



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

NATÁLIA SAYURI SATO

**Avaliação histomorfológica do tratamento com extrato de *Rhamnus*
sphaerosperma var. *pubescens* sobre alterações na cápsula de
baço de ratos expostos ao 4-NQO**

Araraquara, SP

2017

NATÁLIA SAYURI SATO

**Avaliação histomorfológica do tratamento com extrato de *Rhamnus
sphaerosperma* var. *pubescens* sobre alterações na cápsula de
baço de ratos expostos ao 4-NQO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica
Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

Araraquara, SP

2017

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram para que de alguma forma eu chegasse até aqui: por um momento ou ao longo dos anos, com maior ou menor intensidade, nada aconteceu por acaso.

Agradecimentos

Primeiramente, a Deus e aos meus anjos de luz, pelo amparo espiritual e todas as oportunidades que tive até aqui.

À minha mãe, Amélia, por ter desempenhado ao longo desses últimos anos o papel de pai e mãe, por ter sido sempre o exemplo, a força e o suporte necessários para que eu seguisse em frente.

Ao meu irmão, Gustavo, por ter compensado a minha ausência por todo esse período de graduação longe de casa.

Aos meus padrinhos, Sérgio e Eny, por toda demonstração de preocupação, apoio e cuidado.

Ao meu orientador, Cleverton, por ter me aceitado em seu laboratório, pela disponibilidade e prontidão sempre que precisei e, principalmente, por todo conhecimento transmitido sempre da forma mais serena e sutil.

À Thaís Moreira, por permitir com que eu participasse e enriquecesse o seu trabalho.

À República Lolitas, aquelas que se tornaram irmãs, foram meu lar, meu refúgio e meu lugar de paz durante os dias em Araraquara. Minha gratidão especial à Bárbara, querida Mulher, por toda ajuda sempre que precisei.

Aos meus amigos, Thaís Bucci e Gustavo Bueno, por serem tão essenciais – por todas as broncas e cobranças, ao mesmo tempo em que são minha paz, meu conforto e todo o apoio para seguir todos os dias.

Resumo

O 4-NQO é um agente utilizado extensivamente para a indução de carcinogênese em experimentos animais, capaz de produzir diferentes fases de carcinoma epidermóide. Neste contexto, estudos prévios executados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, demonstraram que animais submetidos ao tratamento com extrato de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (EBC), submetidos ou não à exposição ao 4-NQO, tiveram alterações na integridade da cápsula do baço. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar as alterações histomorfológicas das cápsulas destes animais através da identificação da presença de colágeno e tecido muscular pela coloração do tricrômico de Masson.

Os ensaios *in vivo* consistiram no uso de ratos do gênero *Wistar* e seu respectivo tratamento com EBC e/ou 4-NQO. Os órgãos foram coletados após um período total de 16 semanas e processados histologicamente e, então, foram corados pelo tricrômico de Masson. As lâminas obtidas tiveram as cápsulas fotografadas em foto microscópio óptico em aumento de 20x e, assim, as medidas de espessura da cápsula do baço e, respectivas medidas de região colágena ou musculatura lisa, foram medidas pelo software IMAGE J[®]. Posteriormente, a análise estatística dos dados foi realizada no software PRISM[®], com ANOVA via teste de Kruskal-Wallis.

Concluiu-se então que o 4-NQO apresentou efeito atrófico sobre o músculo liso. No entanto, o EBC demonstrou capacidade de reverter este quadro quando os animais foram previamente tratados com 4-NQO e, posteriormente, com EBC, demonstrando o efeito quimioprotetor tecidual do EBC.

Palavras chaves: 4-NQO; *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*; tricrômico de Masson.

Lista de Figuras

Figura 1 - Estruturas de 4-NQO e seus derivados.....11

Figura 2 - Ilustração da cápsula do baço em regiões de colágeno e músculo
liso.....15

Figura 3 - Fotografias obtidas no aumento de 20x, demonstrando a integridade de
cápsula.....21

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Espessura média em micrômetros (μm) da medida de colágeno nas cápsulas dos baços dos animais tratados com EBC após indução com 4-NQO.....22

Gráfico 2 - Medida em micrômetros da espessura de músculo liso da cápsula do baço após indução com 4-NQO.....23

Gráfico 3 – Medida em micrômetros da espessura total da cápsula do baço após indução com 4-NQO.....24

Lista de abreviaturas e siglas

µm: Micrômetros

4-NQO: 4-nitroquinolina 1-óxido

C: Celsius

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxidorribonucleico

EBC: Extrato bruto do caule

g: Gramas

G1: Grupo 1

G2: Grupo 2

G3: Grupo 3

G4: Grupo 4

G5: Grupo 5

G6: Grupo 6

G7: Grupo 7

GL: Gay – Lussac

HAQO: 4-hidroxiaminoquinolina 1-óxido

HPA: Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

INCA: Instituto Nacional do Câncer

mL: Mililitros

OMS: Organização Mundial da Saúde

p: P-Value

PALS: Zona Periarticular Linfóide

ppm: partículas por milhão

UNESP: Universidade Estadual Paulista

Sumário

1. Introdução	10
1.1. Câncer Oral	10
1.2. 4-nitroquinolina 1-óxido (4-NQO)	10
1.3. <i>Rhamnus sphaerosperma</i> var. <i>pubescens</i>	12
1.4. Baço	13
1.5. Tricrômico de Masson	14
1.6. Colágeno	15
1.7. Músculo Liso	16
2. Desenvolvimento	16
2.1. Objetivo	16
2.2. Metodologia	17
2.2.1. Ensaios <i>in vivo</i>	17
2.2.2. Desenho experimental	17
2.2.3. Coleta de órgãos e processamento histopatológico	18
2.2.4. Cortes e Coloração Histopatológica	19
2.3. Métodos de Análise	20
3. Resultados	20
4. Discussão	24
5. Conclusão	26
6. Referências Bibliográficas	27
7. Anexos	31
7.1. Anexo 1	31

1. Introdução

1.1. Câncer Oral

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer bucal é o oitavo mais comum tipo de câncer. Pela Classificação Internacional de Doenças, o câncer oral consiste em um subgrupo de malignidades de cabeça e pescoço, sendo um sinônimo para carcinoma epidermóide originado na mucosa oral, dado que este tipo totaliza 90% dos casos relacionados a esta região (TSANTOULIS, 2017). De menor incidência, podem ocorrer tumores salivares, os sarcomas e os melanomas de mucosa (INCA, 2016).

Sua etiologia é multifatorial, podendo englobar fatores como a predisposição genética (endógenos) e os fatores comportamentais e ambientais (exógenos) que, em sinergia, contribuem para o aparecimento da doença. Acomete principalmente indivíduos com mais de 45 anos de idade e, globalmente, há incidência variável nos parâmetros intra e inter-regional (BIAZEVIC, 2006).

O processo neoplásico se inicia com um epitélio saudável progredindo para uma hiperplasia e displasia até carcinoma in-situ e/ou invasivo, sendo uma combinação de alterações genéticas (NAGPAL, 2003). Estas alterações consistem em aberrações cromossômicas, mutações de DNA, amplificações ou deleções e/ou alterações epigenéticas (ISHIDA, 2017), que levam à inativação dos genes supressores de tumor ou à ativação de oncogenes (HENRIQUES, 2011). No neoplasma, a proliferação celular é excessiva e autônoma, descoordenada dos tecidos normais acontecendo apesar do DNA danificado, dado a perda dos checkpoints do ciclo celular. Estas células neoplásicas por sua vez, invadem os vasos linfáticos e realizam metástase para os linfonodos locais (NAGPAL, 2003).

1.2. 4-nitroquinolina 1-óxido (4-NQO)

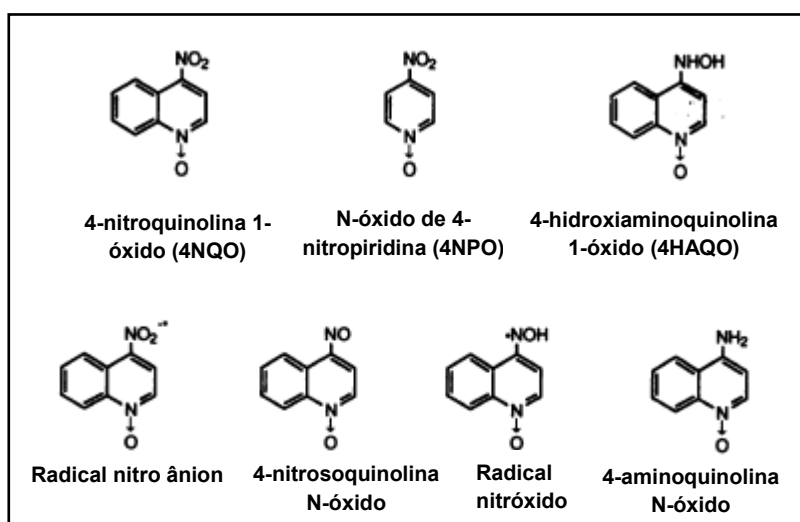
O 4-NQO é um composto sintético, solúvel em água, que permite o uso sistêmico através da água de beber dos animais (VERED, 2005), capaz de produzir mudanças histológicas e moleculares similares as do processo de carcinogênese

oral em humanos, incluindo alterações no palato, esôfago e língua (ventral e dorsal). Além disso, por injeção subcutânea é capaz de induzir a carcinogênese no pulmão. (KANOJIA, 2005).

O mecanismo de indução do 4-NQO ocorre devido a um potente estresse oxidativo intracelular e pela ligação do seu produto metabólito que se liga ao DNA, predominantemente em resíduos de guanina (KANOJIA, 2005). Assim, o início da ação carcinogênica do 4-NQO é dado pela redução enzimática do seu grupo nitro que, posteriormente, tem como produto o 4HAQO (Figura 1), sendo este produto capaz de se ligar ao DNA e produzir a mutagenicidade e a carcinogenicidade atribuídas ao composto (NUNOSHIBA, 1993).

O tempo de exposição dos animais ao 4-NQO e aparecimento de alterações nos tecidos varia entre os protocolos experimentais: certos estudos mostraram que a exposição pode ser menor que duas semanas, enquanto outros precisaram de quatro, oito ou até 12 semanas. Ademais, observou-se também que mudanças histológicas precederam as modificações clínicas (VERED, 2005), de modo que o 4-NQO leva ao desenvolvimento de mudanças histológicas pré-neoplásicas, como a displasia e a hiperplasia, seguidos do desenvolvimento do carcinoma epidermóide (ISHIDA, 2017).

Figura 4 - Estruturas de 4-NQO e seus derivados



Fonte: NUNOSHIBA, 1993.

A carcinogênese química produzida pelo 4-NQO é capaz de refletir o quadro clínico do carcinoma epidermóide, dada à heterogeneidade das lesões que provoca, fornecendo amostras com características teciduais adequadas para análises

patológicas e moleculares (ISHIDA, 2017). No entanto, nota-se que este modelo ainda possui certas limitações, dado que observação a produção de carcinomas com alta diferenciação em animais, mas em humanos, os tumores costumam ser menos diferenciados e mais agressivos clinicamente. Além disso, em animais, raramente observa-se processos metastáticos (VERED, 2005).

1.3. *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*

A família Rhamnaceae A.L. Jussieu é composta de arbustos, árvores, lianas e, raramente, ervas, abrangendo cerca de 45 gêneros e 850 espécies, sendo comumente produtoras de taninos, antraquinonas e mucilagem (DUARTE, 2008). Além disso, possuem características hipotensivas, digitalóides e diuréticas de potencial terapêutico (CORREA, 1926).

Dentre o gênero *Rhamnus* L. destaca-se a frângula (*Rhamnus frângula* L.) e a cáscara – sagrada (*Rhamnus purshiana* DC), dado seus usos medicinais frequentes por conterem compostos antraquinônicos de propriedade laxante (DUARTE, 2008). Neste contexto, *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (Reissek) M.C. Johnst. (Rhamnaceae) é outra representante desta família, utilizada extensamente na medicina popular pelas suas funções laxativas, contra insetos, antiprotozoárias, antibacterianas, antifúngicas e antitumorais (MOREIRA, 2012) e foi o alvo do estudo em que este projeto foi inserido.

Rhamnus sphaerosperma var. *pubescens* é popularmente conhecida por fruto-de-pombo e/ou saguari-vermelho (DUARTE, 2008) e/ou cangica (MOREIRA, 2012) e está amplamente presente nas regiões Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) e Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do norte e Sergipe) do país (LIMA, 2015). Em estudos prévios, constatou – se em análise fitoquímica que possui em sua composição ácidos orgânicos, fenóis, flavonóides, cumarinas, esteróides/triterpenos e antraquinonas, sendo este último composto apresentado de forma mais expressiva (MOREIRA, 2012).

1.4. Baço

O baço é considerado a maior massa tecidual do sistema linfóide no organismo, sendo ele interposto ao sistema sanguíneo (MARYMONT, 1963). Este órgão se distingue morfológica e funcionalmente em dois compartimentos distintos: a polpa branca e a polpa vermelha. Na polpa vermelha, ocorre a filtração sanguínea e a remoção de material estranho e eritrócitos danificados, sendo um importante reservatório de ferro, eritrócitos e plaquetas. Já na polpa branca, ocorre de fato a função linfóide do órgão, contendo cerca de 25% dos linfócitos totais do organismo e iniciando respostas imunes à antígenos presentes no sangue. Esta polpa circunda as arteríolas centrais e é composta de três subcompartimentos (revestimento peri arteriolar linfóide, folículos e zona marginal) (CESTA, 2006).

A polpa branca possui uma estrutura muito similar aos linfonodos, de maneira que possui compartimentos compostos de células T e B. Essa organização é mantida por citocinas que atraem as células para os seus respectivos sítios, estabelecendo regiões específicas na polpa: as células T ficam na zona periarteriolar linfóide (PALS), enquanto as células B ficam nos folículos. Já na zona marginal, ocorre o trânsito de células que saem da corrente sanguínea e adentram a polpa branca (MELBIUS, 2005)

Delimitando sua estrutura, o baço possui uma rede composta de cápsula e trabécula. A cápsula é a parte mais externa e se liga ao peritônio. Já a trabécula é a continuação da cápsula para dentro do órgão e o penetra (MARYMONT, 1963). A cápsula é composta por uma rede de colágeno que contém fibras reticulares: a parte mais externa é a camada serosa e, a mais interna, é a camada elástica, colagenosa e de fibras musculares lisas. O músculo liso e as fibras elásticas da cápsula esplênica e da trabécula possuem função determinante no fluxo de sangue para fora do órgão e, assim, variam de acordo com a espécie animal (KAI, 2000).

Estudos prévios executados em nosso laboratório na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, envolvendo animais submetidos ao tratamento com extrato de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* e expostos ao 4-NQO, revelaram perda de integridade de cápsula esplênica através da análise histológica por coloração com hematoxilina-eosina de alguns grupos do modelo experimental. Quando comparado ao controle de veículo do tratamento e ao controle experimental do modelo, o grupo de animais expostos ao 4-NQO e, posteriormente, tratados com

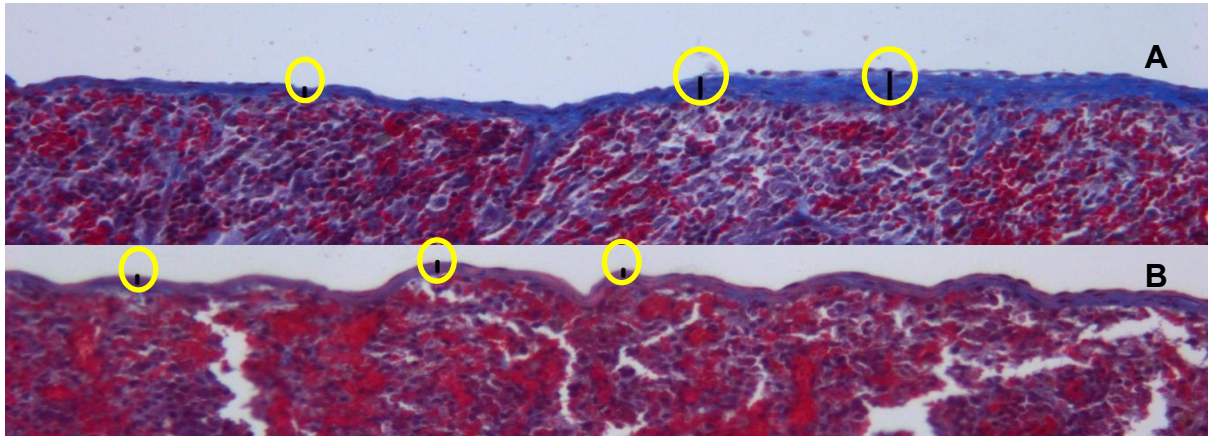
extrato bruto do caule (EBC) de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* na concentração de 10mg/kg apresentou maior perda de integridade da cápsula, muito superior aos demais grupos experimentais. Dado este fato, este presente estudo foi gerado a fim de averiguar a relação entre a perda de continuidade da cápsula nos baços dos animais e as estruturas morfológicas presentes, através de análise histomorfológica por tricrômico de Masson.

1.5. Tricrômico de Masson

O tricrômico de Masson é uma das colorações mais utilizadas na rotina dos laboratórios de histopatologia. Seu uso permite o diagnóstico fácil e rápido, devido à delimitação topográfica que se cria do tecido conjuntivo e do modo em que demonstra as interações presentes no próprio tecido (GOLDNER, 1937). É mais comumente utilizado para a diferenciação de músculo e colágeno, sendo assim, muito requisitado para biópsias (fígado, rim, coração, músculos e nervos) e identificação de dermatopatologias (JONES, 2010).

Seu princípio consiste, basicamente, na aplicação de um conjunto de corantes e, na conseqüente observação nas características físicas dos inúmeros componentes teciduais e o seu relativo impacto na coloração. Desta forma, este método baseia – se nos tecidos básicos ionizados e como estes reagem com os corantes ionizados de caráter ácido. Como resultado final, eritrócitos serão corados em amarelo ou vermelho; citoplasma, fibrinas e músculo em vermelho e, colágeno e osso em azul ou verde (JONES, 2010).

Figura 2 - Ilustração da cápsula do baço em regiões de colágeno e músculo liso.



A e B, respectivamente, correspondem ao colágeno e músculo liso em marcação de 3 regiões distintas. O colágeno é corado em tons de azul pelo tricrômico de Masson e a musculatura lisa em tons rosados.

1.6. Colágeno

O tecido conjuntivo está presente nos mais variados tecidos do organismo humano, se origina como tecido mesenquimal embrionário para depois, ao longo do desenvolvimento se transformar em inúmeros outros, desde o sangue até os ossos, sendo capaz de proporcionar suporte mecânico e estrutural para os mesmos (RHEE, 2007).

O colágeno é a substância primária do tecido conjuntivo, sendo considerada a mais abundante proteína em mamíferos, produzindo as fibras colágenas presentes na pele, tendões, ossos, cartilagens, entre outros (DESHMUKH, 2016). É uma grande família que compreende 28 diferentes tipos, divididos de acordo com suas cadeias α e espécies moleculares e que, devido à expansão de conhecimento da biologia molecular e da clonagem gênica, continua em expansão. Além disso, a existência de inúmeras isoformas moleculares do mesmo tipo de colágeno torna a diversidade ainda maior (RICARD-BLUM, 2011). Através de eventos intracelulares e extracelulares, o colágeno é capaz de ser produzido pelas mais diversas células, como as mesenquimais (fibroblastos, condrócitos, osteoblastos, odontoblastos e cementoblastos), epiteliais, endoteliais, musculares e Schwaan podendo ser degradado por collagenases e outros tipos de enzimas, como metaloproteinases de matriz (DESHMUKH, 2016).

1.7. Músculo Liso

A musculatura lisa está presente na bexiga urinária, na via respiratória, nas paredes do tubo intestinal do duto biliar, nos vasos sanguíneos, no útero, em forma de camada ou feixes (KIERSZEMBAUM, 2004). Além disso, está presente na parede dos vasos do baço e em sua cápsula (APPLEGATE, 2012).

Suas células possuem núcleo central, são delgadas e fusiformes, circundadas por uma lâmina basal e, unidas entre si, por junções comunicantes que permitem a contração sincrônica do músculo. O citoplasma perinuclear possui organelas (mitocôndria, ribossomos, retículo endoplasmático rugoso e um aparelho de Golgi), além de uma rede de filamentos que se dividem em: espessos de miosina, intermediários de desmina e vimentina e delgados de actina, sendo que os dois últimos se inserem em estruturas denominadas de corpos densos (KIERSZEMBAUM, 2004).

A distribuição da musculatura lisa da cápsula do baço foi descrita em diversos trabalhos. Assim, foi possível observar uma importante variação na extensão e espessura deste tecido nas diferentes espécies: em cachorros e gatos, por exemplo, essa camada é abundante, enquanto que em humanos e coelhos é escassa. A densidade e a presença da musculatura lisa da cápsula, além do número de trabéculas presente no baço é um indicativo da função de reserva do órgão em diversas espécies (DAVIES, 1973).

2. Desenvolvimento

2.1. Objetivo

O presente estudo visa identificar as alterações histomorfológicas na cápsula esplênica de animais submetidos ao extrato etanólico de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* e exposição ao 4-NQO, através da identificação da presença de colágeno e tecido muscular pela coloração de Tricrômico de Masson.

Este projeto faz parte de um trabalho com um objetivo mais amplo que visa avaliar os parâmetros fisiológicos, bioquímicos, histológicos e moleculares de

animais tratados com o extrato etanólico de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* e 4-NQO.

2.2. Metodologia

2.2.1. Ensaios *in vivo*

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal local e realizado de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) através do protocolo de número 46/2014.

Foram utilizados 42 ratos gênero *Wistar*, machos, com 4 semanas de idade e peso entre 50 e 75 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus de Botucatu. Os animais foram divididos aleatoriamente em 7 grupos, contendo 6 animais cada e foram mantidos em caixas plásticas sob temperatura controlada, com ciclo de luz de 12 horas, alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

2.2.2. Desenho experimental

Após período de adaptação, os animais foram submetidos à indução da carcinogênese pela exposição diária ao 4-NQO (25ppm) em sua água de beber por 8 semanas, tempo definido para que haja o desenvolvimento clínico de lesões pré – malignas e malignas na língua dos animais.

Após o período de indução, seletivamente através dos valores de peso corporal mais semelhantes possíveis entre si, os animais foram distribuídos conforme os grupos que seguem:

- G1 (controle 4-NQO): exposto ao 4-NQO por 8 semanas, sem tratamento posterior.
- G2 (controle de veículo): expostos ao 4-NQO pelo período de 8 semanas, tratados posteriormente com DMSO (v/v), via intraperitoneal;
- G3 (controle normal): não tratado e não exposto com 4-NQO;

- G4 (controle EBC100):controle de Rs.EE (controle EBC),tratado com extrato etanólico de Rs.EE 100mg/kg de peso corporal, durante 8 semanas, via intraperitoneal;
- G5 (EBC 100):exposto ao 4-NQO por 8 semanas e tratado com extrato etanólico de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (Rs.EE) 100mg/kg (EBC 100) de peso corporal, durante 8 semanas, via intraperitoneal;
- G6 (EBC 10):exposto ao 4-NQO por 8 semanas e tratado com extrato etanólico de Rs.EE 10mg/kg (EBC 10) de peso corporal, durante 8 semanas, via intraperitoneal;
- G7 (EBC 1): exposto ao 4-NQO por 8 semanas e tratado com extrato etanólico de Rs.EE 1 mg/kg (EBC 1) de peso corporal, durante 8 semanas, via intraperitoneal.

2.2.3. Coleta de órgãos e processamento histopatológico

Os animais foram tratados por um período total de 16 semanas (exposição ao carcinógeno por 8 semanas, seguidas de tratamento específico por mais 8 semanas) antes de serem sacrificados por decaptação para remoção do baço.

Os órgãos foram armazenados em solução de formaldeído 10% tamponado com tampão fosfato durante 24 horas antes de serem processados histologicamente. Após este período, foram acondicionados em álcool 70% até o processamento histológico realizado conforme descrito:

- I. 1 hora em álcool 90° GL;
- II. 5 trocas sucessivas em frascos com álcool absoluto, com intervalos de 30 minutos entre cada uma;
- III. 30 minutos em solução (1:1) de álcool absoluto e solvente xilol;
- IV. 30 minutos em solução de xilol puro;
- V. 1 hora em outra solução de xilol puro;
- VI. 1 hora em parafina líquida em estufa a 61°C;
- VII. 2 horas em nova parafina líquida em estufa a 61°C;
- VIII. Confecção de blocos em inclusora padrão com uso de parafina líquida, formas metálicas e placa aquecida.

2.2.4. Cortes e Coloração Histopatológica

Após completa adesão dos órgãos aos blocos de parafina, cortes histológicos seriados de 5 µm de espessura foram extraídos em micrótomo semi-automático e então, submetidos à solução de etanol 10° GL e posteriormente, água aquecida à 42°C. Os cortes foram colocados em lâminas de vidro lapidadas e submetidos ao calor em estufa 60°C±1°C para que aderissem às lâminas.

Na seqüência foi realizada a coloração histológica por procedimento com tricrômico de Masson, onde utilizou – se: solução de Bouin (solução saturada de ácido pícrico 75 mL, formaldeído 25 mL e ácido acético glacial 5 mL), hematoxilina férrica de Weigert A (hematoxilina em pó 1g e álcool 95% 100 mL), hematoxilina férrica de Weigert B (solução aquosa de cloreto férrico a 29% 4 mL, água destilada 95 mL e ácido clorídrico concentrado 1 mL), solução de Escarlata de Biebrich (solução aquosa de Escarlata de Biebrich 1% 90 mL, solução aquosa de fucsina ácida 1% 1mL e ácido acético glacial 1 mL), solução ácida fosfotúngstica-fosfomolibdica (ácido fosfotúngstico 2,5g, ácido fosfomolibdico 2,5g e água destilada 100 mL), solução de azul de anilina (azul de anilina 2,5g, ácido acético glacial 2 mL e água destilada 100 mL) e solução de água ácida (água destilada 100 mL e ácido acético glacial 1 mL). O procedimento foi então realizado conforme segue:

- I. Desparafinar e hidratar;
- II. Lavar em água corrente por 5 minutos;
- III. Mordentar em solução de Bouin por 1 hora na estufa a 60°C;
- IV. Lavar em água corente até desaparecimento da coloração amarela deixada pela solução de Bouin;
- V. Passar em água destilada;
- VI. Corar pela solução de hematoxilina férrica de Weigert (A e B) por 10 minutos;
- VII. Passar em água corrente por 10 minutos;
- VIII. Passar em água destilada;
- IX. Corar pela solução de Escarlata de Biebrich por 5 minutos;
- X. Passar por água destilada;
- XI. Diferenciar pela solução de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico durante 10 a 15 minutos;
- XII. Passar por água destilada;

- XIII. Corar pela solução de azul de anilina durante 5 a 10 minutos;
- XIV. Passar por água destilada;
- XV. Passar pela solução de ácido acético glacial 1% de 3 a 5 minutos;
- XVI. Passar por água destilada;
- XVII. Desidratar, diafanizar e montar em Permount.

2.3. Métodos de Análise

Foram realizadas fotografias em dez campos de corte histológico obtido dos baços dos animais e corados com Tricrômico de Masson ao longo das cápsulas, no aumento de 20x em foto microscópio óptico (Leica DM 2500).

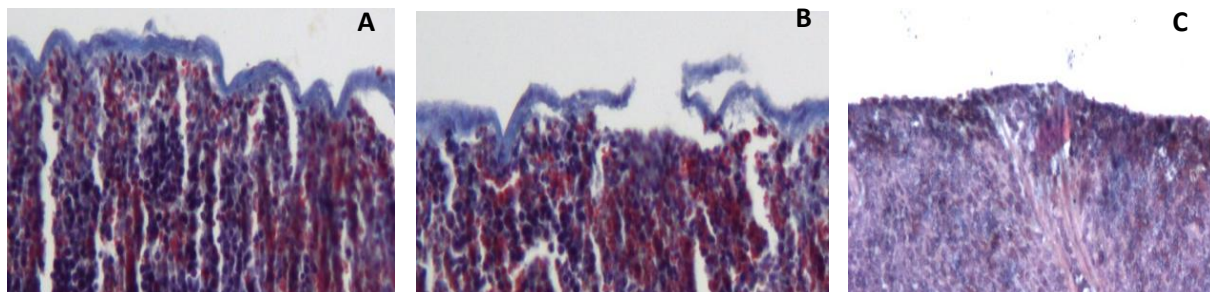
A espessura da cápsula do baço e sua respectiva região, colágena ou de musculatura lisa, foi medida pelo software IMAGE J[®], com medição de 6 regiões distintas em cada fotografia, sendo 3 regiões distintas para cada tecido (colágeno ou musculo liso), como demonstrado na Figura 2.

Posteriormente, realizou – se análise estatística dos dados pelo software PRISM[®]. As análises foram realizadas com ANOVA, teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Os resultados foram apresentados em médias e desvio padrão.

3. Resultados

Na análise histopatológica constatou – se que, assim como no estudo prévio, houve perda de integridade das cápsulas. No presente estudo, esta perda de continuidade foi descrita numericamente como “zero” para colágeno e/ou músculo liso (FIGURA 3).

Figura 3 - Fotografias obtidas no aumento de 20x, demonstrando a integridade de cápsula.



Em A, cápsula íntegra de animal pertencente à G6. Em B, cápsula parcialmente rompida, em animal também pertencente à G6 e, em C, cápsula rompida (ausente) em animal pertencente à G7.

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

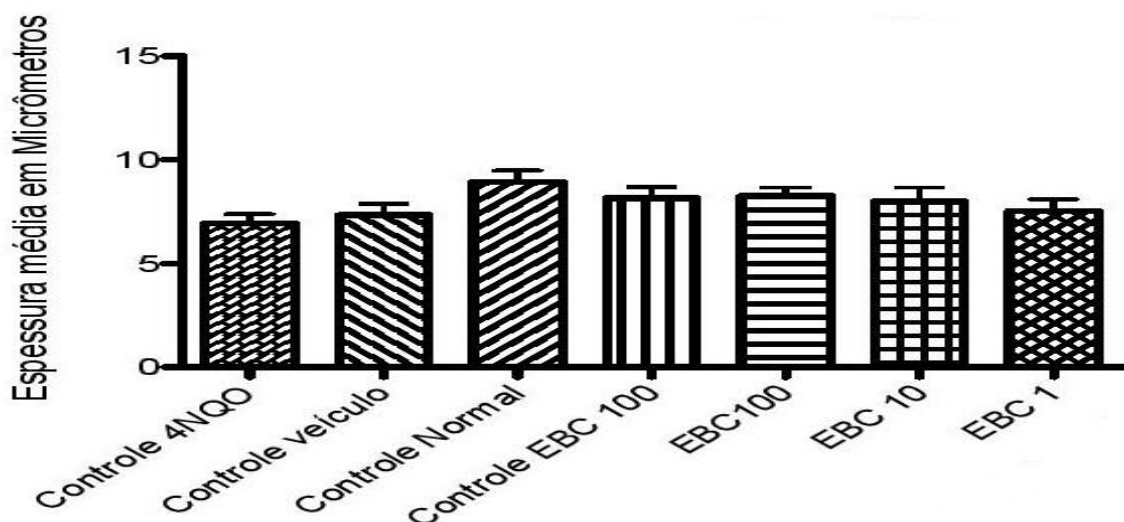
No estudo prévio, não foram observadas alterações na integridade das cápsulas nos grupos de controle de veículo do tratamento, controle normal e controle EBC. No entanto, essas alterações foram percebidas em maior incidência nos animais tratados com 4-NQO e, posteriormente, EBC 1, 10 e 100 e, em menor incidência, nos animais tratados apenas com 4-NQO.

Neste estudo, os resultados obtidos pela análise das cápsulas dos baços dos 7 grupos de animais são representados nos gráficos 1, 2 e 3.

Como descrito anteriormente, as medidas de espessura do colágeno e músculo liso foram realizadas em três pontos da fotografia. Primeiramente, estas medidas foram obtidas para cada parâmetro separadamente e, depois, realizou-se a soma dos dois resultados para atingir a espessura média da cápsula total.

Os resultados obtidos pelas medidas de espessura do colágeno contido nas cápsulas demonstrou que este componente não foi afetado pelos tratamentos que os animais foram submetidos, uma vez que não observamos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. As espessuras de colágeno ficaram entre 6,9 e 8,9µm. No entanto, é importante notar que o controle normal apresentou maior espessura médiacolágena de cápsula (8,9 µm), enquanto que o grupo controle de 4-NQO demonstrou a menor espessura média (6,9 µm) (GRÁFICO 1, ANEXO 1).

Gráfico 1 - Espessura média em micrômetros (μm) da medida de colágeno nas cápsulas dos baços dos animais tratados com EBC após indução com 4-NQO.



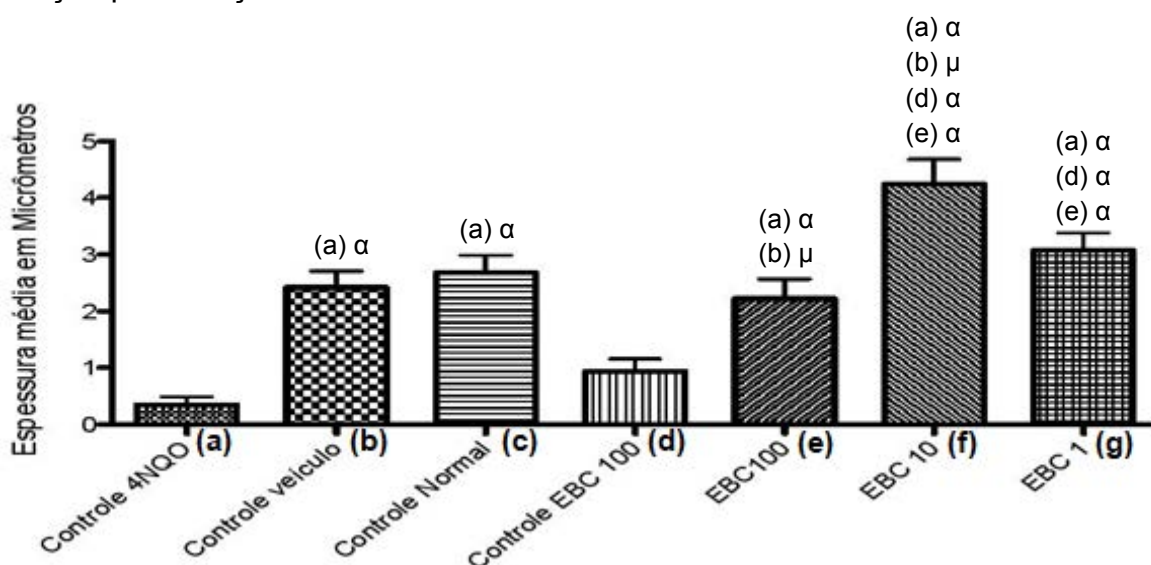
Com relação músculo liso, seu resultados são representados no gráfico 2. Foi demonstrado que houve alteração nas medidas de acordo com o tratamento recebido pelo grupo. Observou-se que o grupo controle de 4-NQO apresentou menor espessura de músculo liso, sendo de fato, o único com espessura média menor de $1\mu\text{m}$ (ANEXO 1), com diferença significantes quanto comparado aos valores de controle normal, veículo e EBC 10.

De maneira interessante, o grupo exposto ao 4-NQO e tratado com EBC 10 demonstrou completa inversão dessa condição com espessura média de músculo liso que superou os $4\mu\text{m}$ e os valores obtidos no controle normal (ANEXO 1). O mesmo foi observado nos grupos expostos ao 4-NQO e, posteriormente, ao EBC 1 e EBC 100, que retornaram aos níveis normais de músculo liso.

É importante relatar que o grupo exposto ao 4-NQO e, posteriormente ao veículo utilizado para diluir o EBC, também demonstrou redução do efeito atrófico demonstrado pelo 4-NQO, no entanto, este grupo demonstrou menor espessura de músculo liso que o grupo tratado com EBC 10, o que sucinta um efeito específico do EBC sobre a musculatura lisa contida na cápsula. Outro ponto relevante é que, embora a espessura do músculo liso tenha sido diferente no grupo controle EBC 100 e EBC 100, esta diferença não foi significativa.

Além disso, foi possível observar diferença estatística entre os animais tratados com as diferentes concentrações de EBC, de maneira que EBC 100 quando comparado a EBC 10 gerou $p < 0,001$ e comparado ao EBC 1, $p < 0,01$. Assim, conclui-se que a espessura de músculo liso é afetada pela concentração a qual o animal é submetido em seu tratamento.

Gráfico 2 - Medida em micrômetros da espessura de músculo liso da cápsula do baço após indução com 4-NQO.

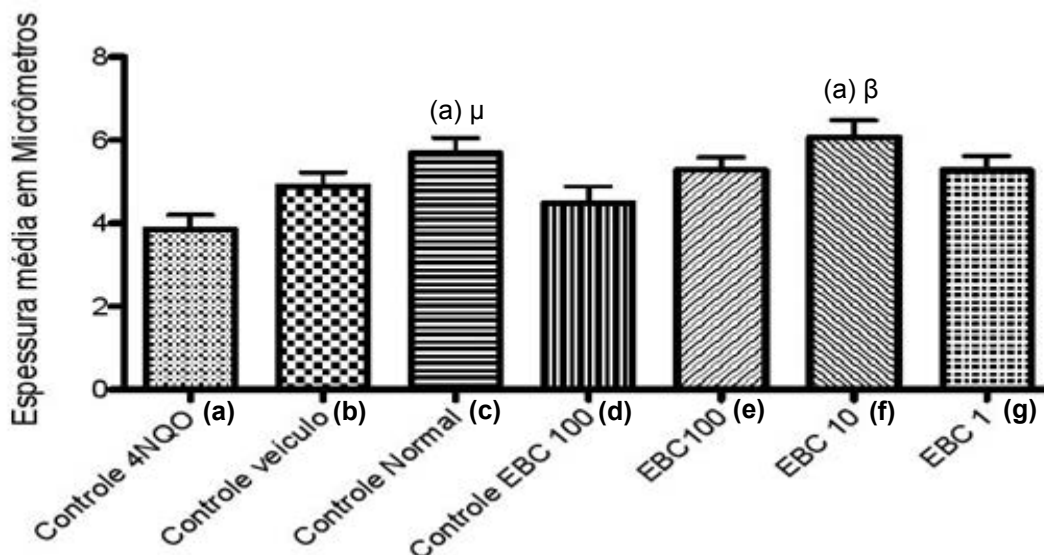


Valores de p representados por: $\alpha = p < 0,001$, $\beta = p < 0,01$ e $\mu = p < 0,05$.

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A soma das medidas de colágeno e músculo liso gerou a espessura total da cápsula. A análise dos resultados demonstrou que o controle de 4-NQO teve, mais uma vez, a menor espessura total. Observamos diferenças estatísticas entre os seguintes grupos: controle de 4-NQO e o EBC 10 ($p < 0,01$) e entre o controle de 4-NQO e o controle normal ($p < 0,05$), de modo que os animais tratados com EBC e expostos ao 4-NQO apresentaram cápsulas de espessura similar ao controle normal (GRÁFICO 3).

Gráfico 3 - Medida em micrômetros da espessura total da cápsula do baço após indução com 4-NQO.



Valores de p representados por: $\beta = p < 0,01$ e $\mu = p < 0,05$.

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

4. Discussão

As análises, qualitativa e quantitativa, das cápsulas dos baços expostos ao 4-NQO e a diferentes concentrações de EBC realizada nesse estudo permitiram detalhar os resultados obtidos nas análises anteriores realizadas em hematoxilina - eosina.

Quando há a indução da carcinogênese e, então, o tratamento com EBC, a espessura de cápsula total destes animais se iguala ou supera os parâmetros do controle normal. Além disso, demonstramos que o colágeno não apresentou modificações significantes e que as alterações de espessura da cápsula decorrem de variações da espessura de músculo liso nos animais submetidos à carcinogênese e tratados com EBC (G5, G6 e G7). Além disso, comparando nossos resultados com os obtidos anteriormente nas análises em hematoxilina - eosina do mesmo experimento, observamos que os animais tratados com EBC 10 (G6) foram os que apresentaram maior perda na integridade da cápsula. Interessantemente, esse mesmo grupo demonstrou maior quantidade de músculo liso na presente análise.

De fato, o tecido é altamente sensível às condições mecânicas impostas, sendo suscetível a neurotransmissores, substâncias liberadas localmente e hormônios, além de ser espontaneamente ativo, respondendo diretamente a mudanças de temperaturas e outros fatores físicos, que acabam por alterar o desenvolvimento do tecido muscular (GABELLA, 1990).

Pudemos observar que a camada muscular lisa da cápsula dos baços demonstrou-se fortemente susceptível ao 4-NQO. Segundo Barcessat et al. (2014), estudando o efeito tóxico sistêmico do 4-NQO na indução de câncer bucal, observaram alteração significativa na relação polpa vermelha/branca dos baços dos animais, e consideraram que ocorreu modificação no padrão imunológico e de células brancas circulantes. Os mesmos autores verificaram que ocorreu alteração esplênica motivada por citocinas liberadas pelas células tumorais que também afetou o sistema imune dos animais, mas não conseguiram distinguir quais efeitos foram produzidos pelas citocinas provenientes das células tumorais e quais foram produzidos pelo 4-NQO. Observamos que o grande intervalo entre o sacrifício e a última exposição ao 4-NQO (oito semanas), permite supor que os efeitos observados poderiam ser relacionados às células tumorais.

Por outro lado, o tratamento com diferentes concentrações de EBC, propiciou o retorno espessura da cápsula esplênica. Do mesmo modo, nossos dados sugerem que o extrato de EBC foi capaz de estimular, direta ou indiretamente, o aumento da produção de músculo liso. De outro modo, parece que ocorreu a diminuição da produção de fibras colágenas, levando a uma maior fragilidade (aumento da perda de continuidade capsular) durante o processamento esplênico, uma vez que não observamos rompimento clínico do baço nos animais.

Considerando que a produção de músculo liso é fortemente influenciada pela produção de citocinas pró-inflamatórias e de reparo de tecido, podemos aventar a possibilidade de alteração de concentrações de citocinas, como foi observado por Barcessat et. al. (2014).

De outro modo, também verificamos que a maior concentração de EBC 100 (G4 e G5), também propiciou a atrofia da cápsula, indicando efeito anti-inflamatório intrínseco em maiores concentrações de EBC.

Ademais, embora o tecido colágeno tenha se demonstrado em mesma espessura através do Tricrômico de Masson, estudos demonstram que o tipo de colágeno pode ser variável de acordo com as circunstâncias que o organismo é

submetido, podendo o tipo predominante ser mais frágil ou não ao corte histológico. De fato, a quantidade de colágeno pode variar de acordo, por exemplo, com a idade do indivíduo. Rodrigues (1999), ao analisar, qualitativamente, a cápsula esplênica em humanos verificou que a quantidade de colágeno e fibras elásticas variou conforme a idade, com maior quantidade de colágeno em idosos em relação a crianças.

De outro modo, quando organismos são submetidos a condições patológicas, ocorrem mudanças no perfil característico de colágeno e, estas modificações podem sugerir informações diagnósticas como quando, por exemplo, é avaliado o efeito terapêutico de determinada fármaco, aparato médico ou propriedades regenerativas de determinado medicamento através da observação da formação de novos colágenos, qualitativa e quantitativamente. Em processos de cicatrização, colágeno tipo III é primeiramente expresso, para progressivamente ser substituído por tipo I de colágeno, sendo que em situações patológicas, a expressão de colágeno pode sofrer atrasos, ser anormalmente intensa ou ter essa proporção de colágeno tipo I para III abaixo do normal, o que torna o tecido mais imaturo e frágil, mais propenso a degradação por proteases (ALVES, 2015). Liakka (1990), demonstrou que o colágeno presente na cápsula esplênica foi do tipo III e IV. No entanto, observou – se neste trabalho que as alterações histopatológicas foram verificadas em músculo liso e não na quantidade de colágeno da cápsula.

5. Conclusão

A análise histomorfológica da cápsula de animais submetidos à indução com 4-NQO e ao tratamento com extrato etanólico de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (EBC) através da coloração de tricrômico de Masson nos permitiu concluir que o 4-NQO apresentou efeito atrófico sobre o músculo liso. Por outro lado, o EBC 10 demonstrou capacidade de reverter essa atrofia. Os animais previamente expostos ao 4-NQO e, posteriormente, tratados com EBC 1 e EBC 100 apresentaram espessuras semelhantes às encontradas nos grupos controles negativos. Ademais, os animais previamente expostos ao 4-NQO e tratados com EBC 10 demonstraram aumento da camada muscular lisa.

6. Referências Bibliográficas

ALVES, A. et al.; **Computerized histomorphometric study of the splenic collagen polymorphism: A control-tissue for polarization microscopy.** Microscopy Research and Technique, 78: 900-907, 2015.

APPLEGATE, E.; **Anatomia e fisiologia.** Elsevier, Rio de Janeiro, 472p., 2012.

BARCESSAT, A.R.R. et al.; **Systemic toxic effects during early phases os topical 4-NQO-induced oral carcinogenesis.** Oral Pathology & Medicine, 43: 770 – 777, 2014.

BIAZEVIC, M.G.H. et al.; **Tendência de mortalidade por câncer de boca e orofaringe no Município de São Paulo, Brasil, 1980/2002.** Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 22(10): 2105 – 2114, outubro 2006.

CESTA, M.F.; **Normal structure, function, and histology of the spleen.** Toxicology Pathology, 34: 455-465, 2006.

CORRÊA, P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. 1926, v. 1-6.

DAVIES, B.N & WITHRINGTON, P.G.; **The actions of drugs on the smooth muscle of the capsule and blood vessels of the spleen.** Pharmacological Reviews, 25.3: 373-413, 1973.

DESHMUKH, N.S. et al.; **Enigmatic insight into collagen.** Journal of Oral and Maxillofacial Pathology, 20: 276-283, 2016.

DUARTE, M.R. et al.; **Diagnose anatômica foliar e caulinar de Fruto-de-Pombo: *Rhamnus sphaerosperma* Sw. var. *pubescens* (Reissek) M.C. Johnst.** Cadernos da Escola de Saúde, Unibrasil, 1: 1-10, Julho 2008.

GABELLA, G.; **Hypertrophy of visceral smooth muscle**. Anatomy and Embryology, 182: 409-424, 1990.

GOLDNER, J.; **A modification of the Masson trichrome technique for routine laboratory purposes**. The American Journal of Pathology, 14.2? 237-243, 1937.

HENRIQUES, A.C.G. et al.; **Análise morfológica da mucosa oral de ratos submetida à carcinogênese experimental pelo óxido de nitroquinolina (4NQO)**. Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, 11.1: 13-20, 2011.

INCA, Instituto Nacional de Câncer “José Alencar Gomes da Silva”. **Câncer de Boca**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/boca/regioes_anatomicas_e_prognosticos>. Acesso em: 09 de outubro de 2017.

ISHIDA, K. et al.; **Current mouse models of oral squamous cell carcinoma: Genetic and chemically induced models**. Oral Oncology, 73: 16-20, 2017.

JONES, L.M.; **Mastering the trichrome stain**. Connection [Internet], 79-84, 2010.

KAI, T. et al.; **Fiber arrangement of the rat ssplenic capsule with special reference to elastic fibers**. Okajimas Folia Anat. Jpn, 77(5): 167-180, December 2000.

KANOJIA, D. et al.; **4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis**. Oral oncology, 42.7: 655-667, 2005.

KIERSZENBAUM, A.L.; **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. Elsevier, Rio de Janeiro, 678p., 2004.

LIAKKA, A. et al.; **Distribution of laminin and types IV and III collagen in fetal, infant and adult human spleens**. Cell and Tissue Research, 263: 245-252, 1991.

Lima, R.B. 2015. Rhamnaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB207>>. Acesso em: outubro/2017.

MARYMONT, J.H. et al.; **Patterns of metastatic cancer in the spleen.** The American journal of clinical pathology, 40.1: 58-66, 1963.

MEBIUS, R.E.& KRAAL, G.; **Structure and function of the spleen.** Nature reviews immunology, 5.8: 606-616, 2005.

MOREIRA, T.F.; **Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (Reissek) M.C. Johnst. (Rhamnaceae).** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

NAGPAL, J.K. et al.; **Oral câncer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management.** Oral Oncology, 39: 213-221, 2003.

NUNOSHIBA, T. et al.; **Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-Nitroquinoline-*N*-oxide.** Cancer Research, 53: 3250 -3252, 1993.

RHEE, S. & GRINNELL, F.; **Fibroblast mechanics in 3D collagen matrices.** Advanced Drug Delivery Reviews, 59: 1299-1305, 2007.

RICARD-BLUM, S.; **The collagen family.** Cold Spring Harb Perspectives in Biology, 3.1: a004978, 2011.

RODRIGUES, C.J. et al.; **Age-related changes in the elastic fiber network of the human splenic capsule.** Lymphology Journal, 32: 64-69, 1999.

VERED, M. et al. **4-NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations.** Oral oncology, 41.4: 337-339, 2005.

TSANTOULIS, P.K. et al.; **Advances in the biology of oral câncer**. Oral Oncology, 43: 523-534, 2007.

7. Anexos

7.1. Anexo 1

Tabela 1 - Valores médios de espessura de cada parâmetro analisado em cada grupo de animais (μm)

	Controle 4NQO	Controle veículo	Controle Normal	Controle EBC 100	EBC100	EBC 10	EBC 1
Colágeno	6,945	7,35	8,924	8,157	8,272	7,999	7,529
Músculo Liso	0,3463	2,421	2,673	0,9402	2,222	4,236	3,074
Capsula Total	3,853	4,892	5,677	4,487	5,28	6,056	5,271

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.