologia, de forma a garantir o mesmo estado de saúde.

O alojamento e a manutenção destes animais em regime experimental foi realizado de acordo com as condições padronizadas de climatização e controladas permanentemente pelos técnicos qualificados do biotério através da monitorização e do registo de me-



(a)

(b)

Figura 31: Laboratório de Experimentação Animal II.

dições diárias, de forma a manter os valores nos intervalos recomendados (temperatura de 20-24°C, humidade relativa de 45-65% e luminosidade com ciclos de 12h de luz e 12h de escuro). A manutenção das condições ideais para o alojamento e produção de animais, permite garantir a reprodutibilidade, a comparabilidade, a possibilidade de fazer generalizações e conseqüentemente, a validação científica da investigação experimental.

Os animais foram alojados de forma aleatória em grupos de dois, em gaiolas rectangulares transparentes de policarbonato tipo III, de dimensões padronizadas para ratos, colocadas em estantes (Figura 32). São gaiolas leves, de fácil limpeza e auto-claváveis, que têm tampas de arame de aço galvanizado com espaçamento de 7 mm, possuindo uma superfície plana e uma superfície mais baixa com inclinação de 45° e uma divisória interna amovível para a ração e o bebedouro. Têm tampas filtrantes ou microisoladoras para manter um microambiente adequado. Utilizou-se corola de milho como material de cama, com a função de absorção da urina e da água derramada do bebedouro, proporcionando um ambiente confortável no período estabelecido entre as trocas. Colocou-se papel na gaiola como enriquecimento ambiental, permitindo ao animal brincar, escavar e esconder-se, expressando tanto quanto possível o seu comportamento normal.

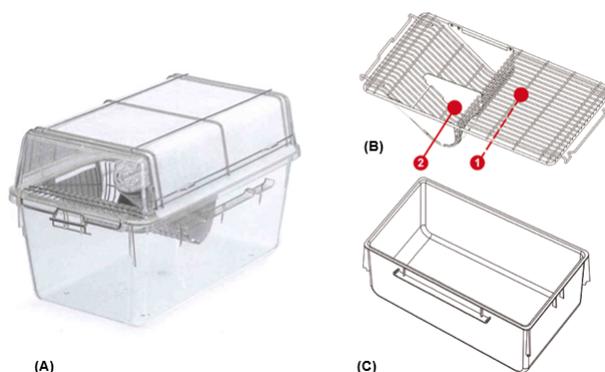


Figura 32: Gaiola rectangular completa (A), com base, tampa de arame, tampa filtrante ou microisoladora e bebedouro [9]. Tampa de arame (B) possuindo uma superfície plana (1) e uma superfície mais baixa com inclinação de 45° e uma divisória interna amovível para a ração e o bebedouro (2). Base da Gaiola (C) [97].

As gaiolas foram higienizadas, limpas e autoclavadas três vezes por semana, de maneira a que os animais se mantivessem limpos e secos e que a concentração de poluentes, tais como o amoníaco, estivessem abaixo dos níveis irritantes para as mucosas. O substrato da cama, a ração e a água foram removidos e substituídos por materiais frescos.

Os animais foram mantidos e alimentados com água e ração comercial peletizada (Figura 33) de manutenção para ratos (Referência 4 RF21) oferecida *ad libitum* por meio de bebedouro e comedouro suspensos na tampa de arame da gaiola (Figura 34), verificados diariamente de forma a permitir que os animais tivessem sempre água e ração disponíveis. A água foi tratada com ácido clorídrico (HCl) diluído para se obter um pH entre 2,5 e 3,2, evitando-se o crescimento bacteriano.



Figura 33: Ração comercial peletizada para ratos.

Todas as gaiolas foram identificadas com uma placa, constituída por um cartão plastificado, onde se inserem as seguintes informações: código da experiência, número da gaiola, grupo, número de animais na gaiola, espécie, estirpe, data de nascimento, data de entrada, data de saída e utilizador (Figura 35).



Figura 34: Ratos machos da estirpe Wistar na gaiola, com bebedouro e ração comercial peletizada suspensos na tampa de arame. Cama constituída de carolo de milho e papel utilizado como enriquecimento ambiental.

Os animais nas gaiolas foram identificados por marcação na cauda, através de uma marca individual temporária (traço na base da cauda), realizada com uma caneta de tinta não tóxica (Figura 36).

Diariamente, os animais foram examinados quanto ao seu estado de saúde e bem-estar e quanto a eventuais alterações patológicas ao longo do estudo, de forma a reduzir a gravidade e a duração da dor e do sofrimento infligido. Sendo assim, todos os animais que chegam aos limites humanamente aceitáveis (“*human endpoints*”), isto é, que sejam expostos a sofrimento extremo em que não é possível ser aliviado, devem ser sacrificados antes do término do estudo experimental.

Constituíram-se aleatoriamente dois grupos experimentais com quatro animais cada:

- O grupo I correspondeu ao Grupo Controlo (C), que consistiu em animais mantidos sem qualquer manipulação experimental, aos quais não foi administrado o tóxico (DMBA). Foram observados diariamente e pesados semanalmente. O sacrifício e a necrópsia foram efectuados aos 42 dias (d) (n=9) (Figura 37).
- O grupo II correspondeu ao Grupo Teste (T), que consistiu em animais submetidos durante o período experimental à administração por gavagem de 20 mg/kg de DMBA, três



Figura 35: Cartão de identificação das gaiolas.

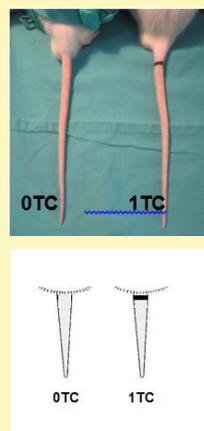


Figura 36: identificação temporária dos ratos nas gaiolas: rato sem traço na base da cauda (0TC) e rato com um traço na base da cauda (1TC) [98]

MATERIAIS E MÉTODOS

vezes por semana (segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira), durante quatro semanas. Foram observados diariamente e pesados três vezes por semana. O sacrifício e a necrópsia foram efectuados aos 42 dias (d) (n=9) (Figura 38).

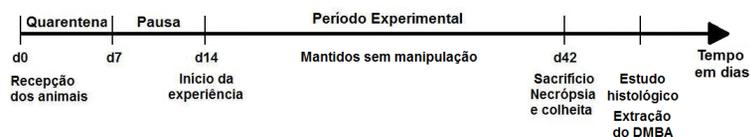


Figura 37: Organograma temporal do protocolo experimental do grupo controlo.

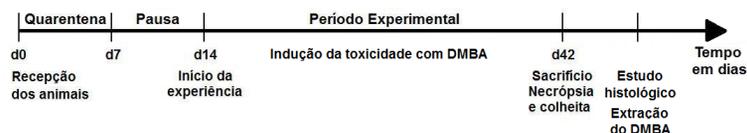


Figura 38: Organograma temporal do protocolo experimental do grupo teste.

O DMBA utilizado na experimentação foi adquirido no estado sólido, na forma de pó e de cor amarelo claro, que é comercializado pela Sigma-Aldrich (Figura 39), uma companhia de alta tecnologia e de ciências da vida, que possui diversos produtos e *kits* químicos e bioquímicos, que são usados na investigação científica, na biotecnologia, no desenvolvimento farmacêutico e no diagnóstico de doenças [57], [99].



Figura 39: O DMBA em pó foi pesado numa balança analítica.

O DMBA é muito pouco hidrofílico e é altamente lipofílico. Por esta razão, a solução de DMBA foi preparada dissolvendo-se o

DMBA em azeite por agitação à temperatura ambiente, com a ajuda de magnetes e uma placa de agitador magnético (Figura 40). Esta solução tem a vantagem de ser rapidamente absorvida e distribuída no organismo.

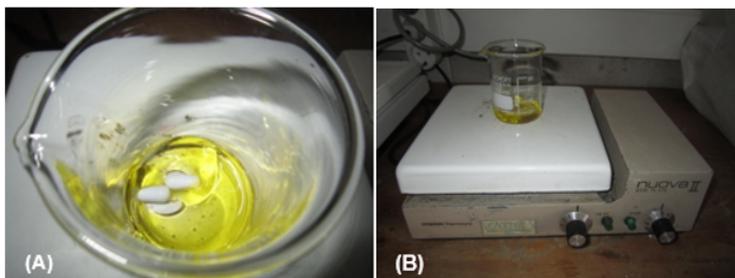


Figura 40: Preparação da solução de DMBA com a ajuda de magnetes (A) e uma placa de agitador magnético (B).

A solução de DMBA em azeite foi administrada por gavagem, na dose de 20 mg de DMBA por quilograma de peso corporal (20 mg/kg). Por esta via, consegue-se administrar a dose exacta do tóxico directamente no estômago e em tempo certo. Há também a garantia que a solução não é expulsa por vômito, porque o esfago do rato entra no estômago pela pequena curvatura através da dobra da prega limitante, que separa a porção não glandular da porção glandular do estômago, impossibilitando o rato de vomitar. A dose individual de cada rato foi calculada em função do peso corporal, o que obrigou à pesagem dos animais do grupo teste (Figura 41) e à preparação adequada da solução durante o regime experimental, três vezes por semana [10].

Para execução desta administração é necessária a contenção apropriada do animal, pois é feita com os animais conscientes, não anestesiados, tendo a vantagem de se aproveitar o reflexo de deglutição e diminuir o risco da administração inadvertida na traqueia. Embora esta técnica possa parecer bastante simples, é necessário destreza e prática para dominá-la.

A contenção do rato é feita com uma mão abordando-o dor-



Figura 41: Pesagem dos animais com o auxílio de uma balança digital e de um recipiente de plástico.

salmente no sentido crâneo-caudal. O indicador e o dedo médio são posicionados em ambos os lados atrás da mandíbula e os dedos polegar, anelar e mínimo são colocados ao redor do tórax. Desliza-se o dedo polegar para a frente dos membros anteriores, que são unidos e cruzados anteriormente, restringindo assim o movimento da cabeça. Para melhorar a contenção, pode-se usar o dedo mínimo para imobilizar um membro posterior juntamente com a cauda.

Para a administração da solução recorre-se a sondas metálicas endogástricas rígidas com ponta arredondada acopladas a uma seringa de 1 ml. A escolha da sonda faz-se pela medição ao longo do corpo do animal, para calcular a medida que terá que ser introduzida para atingir o estômago (Figura 42). Introduz-se a sonda na cavidade oral, através do diastema (espaço entre os incisivos e molares). Utilizando o próprio reflexo de deglutição a sonda é passivamente introduzida com a força necessária cautelosamente ponderada, que permite passar duas eventuais zonas de resistência, a faringe e o cárdia. Nestes pontos um movimento suave no sentido ventrodorsal e vice-versa permite mais facilmente a sua passagem. O conteúdo da seringa é administrado lentamente. O volume máximo que pode ser administrado é de 10 ml/kg ou 1 ml/100 g de peso vivo (p.v.) de rato. Todas as administrações foram registadas numa folha de registo individual para cada um dos animais do Serviço de Patologia Experimental (SPE) [100].



Figura 42: Administração da solução de DMBA por via endogástrica (gavagem).

No final do protocolo experimental, todos os ratos foram eutanasiados e necropsiados. A eutanásia obedeceu ao princípio de “*morte humanamente aceitável*”, isto é, processo rápido sem stresse, sofrimento ou dor, que leva à perda de consciência, paragem respiratória e cardíaca e da função cerebral. A escolha do método obedeceu aos critérios da espécie animal em causa, do tamanho, da idade, do número de animais a serem sacrificados, tendo ainda em conta o protocolo experimental e as condi-

ções técnicas existentes no Serviço de Patologia Experimental. Aproveitou-se o protocolo existente entre o Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (CHUC) e a FMUC, para o fornecimento de fármacos anestésicos.

Para a realização da eutanásia preparou-se uma solução anestésica de 12 ml com ketamina (Ketalar® 500mg/10ml, Pfizer) e Cloropromazina (Largatil® IV 50mg/2ml, Laboratórios Vitória). A dose de administração foi de 0,1 ml por 100 g de p.v. de rato, por via intraperitoneal (IP) (Figura 43). O método utilizado foi a sobredosagem anestésica, seguida de deslocamento cervical. Teve-se sempre a preocupação de confirmar a morte do animal, através da ausência dos movimentos respiratórios, dos batimentos cardíacos e da perda dos reflexos.

A via IP tem a vantagem de apresentar velocidade de absorção elevada, que a torna uma alternativa viável à via intravenosa em animais de pequeno porte. É uma via de fácil utilização e execução.



Figura 43: Anestesia administrada por via intraperitoneal no quadrante abdominal inferior esquerdo.

A necrópsia foi realizada numa sala própria com segurança biológica, sem a presença de outros animais. O operador usou bata, máscara, touca e luvas como material de protecção. Este procedimento foi executado criteriosamente para cada animal com uma planificação, programação e preparação prévias, para que as ta-

refas da necrópsia fossem realizadas sequencialmente, de forma a minimizar a existência de falhas que pudessem comprometer o trabalho de investigação.

Para cada necrópsia, montou-se um conjunto completo composto por material de registo (ficha de registo de números de necrópsia no SPE, ficha de necrópsia, ficha de blocos histológicos), material de acondicionamento e reagentes (cassetes histológicas, tubos de Eppendorf para acondicionamento a -20°C , contentor com formol tamponado a 10% e contentor com soro fisiológico), material de apoio à necrópsia (placa fria, placa para efectuar os cortes, alfinetes, elásticos, balança de precisão, régua (15 cm), fita métrica, craveira digital e compressas) e material para dissecação (tesoura, pinça de dissecação, cabo de bisturi com lâmina descartável e alicate para crânio) (Figura 44).



Figura 44: Mesa de necrópsia, com o rato colocado em decúbito dorsal e fixo na placa fria.

Preencheu-se a tinta vermelha uma ficha de necrópsia por rato, onde consta o código de referência do estudo (ABCD:00), número (n^o) de série do animal no estudo (1 a n), grupo experimental (Controlo ou Teste, n^o), data de sacrifício, referência do número de entrada no SPE/ano, espécie, estirpe, idade, sexo (M – macho ou F

– fêmea), identificação da gaiola, referência do rato na gaiola (0TC ou 1TC), sala onde foram alojados no biotério, administrações ou exames pré-necrópsia (Figura 45), peso após o sacrifício e comprimento focinho-ânus e focinho-ponta da cauda.

Serviço de Patologia Experimental – Toxicologia - DMBA E1

Necrópsia nº _____ Sexos: M F

Código: _____ ANIM: _____ Espécie: _____

Estirpe: ___ Grupo: C _____ T _____

AZUL	ENCARNADO	AMARELO	VERDE	LARANJA	BRANCO
------	-----------	---------	-------	---------	--------

Referência: _____ Peso no sacrifício: _____ g

Sacrifício em jejum fisiológico: sim não Grupo: _____

Início do Jejum ___ h ___ min dia ___ mês ___ hora do sacrifício: ___ h ___ min

Gaiola: _____ Referência na Gaiola: _____ Sala: _____

Administração de BdUr: dose _____ mg d _____ m _____ a _____ h ___ min

Comprimento focinho - ponta da cauda (cm): _____

Comprimento focinho - ânus (cm): _____ Esterg-sangue perif.

Esfergaço - medula óssea: Placas de Peyer - contagem _____

Figura 45: Início da folha de necrópsia.

Após a pesagem do animal sacrificado (Figura 46), procedeu-se à observação do hábito externo, avaliando a condição corporal (caquexia, magreza ou excesso de peso), a condição do pêlo, da pele (alopécia, aumento da densidade do pêlo ou presença de feridas) e unhas, o tecido subcutâneo e mamário por palpação (tumores), as mucosas e orifícios naturais do corpo (feridas, secreções no pavilhão auricular, narinas, ânus e genitais). Nas fêmeas, são examinadas as glândulas mamárias e nos machos os testículos. As alterações visíveis foram registadas e descritas na folha de necrópsia e documentadas fotograficamente, assim como, as eventuais colheitas de fragmentos das zonas alteradas.

Para facilitar os restantes procedimentos da necrópsia, o rato foi colocado em decúbito dorsal sobre uma placa fria, com os quatro membros fixos através de elásticos e alfinetes. Obteve-se a medida do comprimento focinho-ânus e focinho-ponta da cauda, utilizando uma fita métrica (Figura 47).

Uma incisão mediana ventral desde o mento até ao púbis (Figura 48) foi executada para permitir a observação do hábito in-



Figura 46: Pesagem do animal sacrificado.



Figura 47: Determinação do comprimento do focinho-ânus e focinho-ponta da cauda do rato.

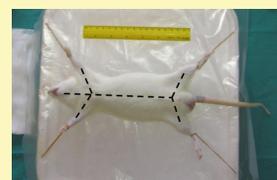


Figura 48: Incisão desde o mento até ao púbis através da linha média ventral e alargamento para os membros.



Figura 49: Exposição do tecido subcutâneo e das musculaturas cervical, torácica e abdominal.



Figura 50: Abertura da cavidade abdominal através de uma incisão mediana abdominal sobre a linha alba, com rebatimento do peritoneu e exposição das vísceras.



Figura 51: Cavidade torácica aberta através de dois cortes para-esternais, com remoção do esterno cranialmente e exposição das vísceras (timo, coração e pulmões).

terno, que expôs inicialmente todo o tecido subcutâneo e as musculaturas cervical, torácica, abdominal e dos membros, através da disseção do tecido conjuntivo (Figura 49). Isto permitiu examinar a aparência do tecido subcutâneo, dos gânglios linfáticos superficiais, do tecido mamário (difuso) e da musculatura.

Efectuou-se a abertura das cavidades abdominal (Figura 50) e torácica (Figura 51), para expor as vísceras. Avaliou-se a sua presença ou ausência, posição, tamanho, coloração, superfície, consistência e estruturas estranhas ou anormais (massas e fluídos).

Procedeu-se depois à remoção dos vários órgãos (timo, coração, pulmões, baço, fígado, rins, gordura peri-renal, gónadas, próstata e cérebro), que foram pesados e, no caso do coração e do baço, efectuou-se também a medição das suas três dimensões (comprimento/largura/espessura). Todas estas informações, assim como, as alterações macroscópicas identificadas foram registadas na folha de necropsia (Figura 52) e documentadas fotograficamente.

Macroscopia. Peso e dimensões dos órgãos:			
Fígado(g):	_____	Baço (g):	_____
Pulmão DTO (g) :	_____	Pulmão ESQ (g) :	_____
Rim DTO (g) :	_____	Rim ESQ (g) :	_____
Gónada DTA (g):	_____	Gónada ESQ (g) :	_____
Parótida DT (g)	_____	Parótida ES (g)	_____
Próstata/V (g):	_____	Próstata/TT (g):	_____
Timo (g):	_____	Útero (g):	_____
Coração (g) :	_____	Coração VH:	_____
P4 peri-renal D (g):	_____	P4 peri-renal E (g):	_____
Coração (mm):	_____ x _____ x _____	Baço (mm):	_____ x _____ x _____

Figura 52: Registo do peso e das dimensões dos órgãos colhidos na folha de necropsias.

De cada um destes órgãos, recolheu-se para estudo histológico de rotina, um pequeno fragmento de 0,5 cm de espessura para cassete histológica, que foi imediatamente fixado em formol tamponado a 10% durante um tempo mínimo de 24 horas à tempe-

ratura ambiente, com o objectivo de preservar a morfologia celular e tecidual, evitando a autólise imediata. Das lesões encontradas recolheram-se também fragmentos idênticos, mas com o cuidado de englobar tecido são. No âmbito do nosso trabalho, seleccionamos apenas as colheitas do fígado (Figura 53, fragmento B). Também foram recolhidos fragmentos de fígado, gordura peri-renal e cérebro para congelação a -20°C , para extração e determinação quantitativa da presença do DMBA e dos seus metabólitos, através da técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Figura 53, fragmentos A e C).

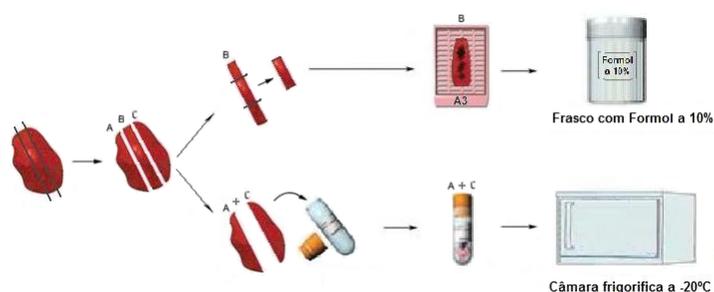


Figura 53: Representação dos cortes efectuados no lobo lateral esquerdo do fígado e dos fragmentos obtidos para o exame histopatológico e para extração e quantificação do DMBA.

Todos os fragmentos recolhidos foram devidamente identificados no material de acondicionamento com a referência do número de entrada no Serviço de Patologia Experimental por ano e o código de referência topográfica usada no Laboratório de Patologia Experimental, constituído por uma letra e um número e eventualmente mais um número. Os órgãos pares (alguns) são identificados com as letras “A” para a porção direita e “B” para a porção esquerda. As exceções são para o fígado e para o baço que são órgãos ímpares, identificados respectivamente com A3 e B3 (Figura 54).

No final da necrópsia, todo o material foi tratado e eliminado como resíduo hospitalar perigoso de risco biológico. As luvas e

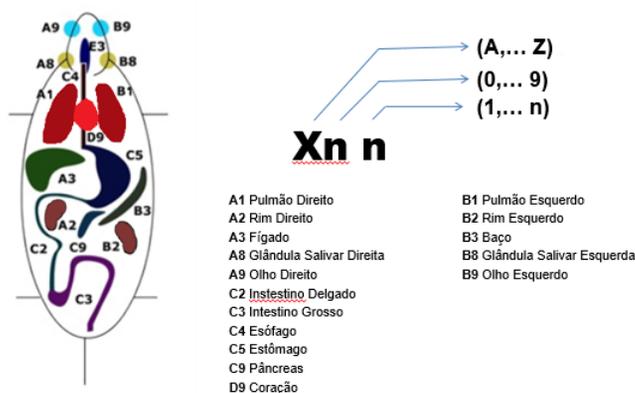


Figura 54: Código de referência topográfica.



(A)



(B)

Figura 55: Contentor verde do grupo III (a) e contentores amarelo e vermelho do grupo IV (b).



Figura 56: Processador automático de tecidos do SPE (Shandon Citadel 1000).

comprimidas contaminadas foram introduzidas no contentor verde (Figura 55.A) pertencente ao grupo III (risco biológico), que poderão ser sujeitos a um método de tratamento físico (autoclavagem) ou químico (desinfecção química) ou ainda a incineração. Depois de pré-tratados estes resíduos podem ser eliminados como resíduos não perigosos.

O material cortante e perfurante (agulhas e lâminas de bisturi) foi acondicionado em contentores imperfuráveis amarelos do grupo IV (risco específico) e as carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos introduzidos em contentores de cor vermelha do grupo IV (risco específico) e mantidas em câmaras frias a -20°C , até à sua recolha (Figura 55.B). Todos os resíduos do grupo IV são de incineração obrigatória.

O tecido hepático fixado em formol tamponado a 10% foi sujeito a um processamento histológico utilizando um programa de 20 horas no processador automático de tecidos (Shandon Citadel 1000) do SPE (Figura 56).

Este processamento consistiu na passagem das cassetes histológicas por banhos sucessivos nas diferentes soluções (formol 1, formol 2, álcool a 70° , álcool a 90° , álcool a 100° 1, álcool a 100°

2, álcool a 100° 3, xilol 1, xilol 2, xilol 3, parafina 1, parafina 2) durante um período de tempo determinado, de forma a executar as etapas de fixação, desidratação, diafanização e impregnação pela parafina fundida (Tabela I).

Tabela I: Protocolo de processamento das amostras para histologia.

Etapa	Passos	Solução	Duração (hora)
Fixação	Passo 1	Formol 1	02:00 h
	Passo 2	Formol 2	02:00 h
Desidratação	Passo 3	Álcool 70 %	01:00 h
	Passo 4	Álcool 90 %	01:00 h
	Passo 5	Álcool 100 % 1	01:00 h
	Passo 6	Álcool 100 % 2	02:00 h
	Passo 7	Álcool 100 % 3	02:00 h
Diafanização	Passo 8	Xilol 1	01:00 h
	Passo 9	Xilol 2	01:30 h
	Passo 10	Xilol 3	01:30 h
Impregnação pela parafina fundida	Passo 11	Parafina 1	02:00 h
	Passo 12	Parafina 2	03:00 h

Na etapa de fixação, as cassetes histológicas foram imersas em formol tamponado a 10%, que funciona como um fixador que impede além da autólise, também a actividade e a proliferação bacteriana, preservando as estruturas o mais semelhante à situação *in vivo*. Visa ainda endurecer os tecidos, tornando-os mais resistentes e favoráveis às etapas subsequentes da técnica histológica, aumentando a afinidade das estruturas celulares para os corantes citológicos.

Segue-se a etapa de desidratação, em que a peça foi submetida a banhos sucessivos em álcoois de graduação crescente

(70%, 90% e 100%), que visa retirar gradualmente a água dos tecidos para que estes não fiquem retraídos, permitindo a impregnação da peça com parafina.

Subsequentemente iniciou-se a etapa da diafanização, pela impregnação da peça em xilol, que permite remover completamente o álcool do interior dos tecidos, preparando-os para a impregnação da parafina. A remoção do álcool é de extrema importância, pois a parafina não se mistura com o álcool. Dessa forma, é fundamental a completa remoção do álcool para que a parafina possa penetrar completamente no interior dos tecidos. Conforme o xilol impregna no tecido, em substituição do álcool, o material torna-se mais claro e transparente. Por essa razão, esta etapa é também denominada clarificação.

Por último, procedeu-se à impregnação pela parafina fundida do tecido completamente cheio de xilol, que permite por um processo de osmose sair todo o xilol e entrar a parafina, conferindo ao fragmento uma certa dureza.

Após este processamento automático, fez-se a inclusão dos fragmentos em blocos de parafina (Figura 57), com a passagem da peça para um molde retangular metálico contendo parafina fundida, tendo sempre a atenção de colocar a superfície do fragmento a ser seccionada pelo micrótomo para baixo. Depois de solidificada a parafina na placa de frio periférica, foi desenformada dando origem ao bloco de parafina com o material incluído (Figura 58), que foi armazenado à temperatura ambiente.

O bloco de parafina com o material incluído foi utilizado na etapa seguinte de microtomia para se obterem cortes histológicos seriados, sendo encaminhado para o congelador para se obter um bloco duro, que permita ao micrótomo (Figura 59) efectuar cortes com a mínima espessura (entre 3 a 4 μm), para poderem serem montados em lâminas, corados e observados ao microscópio.

Os cortes provenientes da microtomia apresentam-se enrugada-



Figura 57: Máquina de inclusão de blocos de parafina.



Figura 58: Moldes com material que foi incluído. Blocos de parafina.

dos, tornando-se necessário proceder á etapa de extensão, através de um banho-maria de água morna (Figura 59). O estendimento dos cortes dá-se à superfície da água, de onde são retirados para uma lâmina de vidro, que é transferida para uma estufa a 60°C (Figura 59), para retirar o excesso de parafina e melhorar a adesão do corte à lâmina, sendo esta identificada a lápis com o número de registo de cada animal, ano e órgão.



Figura 59: Placa fria, micrótopo e banho-maria na bancada de trabalho.

Para permitir a observação dos cortes histológicos ao microscópio, procedeu-se à coloração das lâminas, porque as células e o material extracelular dos cortes provenientes da microtomia são habitualmente transparentes. As técnicas de coloração têm a finalidade de dar contraste aos componentes das células e da matriz extracelular, melhorando a sua visualização ao microscópio de luz.

Para a coloração de tecidos que foram previamente fixados usam-se os chamados corantes não vitais. Os corantes são compostos químicos com determinados radicais ácidos ou básicos que possuem cor, e apresentam afinidade de combinação com estruturas básicas ou ácidas dos tecidos. A técnica de coloração usada foi a coloração de rotina de Hematoxilina e Eosina de Mayer (HE), por apresentar como principais vantagens o facto de ser vitalícia, de permitir a visualização dos constituintes celulares mais relevantes, de apresentar um baixo custo e ser de fácil realização. Esta coloração reúne dois corantes, a hematoxilina e a eosina. A hema-

toxilina comporta-se como um corante básico, que se liga aos radicais ácidos dos tecidos, tais como os ácidos nucleicos presentes nos núcleos, dando um tom azul-púrpura. A estes componentes tecidulares que se combinam com corantes básicos são chamados basófilos. A eosina é um corante ácido que tem afinidade por radicais básicos dos tecidos, como o citoplasma e as fibras de colagénio, corando-o de róseo a vermelho. Os componentes que se combinam com corantes ácidos são chamados acidófilos.

O procedimento geral da técnica de coloração de HE é constituído por:

- A. Desparafinização, que consiste na eliminação da parafina por meio de banhos sucessivos em xilol.
- B. Hidratação, que é gradativa, realizada através de banhos sucessivos em álcoois de concentrações decrescentes (álcool 100%, 95%, 70%), para evitar o rompimento dos tecidos.
- C. Coloração dos cortes, que são corados inicialmente com hematoxilina e em seguida com eosina, por imersão.
- D. Desidratação, através de banhos em álcool de teor crescente (álcool 70%, 95% e 100%), que visa retirar a água, a fim de permitir a perfeita visualização dos tecidos, porque a água possui índice de refração diferente do vidro. Previne ainda a difusão dos corantes.
- E. Diafanização, que é feita com xilol, a fim de tornar os cortes perfeitamente transparentes.
- F. Montagem, que é a etapa final da preparação da lâmina para análise ao microscópio de luz. Consiste na colagem da lamela sobre o tecido, com Bálsamo do Canadá, que é solúvel em xilol e insolúvel em água. A lamela impede que haja hidratação do corte pela humidade do ar ambiente, permitindo

então que as lâminas se mantenham estáveis por tempo indefinido. Após a montagem, levam-se as lâminas à estufa, para secagem do bálsamo do Canadá.

Esta técnica de coloração encontra-se resumida na Tabela II.

Tabela II: Resumo da técnica de coloração de rotina de Hematoxilina e Eosina de Mayer (HE) (min - minuto; N.A. - Não aplicável).

Etapa	Passos	Acção / Solução	Duração (min.)
1. Desparafinização em Xilol	Passo 1	Xilol 1	10 min.
	Passo 2	Xilol 2	10 min.
2. Hidratação em álcoois de gradação decrescente	Passo 3	Álcool 100 %	5 min.
	Passo 4	Álcool 95 %	5 min.
	Passo 5	Álcool 70 %	5 min.
	Passo 6	Lavar em água corrente	1 min.
3. Coloração H&E	Passo 7	Hematoxilina Harris	2 min.
	Passo 8	Lavar em água corrente	1 min.
	Passo 9	Eosina a 1%	1 min.
4. Desidratação em álcoois de gradação crescente	Passo 10	Álcool 70 %	5 min.
	Passo 11	Álcool 95 %	5 min.
	Passo 12	Álcool 100 %	5 min.
5. Diafanização	Passo 13	Xilol 1	5 min.
	Passo 14	Xilol 2	5 min.
6. Montagem do corte histológico	Passo 15	Colagem da lâmina e da lamela sobre o tecido, com Balsamo do Canadá	N.A.

Por fim, todas as lâminas foram rotuladas com o número de referência no SPE, a coloração histológica (HE), o código de referência topográfica, o código de referência do estudo e o grupo a que pertencem na experiência através da marcação com cores diferentes (Figura 60).

Apresenta-se na Figura 61, a síntese dos diversos atos por ordem sequencial do material e método utilizado na preparação das lâminas histológicas.



Figura 60: Lâminas rotuladas.

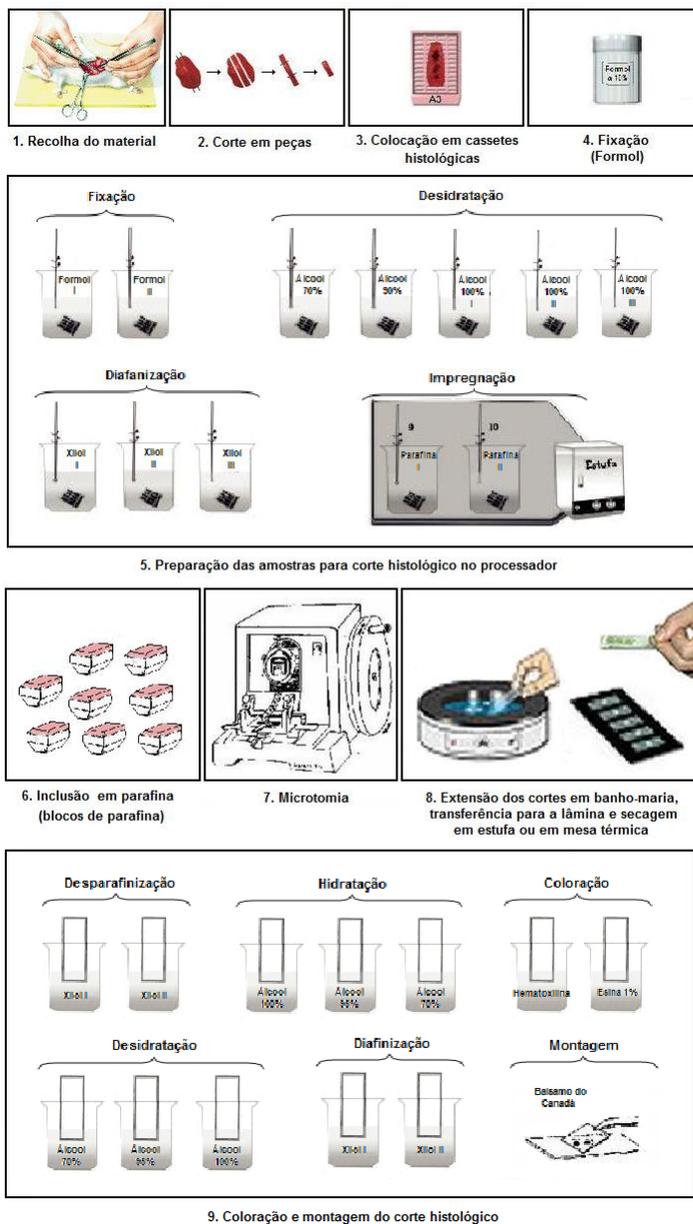


Figura 61: Diversos atos utilizados na preparação das lâminas histológicas (adaptado [101], [102] e [103]).

O estudo das lâminas histológicas do tecido hepático foi realizado com o auxílio de um microscópio de luz Nikon coolscope (Figura 62) com ampliações de 5x ($200\mu\text{m}$), 10x ($100\mu\text{m}$), 20x ($50\mu\text{m}$) e 40x ($25\mu\text{m}$). A observação dos tecidos foi documentada em texto e imagem, selecionando-se as imagens mais elucidativas.

No seguimento deste trabalho, procedeu-se á extração do DMBA e dos seus respectivos metabólitos em dois tecidos, fígado e gordura peri-renal. É uma extração líquido-líquido, que envolve a partição do analito entre duas fases líquidas imiscíveis, sendo os solventes utilizados, o clorofórmio (CHCl_3) e o metanol (CH_3OH), na relação de duas partes para uma. Nas extracções para compostos hidrofílicos usa-se PBS (solução tampão de fosfato) como solvente, enquanto para composto lipofílicos usa-se uma solução de clorofórmio/metanol (2:1). Devido ao carácter lipofílico DMBA, usou-se como solvente a solução de clorofórmio/metanol (2:1) [55].

Este procedimento começa pela preparação do solvente, agitando bem num frasco de vidro de boca estreita, 50 ml de clorofórmio e 25 ml de metanol, (Figura 63). Para cada amostra, é retirada uma quantidade de 2 ml (volume inicial), que é colocada num tubo de ensaio de vidro e tapado com parafilme até à sua utilização.

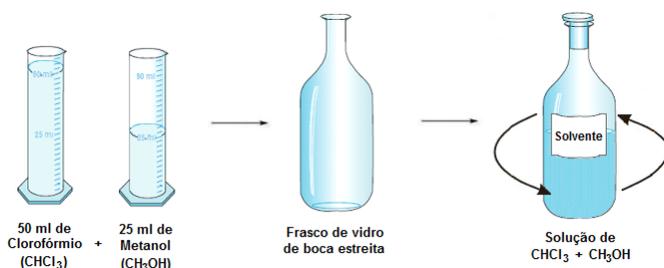


Figura 63: Preparação do solvente, clorofórmio e metanol (2:1).

Para cada amostra, efectuou-se a pesagem do fragmento congelado a -20°C e colocou-se no tubo do homogeneizador manual tipo Cruscher (Figura 64), onde por meio de vácuo, provocado pe-



Figura 62: Microscópio de luz Nikon coolpix 990.

los movimentos descendentes e rotativos do êmbolo, se desfez progressivamente (Figura 65). Em seguida, adicionou-se 1/3 do solvente e homogeneizou-se novamente. Verteu-se o homogeneizado num tubo novo com o número correspondente (Figura 66). Repetiu-se este passo até utilizar o volume total de solvente (três vezes).



Figura 64: Homogeneizador manual tipo Cruscher, constituído por um tubo e um êmbolo de vidro.

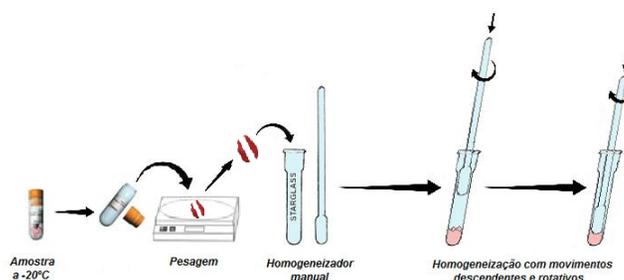


Figura 65: Procedimento de pesagem e homogeneização do fragmento da amostra.



Figura 67: Centrífuga de bancada (Hettich Universal II).

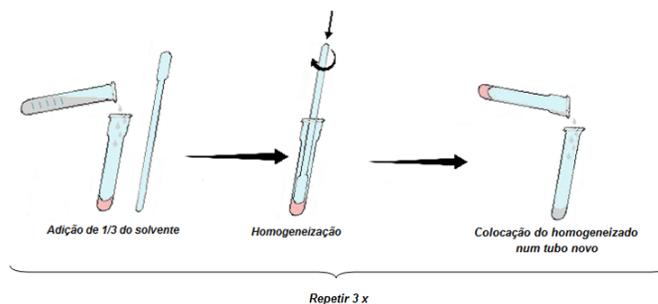


Figura 66: Homogeneização com solvente.

Os tubos com o homogeneizado de cada amostra foram a centrifugar na rotação máxima, durante 10 minutos (Figura 67). No final, com uma micropipeta de 2 μ l retirou-se o sobrenadante e a

fase inferior para dois tubos de eppendorfs de 2 ml. Mediu-se o volume final em cada eppendorf. Estes tubos foram novamente centrifugados a 12000 rpm, durante 15 minutos (Figura 68). Por fim, retirou-se 0,2 ml de cada tubo, e adicionou-se 0,2 ml de acetonitrilo (estes volumes podem ser alterados consoante a quantidade existente de fase inferior). Uma vez ocorrida a centrifugação, retiram-se os tubos de eppendorf para um suporte apropriado e colocam-se no frigorífico até ser realizada o HPLC. Este procedimento foi baseado em métodos internos do laboratório.

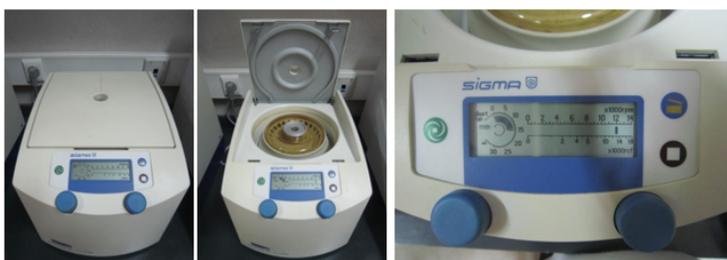


Figura 68: Microcentrifuga de bancada (Sigma 1-15).

As soluções preparadas foram analisadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Esta análise foi realizada nas seguintes condições: injetor automático (Shimadzu, Sil-20AHT/20 ACHT), uma coluna de fase reversa Zorbar ODS (4.6 mm ID x 250mm, 5 μ m), com um detector UV-VIS (Shimadzu, SPD-20A/SPD-20AV) e um detector de fotodiodos UV-VIS (Shimadzu, SPD-M20A). Utilizou-se um gradiente 50:50 acetonitrilo:água até 100% de acetonitrilo em 30 minutos, com um fluxo de 1 ml/min. A temperatura da coluna foi mantida a 40°C em todas as leituras experimentais [55].

Resultados

No grupo controlo e no grupo teste, todos os animais sobreviveram até ao término da experiência, tendo sido efectuada a eutanásia e a necrópsia à totalidade dos animais que iniciaram o protocolo experimental (n=18). Os ratos de ambos os grupos foram observados diariamente quanto ao seu estado de saúde, bem-estar e eventuais alterações patológicas, não se registando alterações significativas. Foram também registadas as pesagens, efectuadas semanalmente no grupo controlo e três vezes por semana no grupo teste, durante o protocolo experimental e no sacrifício.

Verificou-se um ganho de peso corporal significativo ($104,06 \pm 17,46g$) em todos os ratos do grupo controlo (C01). No entanto, houve uma diminuição do peso corporal ao sacrifício (Figura 69).

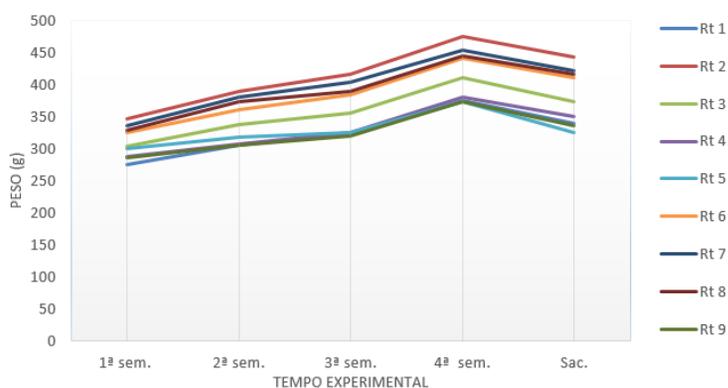


Figura 69: Variação do peso corporal dos ratos do grupo controlo ao longo do tempo experimental.

No grupo teste (T01), existiu uma variação dos pesos dos ratos, não seguindo todos a mesma linha de tendência (Figura 70). A maioria dos ratos apresentaram oscilações de ganho e de perda de peso corporal, traduzindo-se num ganho de peso pouco significativo. A exceção foi o rato 13, que ao longo do protocolo experimental até à 10^a administração, que corresponde à 1^a administração da 4^a semana, evidenciou um ganho de peso progressivo, sendo mais significativo entre a 9^a e a 10^a administração, seguindo-se uma perda de peso acentuada até ao sacrifício. Os ratos 10, 11 e 12 apesar de não terem tido um ganho de peso significativo até à 10^a administração, evidenciaram também um ganho de peso muito significativo entre a 9^a e a 10^a administração, tornando a perder peso acentuado até ao sacrifício. Os ratos 12 e 15 foram os únicos que ao sacrifício apresentavam pesos corporais inferiores aos da primeira pesagem.

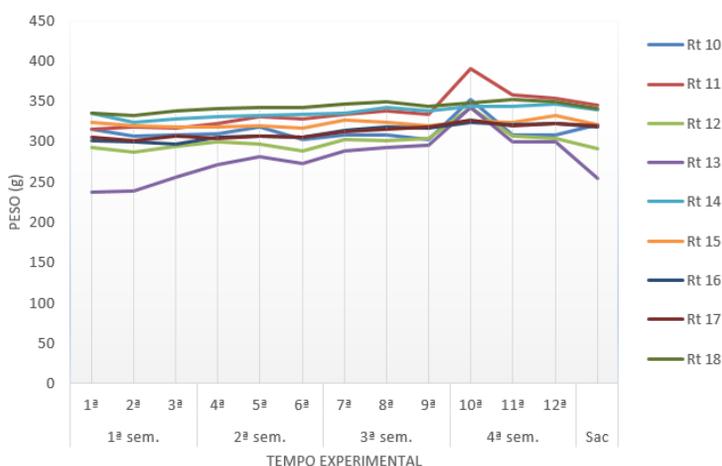


Figura 70: Variação do peso corporal dos ratos do grupo teste ao longo do tempo experimental

Uma vez que houve uma diminuição do peso ao sacrifício no grupo controlo, não se podem comparar os valores da 1^a pesagem com os valores ao sacrifício e optou-se por fazer a diferença entre a primeira pesagem e o peso registado na última administração,

RESULTADOS

para determinar o ganho ou a perda de peso vivo (Figura 71). Em ambos os grupos, verificou-se um ganho de peso vivo, que foi mais expressivo no grupo controlo, com um ganho médio de $104,06 \pm 17,46$ g. No grupo teste, esse ganho foi de apenas $19,84 \pm 19,94$ g, que pode estar relacionado com os efeitos tóxicos do DMBA.

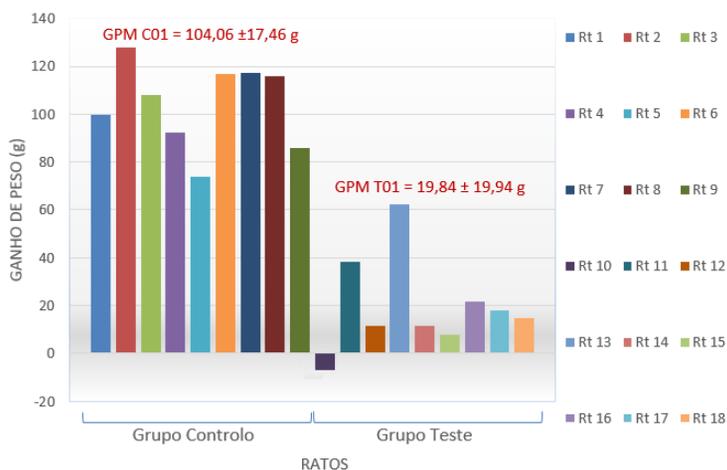


Figura 71: Ganho de peso médio dos ratos do grupo controlo e do grupo teste.

Foram efetuadas um total de 18 necrópsias, correspondendo 9 ao grupo controlo e 9 ao grupo teste. Na observação do hábito externo, não se encontraram alterações nos dois grupos. Realizou-se a medição do comprimento do animal pela determinação do comprimento do focinho-ânus (CFA) e focinho-ponta da cauda (CFPC) do rato. A média do CFA e do CFPC do grupo controlo foi de $23,73 \pm 0,99$ e de $43,00 \pm 1,73$ cm, respetivamente e no grupo teste, foi de $22,89 \pm 1,17$ e $42,10 \pm 1,05$ cm. Estes valores estão representados na Figura 72. Verificou-se que os ratos apresentavam valores muito semelhantes quanto a este parâmetro, nos dois grupos.

Com o cálculo do Índice de Lee, obteve-se um índice de massa corporal, que relaciona o peso do rato com o comprimento do focinho-ânus, através da razão da raiz cúbica do peso (em gra-

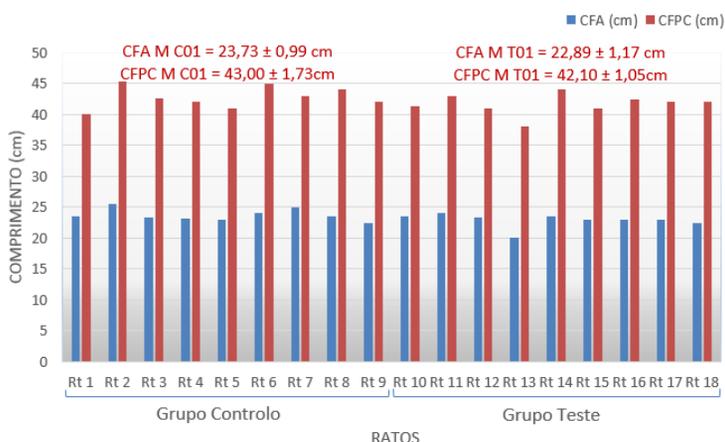


Figura 72: Comprimento dos ratos à necrópsia do grupo controlo e do grupo teste.

mas) sobre o comprimento (em centímetros) (Figura 73). Este índice foi calculado para cada rato, sendo o valor médio de referência de 0,3, dos nove ratos do grupo controlo encontraram-se quatro acima desse valor. Um apresentou valor inferior ao de referência. Nos quatro restantes o índice foi coincidente com o valor de referência. Ao analisar o grupo teste, verificou-se um índice muito inferior que oscilou entre 0,16 e 0,18, o que representa uma magreza em relação ao grupo anterior.

Na análise macroscópica dos tecidos e órgãos, só se observaram alterações nos pulmões dos ratos 8 e 9. Identificaram-se diversas vesículas de ar, com paredes finas e transparentes dispersas por todos os pulmões. Estas alterações macroscópicas, por pertencerem a ratos do grupo controlo não foram registadas por imagem, pois obviamente não estão relacionadas com os efeitos do DMBA. Estes ratos *in vivo* não apresentaram qualquer sintomatologia de patologia respiratória.

Todos os órgãos e tecidos colhidos foram pesados, nomeadamente pulmões (A1 e B1), rins (A2 e B2), fígado (A3), baço (B3), gónadas (A7 e B7), coração (D9) e gordura peri-renal (P4WD e P4WE). O peso médio para cada órgão com os valores extremos

$$\text{Índice de Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{peso do rato}}}{\text{comprimento focínho} - \text{ânus}}$$

Figura 73: Fórmula do Índice de Lee.

RESULTADOS

e sem os valores extremos significativos para o grupo de controlo e o grupo teste estão apresentados na Tabela III. Verificou-se que o peso médio dos órgãos do grupo teste foi ligeiramente inferior ao do grupo controlo.

Tabela III: Valores médios da pesagem (g) dos órgãos recolhidos na necrópsia dos ratos.

	Grupo Controlo		Grupo Teste		
	Média*	Média**	Média*	Média**	
A1	1,23 ± 0,19	1,19 ± 0,16	A1	1,13 ± 0,24	1,06 ± 0,13
B1	0,63 ± 0,14	0,63 ± 0,14	B1	0,50 ± 0,06	0,50 ± 0,06
A2	1,29 ± 0,20	1,29 ± 0,20	A2	1,13 ± 0,08	1,13 ± 0,08
B2	1,24 ± 0,32	1,34 ± 0,13	B2	1,10 ± 0,09	1,10 ± 0,09
A3	13,34 ± 2,06	13,34 ± 2,06	A3	11,69 ± 1,90	11,69 ± 1,90
B3	0,74 ± 0,14	0,74 ± 0,14	B3	0,46 ± 0,08	0,46 ± 0,08
A7	2,21 ± 0,68	2,21 ± 0,68	A7	2,00 ± 0,89	2,00 ± 0,89
B7	2,18 ± 0,64	2,18 ± 0,64	B7	2,01 ± 0,95	2,01 ± 0,95
D9	1,19 ± 0,16	1,19 ± 0,16	D9	1,05 ± 0,13	1,05 ± 0,13
P4WD	1,98 ± 1,13	1,98 ± 1,13	P4WD	1,14 ± 0,132	1,14 ± 0,32
P4WE	2,03 ± 1,00	2,03 ± 1,00	P4WE	1,29 ± 0,36	1,29 ± 0,36

* Média com os valores extremos; ** Média sem os valores extremos significativos.

A presença de possíveis valores extremos das pesagens dos órgãos, foi analisada pelo Teste de Grubbs, utilizando o Software GraphPad (2004). Quando não existem valores extremos no conjunto de dados, a hipótese é nula (H_0) e quando existe pelo menos um valor extremo, a hipótese é alternativa (H_a). Os valores extremos podem ser considerados como manifestações da variabilidade aleatória inerente aos dados, a alterações patológicas ou apenas a um erro no registo dos dados da amostragem. Este teste baseia-se no cálculo numérico amostral (estatística), que é comparado com um valor crítico baseado na teoria de amostras aleatórias, para decidirmos se existe ou não uma observação considerada valor extremo. Para cada órgão o valor de Z crítico tabelado (referente a um nível de significância de 0,05, para $n=9$) foi igual a 2,2150. Pela interpretação dos resultados do teste observou-se que no grupo controlo, o rato 8 apresentava um valor extremo elevado do pulmão esquerdo. Este é um dos dois ratos (rato 8 e rato 9) em que

foram identificadas alterações macroscópicas nos pulmões. Ainda neste grupo, o rato 5 apresentava um valor extremo baixo do rim esquerdo. Relativamente aos outros órgãos aceitou-se a hipótese nula. No grupo teste, no pulmão direito foi detetado um valor extremo elevado no rato 14 e nos outros órgãos aceitou-se também a hipótese nula.

No caso do coração e do baço, efectuou-se também a medição em três dimensões, comprimento (a), largura (b) e espessura (c), para calcular o seu volume através, das fórmulas do volume de um cone (Figura 74) e do volume de uma elipsoide (Figura 75), respetivamente. Verificou-se que o volume médio dos órgãos do grupo teste (Coração: $1561,90 \pm 708,30$ e Baço: $4162,08 \pm 1129,71$) foi ligeiramente inferior ao do grupo controlo (Coração: $1877,26 \pm 230,74$ e Baço: $5741,97 \pm 1508,78$).

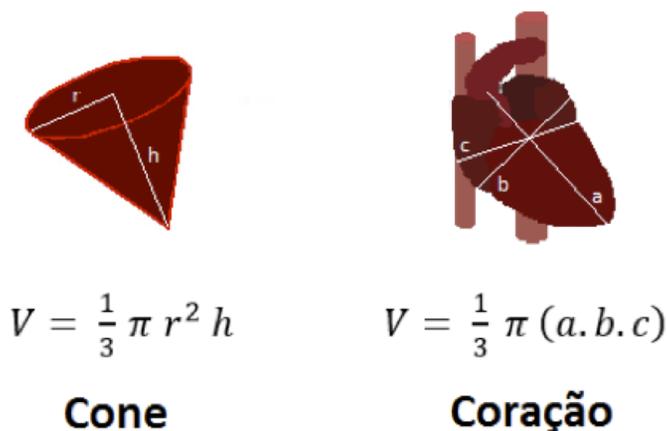


Figura 74: O coração apresenta uma forma semelhante a um cone invertido, com as respetivas fórmulas do volume. V: volume; π : pi (3,14); r: raio; h: altura; a: comprimento; b: largura; c: espessura

O Índice do Peso do Fígado foi obtido dividindo o peso do respectivo órgão pelo peso do corpo, no mesmo momento (ao sacrifício). Verificou-se que não houve diferenças significativas dos índices nos dois grupos, embora o grupo teste apresente um média



$$V = \frac{4}{3} \pi (a \cdot b \cdot c)$$

Elipsóide

Baço

Figura 75: O baço apresenta uma forma elipsóide, com a respetiva fórmula do volume. V: volume; π : pi (3,14); a: comprimento; b: largura; c: espessura.

ligeiramente superior ($0,037 \pm 0,004$) à do grupo controlo ($0,035 \pm 0,004$).

O estudo histológico efetuado ao tecido hepático dos animais pertencentes ao grupo controlo não apresentou alterações com significado patológico, estando de acordo com o esperado, na medida em que neste grupo de ratos não se administrou o tóxico e foram mantidos durante o protocolo experimental sem manipulação (Figuras 76, 77 e 78).

O tecido hepático dos ratos pertencentes ao grupo teste apresentam alterações histopatológicas ligeiras, caracterizadas por aumento do espaço entre as trabéculas nas zonas periportal e centrolobular, hepatócitos com núcleos muito basófilos, degenerescência dos hepatócitos da zona centrolobular e tumefação turva dos hepatócitos (Figuras 79, 80 e 81 e 82). Estas alterações são sinais de hepatotoxicidade.

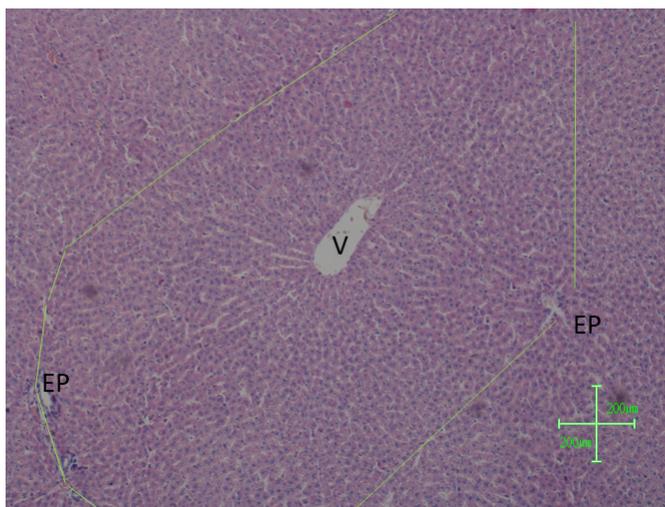


Figura 76: Corte histológico do fígado de um rato do grupo controle com um lobulo hepático clássico delimitado. Estrutura poliédrica com a veia central (V) da qual irradiam os hepatócitos e com os espaços porta (EP) à periferia (HE, ampliação 5x do original).

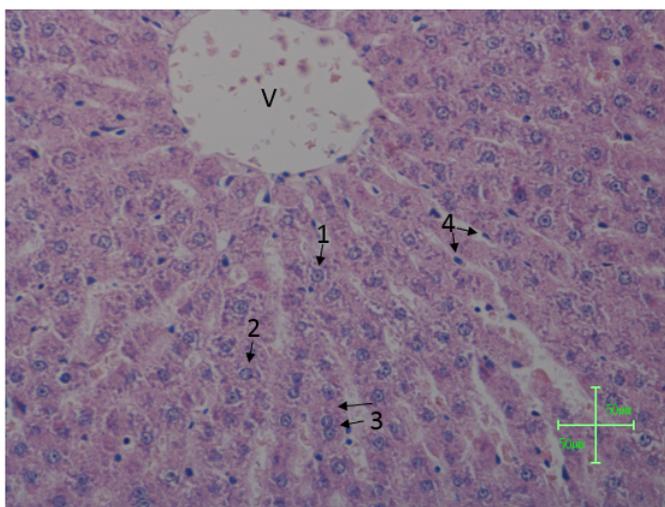


Figura 77: Corte histológico do fígado de um rato do grupo control com os hepatócitos centrolobulares bastante uniformes e organizados em trabéculas. Predominância de hepatócitos com um único núcleo redondo, com um (1) ou dois (2) nucléolos proeminentes e alguns hepatócitos binucleados (3). Células de Kupffer visíveis (4) (HE, ampliação 20x do original).

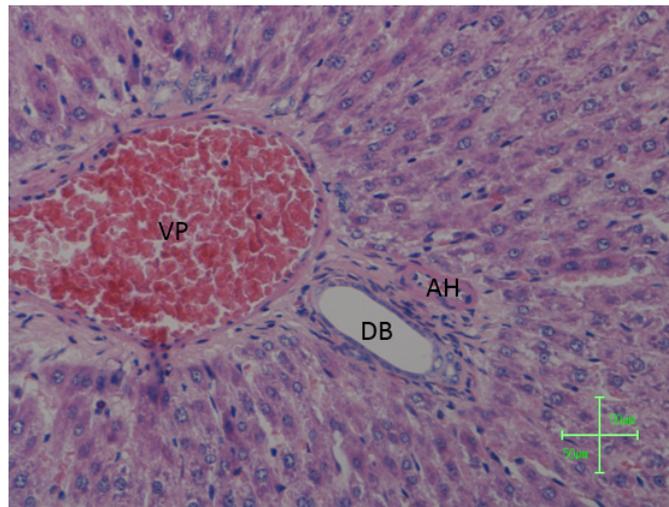


Figura 78: Corte histológico do espaço porta ou tríade portal de um rato do grupo control. Ramo da artéria hepática (AH), ramo da veia porta (VP) e ducto biliar (DB) (HE, ampliação 20x do original).

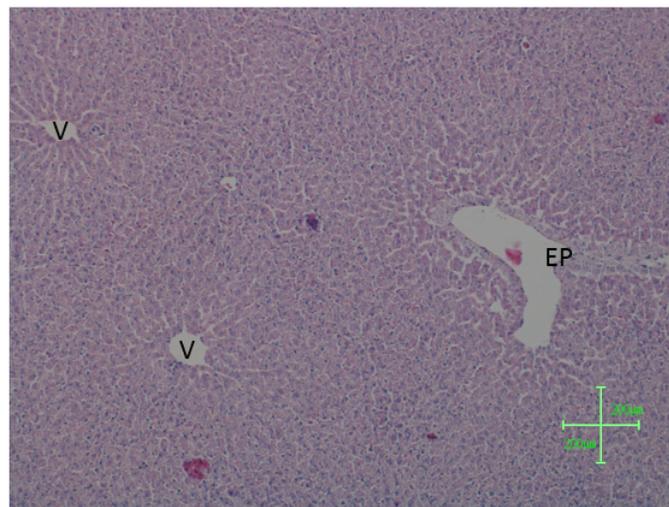


Figura 79: Corte histológico do fígado de um rato do grupo teste, com aumento do espaço entre as trabéculas e respetiva desorganização dos hepatócitos na região periportal e centrolobular, compatível com edema (HE, ampliação 5x do original).

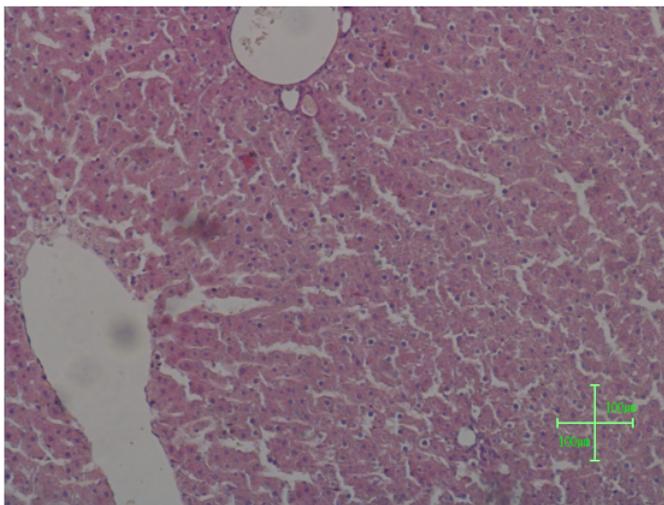


Figura 80: Corte histológico do fígado de um rato do grupo teste, com aumento do espaço entre as trabéculas e hepatócitos com núcleos muito basófilos (HE, ampliação 10x do original).

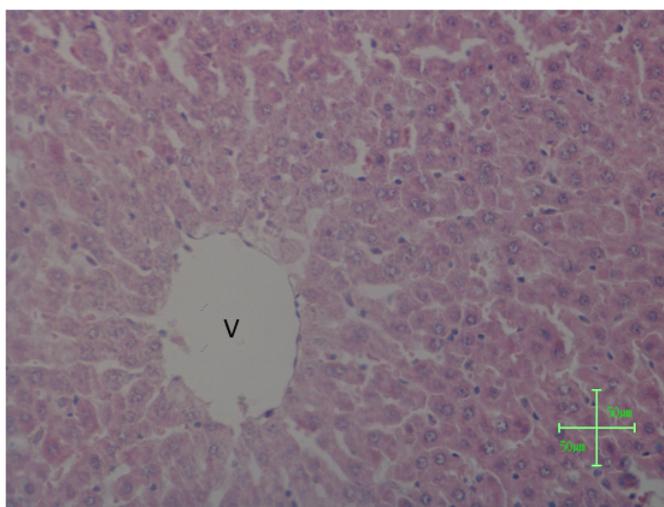


Figura 81: Corte histológico do fígado de um rato do grupo teste, com degenerescência da zona centrilobular. Hepatócitos com aspeto pálido e sem contornos definidos (HE, ampliação 20x do original).

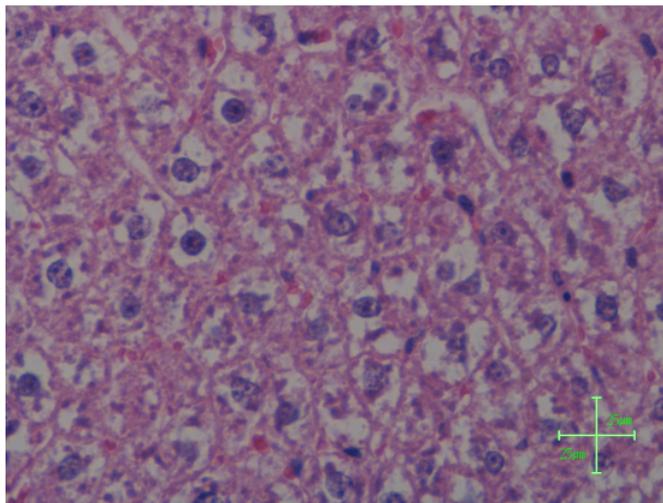


Figura 82: Corte histológico do fígado de um rato do grupo teste, com tumefação turva dos hepatócitos. Citoplasma diluído e aspeto rendinhado, devido à formação de vacúolos de contorno imprecisos. Núcleo permanecendo em posição central (HE, ampliação 40x do original).

Para a análise quantitativa do DMBA no tecido hepático e no tecido adiposo, foi necessário realizar primeiro a extração líquido-líquido para extrair o DMBA das amostras biológicas, como descrito no material e métodos. As soluções resultantes das extrações foram posteriormente submetidas a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), que é uma técnica cromatográfica utilizada de forma ampla para separar, identificar e determinar componentes químicos em misturas complexas. A análise do registro gráfico (cromatograma) permite visualizar a separação dos componentes da mistura, os tempos de retenção, as áreas dos picos e determinar a concentração de cada substância na mistura.

Experimentalmente, confirmou-se com uma solução padrão controlo que era possível quantificar o DMBA. O cromatograma da Figura 83 representa a análise da solução padrão controlo, onde é detetado o pico do tempo de retenção referente ao DMBA ($tr \approx 29$ min).

Na análise dos cromatogramas das extrações dos fígados de

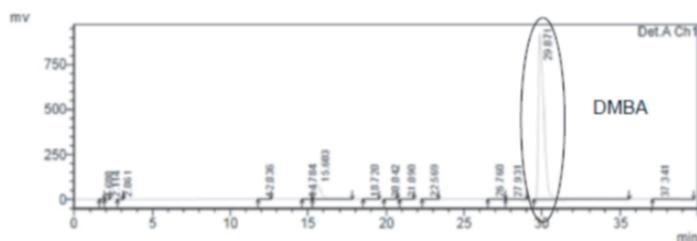


Figura 83: Cromatograma da solução padrão controle. Presença do pico do tempo de retenção referente ao DMBA (tr ≈ 29 min).

ratos do grupo controle (Figura 84), o pico do tempo de retenção referente ao DMBA (tr ≈ 29 min) não foi detetado. Em termos quantitativos, a concentração do DMBA determinada pelo HPLC nos fígados do grupo controle foi de 0 mg de DMBA por 1 g de fígado.

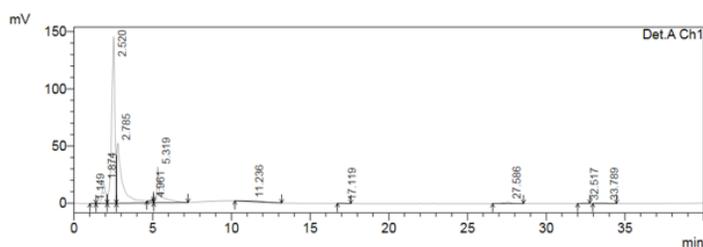


Figura 84: Cromatograma de uma amostra de fígado de um rato do grupo controle em que não foi quantificado o DMBA. Ausência do pico do tempo de retenção referente ao DMBA (tr ≈ 29 min).

Nos cromatogramas das extrações dos fígados de ratos do grupo teste (Figura 85), o pico do tempo de retenção referente ao DMBA (tr ≈ 29 min) foi detetado apenas no rato 17, em que a concentração do DMBA determinada pelo HPLC nesse fígado foi de $4,54 \times 10^{-4}$ mg de DMBA por 1 g de fígado.

Foi ainda possível quantificar o DMBA no tecido adiposo de quatro ratos do grupo controle e de cinco ratos do grupo teste. Nos cromatogramas das extrações do tecido hepático destes ratos, o pico do tempo de retenção referente ao DMBA (tr ≈ 29 min), não apareceu nos ratos do grupo controle (Figura 86), sendo detetado

RESULTADOS

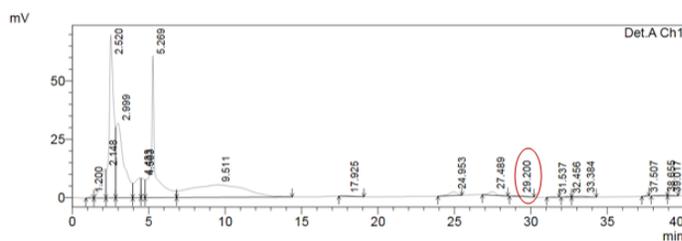


Figura 85: Cromatograma da amostra do fígado do rato 17 do grupo teste onde foi quantificado o DMBA. Presença do pico do tempo de retenção referente ao DMBA (tr ≈ 2 min).

em todos os ratos do grupo teste (Figura 87). As concentrações do DMBA determinadas pelo HPLC no tecido adiposo desses ratos está registada na e estão compreendidas entre $2,75 \times 10^{-3}$ mg e $6,04 \times 10^{-3}$ mg de DMBA por 1 g de tecido adiposo.

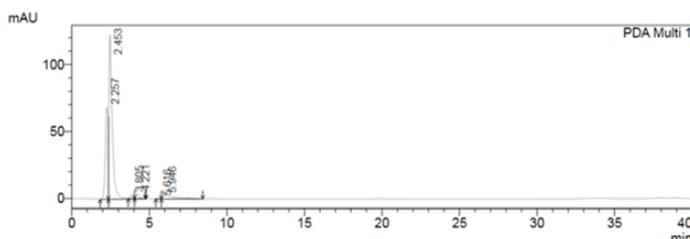


Figura 86: Cromatograma de uma amostra de tecido adiposo de um rato do grupo controlo. Ausência do pico do tempo de retenção referente ao DMBA (tr ≈ 29 min).

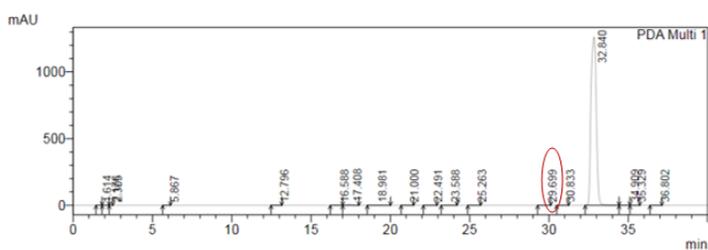


Figura 87: Cromatograma de uma amostra do tecido adiposo de um rato do grupo teste. Presença do pico do tempo de retenção referente ao DMBA (tr ≈ 29 min).

Os resultados obtidos nos tecidos, hepático e adiposo, dos ratos do grupo controlo, estão de acordo com o protocolo experimental, pois a estes ratos não foi administrado o DMBA por gavagem.

Quanto à quantificação do DMBA nos tecidos, hepático e adiposo, nos ratos do grupo teste, observou-se uma diferença significativa dos resultados obtidos. No tecido hepático do grupo teste, apenas se quantificou o DMBA num rato (rt 17), numa pequena concentração ($4,54 \times 10^{-4}$ mg de DMBA por 1 g de fígado). No tecido adiposo do grupo teste, quantificou-se o DMBA em todos os ratos, numa grande concentração ($2,75 \times 10^{-3}$ mg e $6,04 \times 10^{-3}$ mg de DMBA por 1 g de tecido adiposo). Esta diferença pode estar relacionada com a função do fígado em biotransformar os xenobióticos e com o carácter lipofílico do DMBA.

Ao comparar os valores das concentrações obtidas com a dose de DMBA administrado (20 mg / Kg), observa-se que a concentração obtida corresponde a uma percentagem inferior a 1% da dose administrada.

Discussão e Conclusão

O estudo da administração de DMBA por via oral de 20 mg/kg/dia, três vezes por semana, durante quatro semanas, no modelo experimental com ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da estirpe Wistar, machos, de 8 semanas de idade, mostrou ter um ligeiro efeito toxicológico hepático agudo. Todos os ratos sobreviveram até ao término da experiência, o que leva a concluir que a dose administrada não é letal para este modelo animal. Na literatura, encontram-se descritos trabalhos que usaram uma dose única intraperitoneal de 40 mg/kg de peso corporal de DMBA, que provocaram um efeito toxicológico hepático mais pronunciado e com fenómenos de lesão crónica hepática [67].

Estes resultados são corroborados pelas pesagens ao longo do protocolo experimental e ao sacrifício. Verificou-se um ganho de peso corporal em ambos os grupos, que foi muito mais expressivo no grupo controlo, em relação a um ganho muito pouco significativo no grupo teste. Ao analisar a condição corporal dos ratos de ambos os grupos, conclui-se que os ratos do grupo teste apresentavam uma magreza em relação ao grupo controlo. Também na pesagem dos órgãos, o peso médio no grupo teste foi ligeiramente inferior ao do grupo controlo, tendo-se verificado o mesmo no volume do coração e do baço. Contudo, a média do Índice do Peso do Fígado apesar de não apresentar diferenças significativas nos dois grupos, foi ligeiramente superior no grupo teste. Este aumento

pode ser consequência de uma compensação por um processo regenerativo hepático após o efeito tóxico agudo do DMBA. Nos ratos em que se administrou DMBA observaram-se ligeiras a moderadas alterações histopatológicas de hepatotoxicidade. A análise cromatográfica quantificou a presença de DMBA no tecido adiposo, apesar da percentagem detetada ter sido inferior a 1% da dose administrada, o que pode estar relacionado com o caráter lipofílico do DMBA, que o torna rapidamente absorvido e distribuído no organismo. No tecido hepático, o DMBA só foi quantificado apenas num único rato do grupo teste, o que pode estar relacionado com a função do fígado em biotransformar os xenobióticos nos seus metabólitos. Desta forma, o DMBA que em princípio poderia ser quantificado no tecido hepático, ao ser biotransformado nos seus metabólitos é eliminado deste tecido. Assim, para se realizar um completo estudo da presença deste tóxico nos tecidos, hepático e adiposo, devia-se identificar e quantificar também os seus metabólitos. A inexistência de curvas de calibrações referentes a cada metabólito torna impossível quantificá-los e dificulta a sua possível qualificação, pelo que um estudo complementar de HPLC está em curso no laboratório. A eventual análise do material orgânico excretado (fezes e urina) poderá ser também um complemento do estudo da presença do DMBA e seus metabólitos [55].

Em suma, podemos dizer que a dose de DMBA administrada provoca alterações nos diferentes parâmetros avaliados, que embora não sejam muito significativas, comprovam os estudos que apontam para a hepatotoxicidade do DMBA.

Na continuação deste estudo interessa agora aprofundar a acumulação deste xenobiótico em diversos órgãos do corpo e relacionar esta acumulação com algumas funções orgânicas e o estado geral do organismo.

Parece-nos importante perceber se a alimentação pode ter alguma intervenção no acumular deste tóxico e como algumas afec-

ções podem aumentar ou reduzir a sua acumulação. Interessa perceber se alguns alimentos que apresentam componentes que podem estimular ou inibir a função de desintoxicação hepática podem intervir, o mesmo com alguns fármacos. Também a avaliação funcional de alguns órgão como por exemplo o fígado, pode trazer dados importantes para a acumulação deste tóxico.

Um aspeto que necessita de uma maior pesquisa é o da remoção do DMBA no tecido adiposo. Hoje existem teorias que têm como ponto de partida para explicar as doenças o acumular de tóxicos do organismo. No entanto existe uma forte pressão para a desintoxicação pela toma de produtos que são anunciados como capazes de retirar os tóxicos dos tecidos e para isso é muito importante estudar as condições de retirar tóxicos dos tecidos e avaliar as possíveis consequências deste ato.

Propomos para a continuação do estudo a utilização de animais repartidos por grupos segundo o sexo e a idade, ainda com condições alimentares diferenciadas e submetidos à administração crónica de alguns fármacos.

Numa fase seguinte propomos testar produtos indicados para remover os tóxicos do organismo e acompanhar a toma destes produtos com doseamento no sangue, na urina, nas fezes e no tecido adiposo.

A Aorta

Acetil-CoA Acetil-Coenzima A

ADN Ácido Desoxirribonucleico

AE Artéria Esplénica

AGE Artéria Gástrica Esquerda

AHC Artéria Hepática Comum

AHE Artéria Hepática Esquerda

AHP Artéria Hepática Própria

ATP Trifosfato de Adenosina ou Adenosina Trifosfato (Adenosine Triphosphate)

CHUC Centro Hospitalar Universitário de Coimbra

cm Centímetro(s)

d Dia(s)

D Duodeno

DBC Ducto Biliar Comum

DMBA Dimetilbenzantraceno (Dimethylbenzanthracene)

DHE Ducto Hepato-Entérico

DP Ducto Pancreático

EC Eixo Celíaco

E Esófago

Es Estômago

F Fêmea

HGF Fator de Crescimento dos Hepatócitos (Hepatocyte Growth Factor)

FMUC Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

g Grama(s)

h Hora(s)

HDL Lipoproteínas de Alta Densidade (High Density Lipoprotein)

HAP Hidrocarboneto Aromático Policíclico (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon – PAH)

HE Hematoxilina e Eosina

HPLC Cromatografia Líquida de Alta Pressão (High Pressure Liquid Chromatography)

IGF-1 Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (Insulin-like growth factor 1)

IP Via Intraperitoneal

IV Via Intravenosa

kg Kilograma(s)

LC Lobo Caudado

LCCa Lobo Caudado Caudal

LCCr Lobo Caudado Cranial

LD50 Dose Letal para 50% dos animais

LDL Lipoproteínas de Baixa Densidade (Low Density Lipoprotein)

LEA II Laboratório de Experimentação Animal II

LF Ligamento Falciforme

LLD Lobo Lateral Direito

LLDCa Lobo Lateral Direito Caudal

LLDCr Lobo Lateral Direito Cranial

LLE Lobo Lateral Esquerdo

LM Lobo Médio

LMD Lobo Médio Direito

LME Lobo Médio Esquerdo

LT Ligamentos Triangulares

LTD Ligamento Triangular Direito

LTE Ligamento Triangular Esquerdo

m Mês

M Macho

mg Miligrama(s)

ml Mililitro(s)

min Minuto(s)

mm Milímetro(s)

N.A. Não aplicável

P Pâncreas

P-450 Proteína 450

PC Processo Caudado

pH Potencial de Hidrogénio

p.v. Peso Vivo

R Rim Direito

REL Retículo Endoplasmático Liso

RER Retículo Endoplasmático Rugoso

ROS Espécies Reativas de Oxigénio (Reactive Oxygen Species)

rpm Rotações por minuto

Rt Rato

Rts Ratos

s Segundo(s)

SC Via Subcutânea

SPE Serviço de Patologia Experimental

T3 Triiodotironina

T4 Tiroxina

TC Traço na base da cauda

TDLU Unidades Lobulares Ductais Terminais (Terminal Ductal Lobular Unit)

TEB Extremidade do Botão Terminal (Terminal End Buds)

tr Tempo de Retenção

VCCa Veia Cava Caudal

VCCa-Ca Veia Cava Caudal Caudo-Hepática

VCCa-Cr Veia Cava Caudal Crânio-Hepática

VCCa-IH Veia Cava Caudal Intra-Hepática

VE Veia Esplénica

VGD Veia Gastro-Duodenal

VGE Veia Gástrica Esquerda

VLDL Lipoproteínas de Densidades Muito Baixa (Very Low Density Lipoprotein)

VMS Veia Mesentérica Superior

LISTA DE ACRÓNIMOS

VP Veia Porta

VGd Veia Gastro-Duodenal

VPI Veia Pilórica

Bibliografia

- [1] Jaeschke, H.; (2012). Toxic Responses of the Liver. In: Klaassen, C. D.; Watkins, J. B.; (2012). Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull, 2ª Edição. McGraw Hill, SP, Brasil.
- [2] Wikipedia, the free encyclopedia; (2013). Liver. From Wikipedia, the free encyclopedia.
- [3] Wingèrd, B. D.; (1998). Rat Dissection Manual. The Johns Hopkins University Press, USA.
- [4] Aller, M.-A.; Arias, J.; (2009). Microsurgery in liver research. Bentham Science Publishers.
- [5] Aller, M.-A.; Arias, N.; Prieto, I.; Agudo, S.; Gilsanz, C.; Lorente, L.; Arias, J.-L.; Arias, J.; (2012). A half century (1961-2011) of applying microsurgery to experimental liver research. In: World Journal of Hepatology, July 27, 2012; Volume 4; Issue: 199-208.
- [6] Hollander, C. F.; Leeuw, A. M.; Zwieten, M. J. v.; (1985). Anatomy, Histology, and Ultrastructure. In Jones, T. C.; et al. (1985). Digestive System. Springer-Verlag Berlim Heidelberg.
- [7] Martins, P. N. A., Neuhaus, P.; (2007). Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. In: Journal compilation Liver International, 384-392. Blackwell Munksgaard.

- [8] Hickman; (1992). Laboratory Studies in Integrated Principles of Zoology. 8th ed. In: Biol 1441- Principles of Biology II: Rat Anatomy.
- [9] Majerowicz, Joel; (2013). Biossegurança em Biotérios de Experimentação (Parte II). Bioterios.com.
- [10] Fox, J. G.; Anderson, L. C.; Loew, F. M.; Quimby, F. W.; (2002). Laboratory Animal Medicine. 2nd edition. Academic Press, USA.
- [11] Walker, W. F.; Homberger, D. G.; (1997). Anatomy and Dissection of the Rat. Third edition. Editora W. H. Freeman.
- [12] Suckow, M. A.; Weisbroth, S. H.; Franklin, C. L.; (2006). The Laboratory Rat. Second Edition. Elsevier Academic Press, USA.
- [13] Rusyn, I; Tsuchiya, M.; Ji, C.; Kosyk, O.; Shymonyak, S.; Melnyk, S.; Kono, H.; Tryndyak, V.; Muskhelishvili, L.; Pogribny, I.P.; Kaplowitz, N.; Gatti D. M.; Kawaguchi, A.; Lam, T. C.; Uehara, T.; Wright, F. A.; (2011). Drug study: High-fat diet plus subchronic alcohol-induced effects in males of 14 inbred strains of mice. In: Mouse Phenome Database at The Jackson Laboratory.
- [14] Madrahimov, N.; (2005). Vascular anatomy of the rat liver and its implications for extended hepatectomy and the determination of the minimal liver mass. Inaugural-Dissertation. Medizinische Fakultät der Universität Duisburg-Essen.
- [15] Madrahimov, N.; Broelsch, C.; (2006). Marginal Hepatectomy in the Rat: From Anatomy to Surgery. Annals of Surgery. Volume 244, Number 1, July 2006.
- [16] Aller, M.-A.; Arias, J.-L.; Arias, J.; (2010). A suitable micro-

- surgical method for obstructive cholestasis in the rat. Protocol Exchange, (2010).
- [17] Bowen, R.; (2004). Architecture of the Liver and Biliary Tract. In: biology.about.com.
- [18] Dyce, K. M.; Sack, W. O.; Wensing, C. J. G.; (2004). Tratado de Anatomia Veterinária. Elsevier, RJ, Brasil.
- [19] Eroschenko, V. P.; Fiore, M. S. H. di; (2013). DiFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. Twelfth edition, Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- [20] Swenson, M. J.; Reece, W. O. (1996). Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos. 11^a Edição, Guanabara koogan, RJ, Brasil.
- [21] Krinke, G. J.; (2000). The Laboratory Rat: The handbook of Experimental Animals. Academic Press, London, UK.
- [22] Sassatani, A. S.; (2008). Análise da influência da pressão de injeção ductal retrógrada na pancreatite aguda experimental. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de pós-graduação em Medicina. São Paulo.
- [23] Wikipedia, the free encyclopedia (2014). Lobules of liver.
- [24] Kierszenbaum, A. L.; (2012). Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia. Elsevier, RJ, Brasil.
- [25] Ross, M. H.; Pawlina, W.; (2006). Histology. 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- [26] Flores, E. E.; Aranzábal, M. del C. U.; (2002). Atlas de histología de vertebrados. Primera Edición, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

- [27] Freeman, W. H.; Bracegirdle, B.; (1976). *An Advanced Atlas of Histology*. Heinemann Educational Books, USA.
- [28] Fox, S. I.; (1999). *Human Physiology. Sixth Edition*, McGraw-Hill, USA.
- [29] Guyton, A. C.; Hall, J. E.; (2006). *Textbook of medical physiology. Eleventh edition*, Elsevier, USA.
- [30] Kuntz, E.; Kuntz, H.-D.; (2009). *Hepatology: Textbook and Atlas. 3rd edition*, Springer, Germany.
- [31] Gartner, L. P.; Hiatt, J. L.; Strum, J. M. (2011). *BRS Cell Biology & Histology. 6th edition* published by Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- [32] Zachary, J. F.; McGavin, M. D.; (2012). *Bases da Patologia Veterinária*. Elsevier, Brasil.
- [33] Young, B.; Heath, J. W.; (2000). *Wheater Histologia Funcional: texto e atlas em cores. Quarta edição*, Guanabara-koogan, RJ, Brasil.
- [34] Gartner, L.; Hiatt, J. L. (2007). *Tratado de Histologia em Cores*. Elsevier, RJ, Brasil.
- [35] Wisse, E.; Luo, D.; Vermijlen, D.; Kanellopoulou, C.; De Zanger, R.; Braet, F.; (1997). On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells. In: *Semin. Liver Dis.*, 1997; 17(4): 265-286.
- [36] McPhee, J.; Ganong, W. F.; (2007). *Fisiopatologia da Doença: Uma Introdução à Medicina Clínica. 5ª Edição*, McGraw-Hill, RJ, Brasil.
- [37] Klaunig, J. E.; Kamendulis, L. M.; (2012). Capítulo 8: Carcinogêses Químicas. In: *Klaassen, C. D.; Watkins, J. B.; (2012).*

Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull, 2ª Edição. McGraw Hill, SP, Brasil.

[38] Wikipedia, the free encyclopedia (2014). Metabolismo.

[39] Larini, L.; (2008). Fármacos e medicamentos. Artmed, Porto Alegre, Brasil.

[40] Herrine, S. K.; Navarro, V. J.; Rubin, R; (2011). Chapter 14: The Liver and Biliary System. In: Rubin, R.; Strayer, D. S.; Rubin, E.; (2011). Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine. Sixth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.

[41] Rubin, R.; Rubin, E.; (2009). Chapter 14: The liver and biliary system. In: Essentials of Rubin's Pathology. 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.

[42] Taniguchi, C.; Guengerich, F. P.; (2013). Capítulo 4: Metabolismo dos Fármacos. In: Golan, D. E; Tashjian, A. H.; Armstrong, E. J.; Armstrong, A. W.; (2013). Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2ª Edição, Guanabara Koogan, RJ, Brasil.

[43] Barros, E; Barros, H. M. T.; (2010). Medicamentos na prática clínica. Artmed, SP, Brasil.

[44] Burtis, C. A.; Ashwood, E. R; Bruns, D. E.; (2011). Tietz: Fundamentos da Química Clínica. Elsevier, Brasil.

[45] Neto, A. C.; Gauer, G. J. C.; Furtado, N. R.; (2003). Psiquiatria para estudantes de medicina. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil.

[46] Di Giulio, R. T; Hinton, D. E.; (2008). The Toxicology of Fishes. CRC Taylor & Francis Group, USA.

[47] Cummings, S. W.; Prough, R. A.; (2012). Chapter 1: Metabolic Formation of Toxic Metabolites. In: Caldwell, J.; Jakoby, W.

- B.; (2012). *Biological Basis of Detoxication*. Academic Press, Elsevier.
- [48] Jefcoate, C. R.; (2012). Chapter 2: Integration of Xenobiotic Metabolism in Carcinogen Activation and Detoxication. In: Caldwell, J.; Jakoby, W. B.; (2012). *Biological Basis of Detoxication*. Academic Press, Elsevier.
- [49] Rhoades, R.; Bell, D. R.; (2009). *Medical Physiology: Principles for Clinical Medicine*. Third Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- [50] Gross, R.; (2012). *The Physiology of Growth*. Elsevier, NY, USA.
- [51] FFUP (2007). *Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs)*. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- [52] Morrison, R.; Boyd, R.; (1996). *Química Orgânica*. Fundação Caloust Gulbenkian, 13.^a Edição, Lisboa.
- [53] (2009). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- [54] Lah, K; (2011). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. In: *Toxipedia connecting science and people*. USA.
- [55] Jesus, I. M. P.; (2011). *Avaliação Morfológica e Molecular na Administração Experimental de DMBA*. Tese de Mestrado em Química Forense. Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- [56] Pohanish, R. P.; (2012). *Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens*. Sixth edition. Elsevier. USA.
- [57] Sigma-Aldrich; (2014). *7,12-Dimethylbenz(a)anthracene* at Sigma-Aldrich.
- [58] Morris, R. J.; (2009). *Standard Operating Procedure: DMBA*.

- [59] Santa Cruz Biotechnology; (2014). 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene. Santa Cruz Biotechnology.
- [60] Agrawal, A.; Verma, P.; Goyal, P.K.; (2010). Chemomodulatory Effects of Aegle Marmelos Against DMBA-Induced Skin Tumorigenesis in Swiss Albino Mice. In: Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, Vol 11, 2010, 1311-1314.
- [61] Dimitrova-Shumkovska, J.; Veenman, L.; Ristoski, T.; Leschiner, S.; Gavish, M (2010). Decreases in Binding Capacity of the Mitochondrial 18 kDa Translocator Protein Accompany Oxidative Stress and Pathological Signs in Rat Liver After DMBA Exposure. In: Toxicologic Pathology, 38: 957-968, 2010. Sage publications.
- [62] Goa, J; Lauer, F. T.; Mitchell, L. A.; Burchiel, S. W.; (2007). Microsomal Epoxide Hydrolase is required for 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) – Induced Immunotoxicity in Mice. In: Toxicological Sciences, 98(1), 137-144 (2007).
- [63] Loomis, T. A; Hayes, A. W.; (1996). Loomis's Essentials of Toxicology. Fourth Edition, Academic Press, USA.
- [64] (2014). Os perigos do tabaco. In: Deixar de fumar.
- [65] Public Health England; (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons (Benzo[a]pyrene): General Information. Prepared by the Toxicology Department, CRCE, PHE, 2008.
- [66] Bolanho, A.; Carmo, E. D. do; Sousa, F. A. C. G. de; Carvalho, Y. R.; Rosa, L. E. B.; (2005). Descrição da metodologia utilizada no estudo da carcinogênese induzida pelo DMBA em língua de hamster. In: Revista de Odontologia da UNESP. 2005; 34(3): 129-133.
- [67] Ali, D. A; Ismail, M. F.; Badr, H. A.; (2013). Hepatoprotective effect of ginger extract against the toxicity of 7, 12-

- dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) in albino rats. In: *World J Pharm Sci.* 2013; 1(3): 61-71.
- [68] Vater, S. T.; Baldwin, D. M.; Warshawsky, D.; (1991). Hepatic Metabolism of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene in Male, Female, and Ovariectomized Sprague-Dawley Rats. In: *Cancer Research*, 51, 492-498, January 15. 1991.
- [69] Navarro, C. M.; ALMEIDA, O. P. de; Line, S. R. P.; (1994). Carcinogênese experimental: lesões palatinas e linguais produzidas pelo óxido de nitroquinolina (4NQO) em ratos. In: *Rev. Odontol. UNESP, São Paulo*, 23(1): 71-80,1994.
- [70] Manoharan, S.; Wani, S. A.; Vasudevan, K.; Manimaran, A.; Prabhakar, M. M.; Karthikeyan, S.; Rajasekaran, D.; (2013). Saffron Reduction of 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis. In: *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 14(2), 951-957, 2013.
- [71] Mainenti, P.; Rosa, L. E. B.; (2008). Carcinogênese Química Experimental em Glândulas Salivares – Revisão da Literatura. In: *Revista Brasileira de Cancerologia*, 54(2): 167-174, 2008.
- [72] Barros, A. C. S. D.; Muranaka, E. N. K.; Mori, L. J.; Pelizon, C. H. T.; Iriya, K.; Giocondo, G.; Pinotti, J. A.; (2004). Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene . In: *Revista do Hospital das Clínicas*. Vol.59, nº5, São Paulo, 2004.
- [73] Clarke, R.; (2002). Capítulo 24: Human Breast-Cancer Xenografts as Models of the Human Disease. In: *From: Teicher, B. A.; (2002). Tumor Models in Cancer Research. Humana Press Inc., Totowa, NJ*, pp. 453 – 470.
- [74] Kernohan, I. R.; Inglis, M.S; Wheatley, D.N.; (1967). The Effect of Liver Interference on Mammary Tumour Induction by 7,12-

- Dimethylbenz(z)anthracene in Sprague-Dawley Rats. In: *Br J Cancer*. Mar 1967; 21(1): 214–217.
- [75] Russo, J; Russo, I. H.; (1996). Experimentally induced mammary tumors in rats. In: *Breast Cancer Research and Treatment*, 1996, Volume 39, Issue 1, pp 7-20.
- [76] Russo, I. H.; Russo, J.; (1996)2. Mammary Gland Neoplasia in Long-Term Rodent Studies. In: *Environmental Health Perspectives*, Volume 104, Number 9, September 1996.
- [77] Das, S. K.; Delp, C. R.; Bandyopadhyay, A. M.; et al.; (1989). Fate of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene in the Mouse Mammary Gland during Initiation and Promotion Stages of Carcinogenesis in Vitro. In: *Cancer Res*. 1989;49:920-924.
- [78] Liska, J.; Galbavy, S.; Macejova, D.; Zlatos, L.; Brtko, J.; (2000). Histopathology of mammary tumours in female rats treated with 1-methyl-1-nitrosourea. In: *Endocrine Regulations*, Vol. 34, 91-96, 2000.
- [79] Dias, M; Cabrita, S.; Sousa, E.; França, B.; Patrício, J.; Oliveira, C; (1999). Benign and malignant mammary tumors induced by DMBA in female Wistar rats. In: *Eur. J. Gynaec. Oncol.*, XX, n.4, 1999, pp. 285-288.
- [80] Manoharan, S.; Muneeswaran, M.; Baskaran, N.; (2010). Chemopreventive efficacy of berberine in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. In: *Int. J. Res. Pharm. Sci.*, Vol.1, Issue-4, 521-529 (2010).
- [81] Manoharan, S.; Selvan, M. V.; (2012). Chemopreventive potential of geraniol in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. In: *Journal of Environmental Biology*, 33, 255-260 (2012).

- [82] Li, X.; Eckard, J.; Shah, R.; Malluck, C.; Frenkel, K.; (2002). Interleukin-1 α Up-Regulation in Vivo by a Potent Carcinogen 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) and Control of DMBA-induced Inflammatory Responses. In: *Cancer Research*, 62, 417-423, 2002.
- [83] Roomi, M. W.; Roomi, N. W.; Kalinovsky, T.; Ivanov, V.; Rath, M.; (2008). Inhibition of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced skin tumors by a nutrient mixture. In: *Med. Oncol.*, 25, 333-340, 2008.
- [84] Park, K.; Kim, Y. S.; (1986). Tumor Associated Proteins of Rat Skin Tumor Induced by 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene. In: *Yonsei Medical Journal*, Vol. 30, N^o 3, 1986.
- [85] Sancheti, G; Goyal, P. K.; (2006). Modulatory Influence of *Rosmarinus officinalis* on DMBA-induced Mouse Skin Tumorigenesis. In: *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 7, 331-335, 2006.
- [86] Saha, D.; Hait, M.; (2012). An Ontological Design: Two Stage Mouse Skin Carcinogenesis Induced By DMBA and Promoted By Croton Oil. In: *Asian J. Res. Pharm. Sci.*, Vol. 2: Issue 1, Pg 01-03, 2012.
- [87] Das, R. K., Bhattacharya, S.; (2004). Inhibition of DMBA-croton Oil Two-stage Mouse Skin Carcinogenesis by Diphenylmethyl Selenocyanate Through Modulation of Cutaneous Oxidative Stress and Inhibition of Nitric Oxide Production. In: *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 5,151-158, 2004.
- [88] Rajalingam, K.; Renju, G. L.; Balakrishnan, S.; Manoharan, S.; (2008). Effect of Clerodendron inerme on Erythrocyte Membrane Integrity During 7,12-dimethylbenz(a)anthracene Induced Skin Carcinogenesis in Swiss Albino Mice. In: *Asian Journal of Scientific Research*, 1 (3), 246-255, 2008.

- [89] Huggins, C.; Pataki, J.; (1965). Aromatic azo derivatives preventing mammary cancer and adrenal injury from 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Apr 1965; 53(4): 791-796.
- [90] Szabo, S.; Sandon, Z.; (1997). Chapter 5: Chemically-Induced Lesions in the Adrenal Cortex. In: Thomas, J. A.; Colby, H. D.; (1997). In: Endocrine Toxicology, Second Edition, Taylor & Francis, USA.
- [91] Huggins, C.; Morii, S.; (1961). Selective adrenal necrosis and apoplexy induced by 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene. In: J. Exp. Med., 114, 741-760, 1961.
- [92] Bartholin, L.; (2012). Chapter 4: Pancreatic cancer and the tumor microenvironment: Mesenchyme's role in pancreatic carcinogenesis. In: Grippo, P. J.; Munshi, H. G.; (2012). Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment. Transworld Research Network, Trivandrum (India).
- [93] Jimenez, R. E.; Z'graggen, K.; Hartwig, W.; Graeme-Cook, F.; Warshaw, A. L.; Fernandez-del Castillo, C.; (1999). Immunohistochemical Characterization of Pancreatic Tumors Induced by Dimethylbenzanthracene in Rats. In: American Journal of Pathology, Vol. 154, N° 4, April 1999, American Society for Investigative Pathology: 1223–1229.
- [94] Z'graggen, K.; Warshaw, A. L.; Werner, J.; Graeme-Cook, F.; Jimenez, R. E.; Fernandez-del Castillo, C.; (2001). Promoting Effect of a High-Fat/High-Protein Diet in DMBA-Induced Ductal Pancreatic Cancer in Rats. In: Ann Surg., May 2001; 233(5): 688–695.
- [95] Osvaldt, A. B.; (2004). Modelo Experimental de Lesões Intra-epiteliais e de Adenocarcinoma Ductal Pancreático Induzidos

- por 7,12-dimetilbenzantraceno em Camundongos. Orientação Luiz Rohde. Co-orientação Maria Isabel Albano Edelweiss. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação Medicina: Cirurgia. Porto Alegre, BR-RS.
- [96] Wendt, L. R. R.; (2004). Efeitos do Álcool e da Cafeína em Modelo de Lesões Intra-epiteliais e de Carcinogênese Pancreática Induzidas por 7,12-Dimetilbenzantraceno (DMBA) em Camundongos. Orientador Luiz Rohde. Co-orientação Maria Isabel Albano Edelweiss. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação Medicina: Cirurgia. Porto Alegre, BR-RS.
- [97] AK-KAB (Working Group for Cage Processing); (2010). Cage Processing in Animal Facilities. 3rd issue. Arbeitskreis Käfigaufbereitung AK-KAB (Working Group for Cage Processing).
- [98] Simões, F. G.; Reis, R. C.; Dias, R.B.; Carvalho, J. C. M.; (2008). A experimentação animal. Pp:595-603.
- [99] Wikipedia, the free encyclopedia (2014). Sigma-Aldrich.
- [100] The Board of Trustees of the University of Illinois; (2013). The Laboratory Rat. The Biologic Resources Laboratory (BRL). University of Illinois at Chicago (UIC).
- [101] Padmos, S.; (2006). Surgery on a rat. Study project: visualise microsurgery on a rat, based on a plastic model of a laboratory rat. Master Scientific Illustration (Maastricht). Aquarel / Water colour on Fabriano paper.
- [102] Microscopia. Acesso: <http://minerva.ufpel.edu.br/mgrheing/praticaesq.htm>, 2013.
- [103] Martín, V.; (2012). Article 6: Histological techniques: Han-

dling histological sections. We Sapiens.org. Open knowledge community.