

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Avaliação histopatológica utilizando PAS para análise de alterações hepáticas
em ratos tratados com 4-NQO.**

Camila Leal dos Santos

Araraquara

2015

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Camila Leal dos Santos

**Avaliação histopatológica utilizando PAS para análise de alterações hepáticas
em ratos tratados com 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, para obtenção do
grau de Farmacêutico-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade

Araraquara
2015

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Paulo e Vânia, pois sem o apoio durante todos os anos de faculdade, talvez não tivesse conseguido chegar aonde cheguei. Muito obrigada por terem me mostrado o caminho da luta e perseverança, e feito com que eu me esforçasse para ser mais um motivo de orgulho para a família.

Agradecimentos

Aos meus pais, Paulo e Vânia, por sempre estarem ao meu lado, principalmente durante esses 6 anos de faculdade, tanto nos momentos bons, quanto ruins, me levando sempre a ter coragem para seguir em frente.

Ao meu irmão, Arthur, por ser um orgulho imenso e exemplo de companheirismo.

A minha tia Ione, por ser sempre atenciosa e estar ao meu lado.

Aos meus avós, por serem um grande exemplo de força e determinação.

Ao meu orientador Cleverton, pelo conhecimento, pela orientação, pela prontidão em ajudar com qualquer questão, pela amizade, pela paz de espírito transmitida, e principalmente, pelo bom astral de sempre, mostrando que mesmo nos dias de chuva, sempre há esperanças de um mundo melhor.

A Thaís e Juliana, por terem iniciado um trabalho significativo, que tive oportunidade de participar.

Ao Leandro e Cláudia, pelo auxílio nas atividades no laboratório de Histopatologia.

As minhas irmãs de Araraquara, Helena, Gisele e Laura, por me ensinarem que um bom ambiente dentro de casa é fundamental para a felicidade. Sem vocês, meu último ano de faculdade não teria sido tão especial.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Lista de Figuras

Figura 1: Modelo esquemático do fígado.	13
Figura 2: Fotografia original (40x, PAS)	22
Figura 3: Fotografia tratada com Autocontraste (40x, PAS)	22
Figura 4: Fígado dos diferentes grupos de animais, indicando a região do espaço-porta (zona 1) e centro-lobular (zona 3).	26

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Resultados das análises da região do espaço-porta (zona 1) nos diferentes grupos.	26
Gráfico 2: Resultados das análises da região centro-lobular (zona 3) nos diferentes grupos.	27
Gráfico 3: Resultados das análises do fígado nos diferentes grupos, com células contendo >50% de glicogênio.	28
Gráfico 4: Resultados das análises do fígado nos diferentes grupos, com células contendo <50% de glicogênio.	29
Gráfico 5: Quantidade total de glicogênio presente no fígado nos diferentes grupos. ..	29
Gráfico 6: Resultados das análises do fígado nos diferentes grupos, de acordo com o teste de contingência de Fischer.	30

Lista de abreviaturas e siglas

4-NQO:	Óxido de 4-nitroquinolina
4-HAQO:	4-hidroxiaminoquinolona-N-óxido
DMSO:	Dimetilsulfóxido
EBC:	Extrato bruto do caule
HPA:	Hidrocarboneto policíclico aromático
PAS:	Ácido periódico de Shiff

Índice

1. Introdução	9
1.1. Câncer bucal	9
1.2. Óxido de 4-nitroquinolina	10
1.3. Fígado	12
1.4. <i>Rhamnus sphaerosperma</i> var. <i>pubescens</i>	14
1.5. Glicogênio	15
1.6. Ácido periódico de Schiff (PAS)	16
2. Desenvolvimento	18
2.1. Objetivo	18
2.2. Metodologia	18
2.2.1. Ensaios <i>in vivo</i>	18
2.2.2. Desenho experimental	19
2.2.3. Coleta de órgãos e processamento histopatológico	19
2.2.4. Cortes e coloração histológica	20
2.3. Método de análise	21
3. Resultados	24
3.1. Resultados	24
4. Discussão	31
5. Conclusão	35
6. Referências bibliográficas	36

Resumo

O fígado é a maior glândula e o segundo maior órgão do corpo, podendo ser dividido em zona 1, próxima à região do espaço porta, zona 2 ou intermediária, e zona 3, próxima da veia centro-lobular. A zona 1 é responsável pela gliconeogênese, enquanto a zona 3 é responsável pela detoxicação. O óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO) é um agente carcinogênico sintético capaz de aumentar o risco individual ao desenvolvimento de neoplasia maligna na língua de ratos, e sua biotransformação 4-HAQO ocorre no compartimento hepático. Neste estudo, 5 grupos de 8 ratos cada, foram submetidos à administração oral de 4-NQO na concentração de 25 ppm (massa solvente/massa soluto) através da água de beber, com a finalidade de identificar a ocorrência de alterações metabólicas hepáticas devido ao acúmulo de glicogênio nos hepatócitos dos animais, analisado pela coloração de ácido periódico de Shiff (PAS). O glicogênio é o principal polissacarídeo de reserva energética dos animais, e é fundamental para manter a homeostase do organismo, sendo seu acúmulo nos hepatócitos uma resposta fisiológica normal após a ingestão de alimentos, ou ainda, pode devido a perturbações metabólicas provocadas por tratamentos que os animais foram expostos. Neste estudo, o fígado dos animais dos diferentes grupos analisados demonstraram níveis distintos de marcação para glicogênio, mas não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, podendo considerar que os animais foram pouco ou não foram afetados pela exposição às diferentes substâncias estudadas no projeto e que não foram tóxicas aos animais, havendo apenas um ligeiro aumento nos níveis de glicogênio hepático geral.

Palavras chaves: 4-NQO; glicogênio; fígado; PAS.

1. Introdução

1.1. Câncer bucal

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo quando as células cancerosas atingem a corrente sanguínea ou os vasos linfáticos do organismo. Pelo fato dessas células se dividirem rapidamente, haverá formação de tumores, ou seja, o acúmulo de células cancerosas em determinada região que irão substituir o tecido normal (INCA, 2015). A carcinogênese é um processo de vários passos que ocorre devido a uma acumulação progressiva de alterações genéticas, levando as células a um fenótipo oncogênico (MENDONÇA, 2012). A carcinogênese oral em tecidos de revestimento consiste no desenvolvimento de uma neoplasia maligna que evolui em múltiplas etapas, incluindo hiperqueratose, hiperplasia, displasias de diversos graus, carcinoma no local e o surgimento do carcinoma espinocelular (HENRIQUES, 2011).

Câncer de boca refere-se a uma categoria de neoplasias com diferentes etiologias e perfis histológicos, embora na maioria das vezes, refere-se ao carcinoma epidermóide de boca, incluindo os cânceres de lábio e da cavidade oral, como mucosa bucal, gengivas, palato duro, língua oral e assoalho da boca (INCA, 2015). Apresenta etiologia multifatorial, integrando fatores endógenos, como a predisposição genética e fatores exógenos ambientais, além de comportamentais, cuja integração pode resultar a manifestação do agravo. A doença afeta principalmente as pessoas com mais de 45 anos de idade e, internacionalmente, há muita variação inter e intra-regional de

incidência (BIAZEVIC, 2006). O carcinoma epidermóide oral é derivado de células epiteliais de revestimento da mucosa oral, também conhecido como carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular, sendo caracterizado, portanto, por neoplasias epiteliais invasivas que apresentam variado grau de diferenciação escamosa e propensão de emitir metástases para os nódulos linfáticos (FRANÇA, 2009).

A incidência de câncer oral e as taxas de mortalidade variam amplamente por região geográfica, sendo que as taxas mais altas são registradas em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Em 2010, no Brasil, o câncer oral provocou cerca de 5 mil mortes (INCA, 2015). Atualmente, cerca de 30% da distribuição de novos casos de cânceres orais ocorrem nas capitais, sendo que São Paulo e Porto Alegre registram as taxas mais altas (FRANÇA, 2009). Dessa maneira, esse tipo de câncer é considerado um problema de saúde pública, devendo ser estudado a fim de buscar novos tipos de tratamento que possam ter ação eficaz contra esse tipo de tumor.

1.2. Óxido de 4-nitroquinolina

O óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO) pertence à classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e é um agente carcinogênico químico capaz de aumentar o risco individual ao desenvolvimento de neoplasia maligna em ratos (VISWANADHA, 2011). Atualmente, acredita-se que seja o melhor carcinógeno químico disponível para a produção de tumores orais em ratos, visto que as alterações histológicas e moleculares são similares às aquelas que ocorrem nos humanos (HENRIQUES, 2011).

O 4-NQO é uma quinolina, ou seja, um composto orgânico derivado de hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) e solúvel em água, sendo, portanto, capaz

de induzir lesões na cavidade oral dos animais tratados com tal composto. Os efeitos carcinogênicos do 4-NQO ocorrem devido à redução enzimática do grupo nitro presente em um dos anéis aromáticos, formando-se o composto 4-hidroxi-aminoquinolona-N-óxido (4-HAQO), que interage com resíduos de guanina do DNA, havendo a substituição por uma pirimidina e causando danos no material genético (FARIA, 2006), sendo, portanto, considerado mutagênico e genotóxico (VISWANADHA, 2011).

A metabolização do 4-NQO ocorre através do receptor aril hidrocarboneto do sistema enzimático no compartimento hepático, que é responsável pela primeira etapa do metabolismo dos HPA.

Estudos mostraram que houve aumento significativo na hepatotoxicidade induzida e toxicidade renal em ratos tratados com 4-NQO quando comparados com o grupo controle sem tratamento (VISWANADHA, 2011). O mecanismo de resposta individual aos carcinógenos está possivelmente vinculado às diferenças nas atividades enzimáticas dos órgãos-alvo e nas diferenças entre as substâncias tumorigênicas, sendo que as isoformas enzimáticas hepáticas do citocromo P-450 que participam do metabolismo dos HPA, são a CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 e CYP3A4 (MAINENTI, 2009).

O carcinoma espinocelular desenvolvido na língua de ratos após o tratamento com 4-NQO produz alterações histopatológicas no epitélio lingual, como hiperplasia, atipia leve, moderada e severa, até a formação do carcinoma invasivo. A primeira alteração histológica ocorre em torno de 8 semanas, antes do aparecimento das alterações clínicas, e até 4 semanas de tratamento, nenhuma alteração fenotípica é observada (HENRIQUES, 2011).

Neste estudo, os animais foram submetidos à indução de carcinogênese oral através da administração do 4-NQO, via oral, com o intuito de desenvolver lesões orais semelhantes às que ocorrem em seres humanos.

1.3. Fígado

O fígado é a maior glândula e o segundo maior órgão do corpo, responsável pelo metabolismo de substâncias endógenas e exógenas, além da reserva de glicogênio dentro dos hepatócitos. É, também, responsável por manter as funções fisiológicas e de homeostase do organismo, fazendo ainda parte de um sistema capaz de responder prontamente a uma variedade de estímulos (KIERSZENBAUM, 2004).

Sua morfologia consiste em quatro lobos pouco definidos e recebe fluxo sanguíneo de dois vasos sanguíneos: veia porta e artéria hepática, que se misturam nos sinusóides dos lóbulos hepáticos e convergem para a veia central, coletando o sangue do sinusóide. Os ramos da artéria hepática e da veia porta, juntamente com o ducto bilífero interlobares, formam a tríade portal clássica, encontrada no espaço porta ao redor do lóbulo hepático com formato hexagonal (KIERSZEMBAUM, 2004), cada qual com sua veia centro-lobular, delimitados nos ângulos pelos espaços porta, que é constituído de uma veia, uma artéria, um ducto biliar e um vaso linfático (SANTOS, 2013), conforme mostra Figura 1.

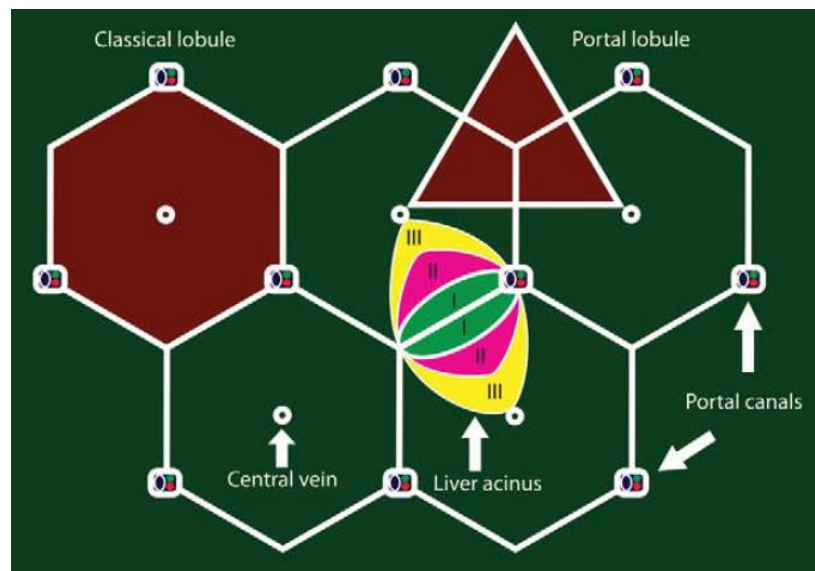


Figura 1: Modelo esquemático do fígado.

Esta região pode ser dividida em zona 1 ou periportal, zona 2 ou mediolobular e zona 3 ou centrilobular. A zona 1 fica localizada próxima à região do espaço porta e é responsável pela função oxidativa do fígado, como a glicólise, enquanto que a zona 3, localizada nas proximidades da veia centro-lobular, é responsável pela detoxicação, envolvendo a ação do citocromo P-450. Já a zona 2 fica localizada entre a zona 1 e 3 (THOOLEN, 2010).

As funções hepáticas são diversas e complexas, incluindo a atividade endócrina e exócrina, metabolização, conjugação e detoxicação. Uma das principais funções hepáticas inclui a biotransformação de xenobióticos, que leva à desintoxicação de materiais absorvidos no trato gastrointestinal. O metabolismo dos xenobióticos pelos hepatócitos pode ocorrer nas reações de fase I ou fase II (THOOLEN, 2010).

Estudos mostram que certos processos, como deficiência proteica, intoxicação, envenenamento, micotoxicoses, entre outros, podem promover graves alterações hepáticas quanto ao tamanho, cor, forma e textura (HIPOLITO, 2004). Além disso, o

fígado é o principal órgão alvo na avaliação da segurança de toxicidade pré-clínica e estudos de oncogenicidade com roedores (THOOLEN, 2010).

Em um estudo realizado com peixes, Wolf (2005) verificou que uma resposta normal dos fígados expostos à toxinas é a perda de glicogênio hepático, que ocorre devido ao efeito direto da intoxicação, ou então, pode ocorrer devido a efeitos secundários da toxina no organismo, resultando em inanição, estresse ou doenças concomitantes. Contudo, a toxicidade hepática em peixes tende a ser menos severa do que em mamíferos, além de que os peixes não possuem uma resposta padrão à intoxicação hepática.

1.4. *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*

Os vegetais são vastamente utilizados para o tratamento e/ou cura de doenças. Entre as milhares de espécies com alguma propriedade medicinal, estão as da família Rhamnaceae A. L. Jussieu, compreendendo cerca de 50 gêneros e 900 espécies de distribuição cosmopolita. As espécies desta família estão presentes em países com clima temperado e subtropical, e no Brasil, ocorrem naturalmente apenas 13 gêneros na flora nativa, sendo que a espécie *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* apresenta um grande potencial químico e farmacológico, sendo popularmente conhecida como Cangica, Português, Sudeste e/ou Fruto-de-pombo. Entre os principais componentes químicos encontrados no *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*, estão os derivados antraquinônicos, cujas principais propriedades biológicas e farmacológicas são ação protetora contra insetos, atividade antiprotozoária, antibacteriana, antifúngica e antitumoral, sendo que o uso como agente laxativo é o

mais aplicado e conhecido para esta classe de metabólitos (MOREIRA, 2012). Porém, o uso medicinal de antraquinonas pode promover interações medicamentosas, visto que sua ação laxativa pode diminuir a absorção de outros fármacos, reduzindo, assim, a eficácia do outro tratamento (VANGORKON, 1999).

Neste estudo, caules de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* foram secas, estabilizadas, moídas e extraídas em aparelho de Soxhlet modificado para a obtenção das frações do extrato alcoólico bruto do caule (EBC). O EBC é um extrato insolúvel em água, portanto, o dimetilsulfóxido (DMSO) foi o veículo utilizado para dissolver o extrato para aplicação intraperitoneal. Foram, também, extraídas antraquinonas, porém, não são suficientes para utilização *in vivo*.

1.5. Glicogênio

O glicogênio é o principal polissacarídeo de reserva energética das células animais, constituído por subunidades ramificadas de glicose com ligações em α -1,4 e ramificações α -1,6, contendo de 8 a 12 monômeros, podendo apresenta massa molecular de até 10^8 daltons (HARVEY, 2012). É encontrado principalmente no fígado e músculo dos animais, colaborando para o funcionamento ideal do metabolismo. Dependendo do tipo de tecido - muscular esquelético ou hepático -, a atividade e a regulação do glicogênio são diferenciadas. Nos tecidos musculares, o glicogênio é importante para fornecer energia para o músculo, enquanto que no fígado, o glicogênio é responsável por fornecer energia para outros tecidos e também regular a glicemia (CARLOS, 2014).

O fígado é o principal órgão de produção de glicose endógena, e os principais processos envolvidos são a glicogenólise e a glicogênese (SUNDARAM *et al*, 2013). A via glicogênica é responsável pela formação do glicogênio, e através da glicogênese, esse glicogênio é armazenado nos diferentes tecidos, enquanto que a glicogenólise promove a degradação dos grânulos (OLIVEIRA, 2010).

No fígado, o glicogênio existe na forma de grânulos, localizados principalmente na fase extramitocondrial da célula, próximos às enzimas relevantes. A degradação de glicogênio é catalisada por fosforilases, e um dos produtos da degradação é a glicose livre, liberada no sangue (HEMS, 1970).

1.6. Ácido periódico de Schiff (PAS)

O acúmulo de glicogênio nos hepatócitos é uma resposta fisiológica normal após a ingestão de alimentos (YI, 2012). Devido ao ciclo circadiano dos roedores, que comem principalmente no período noturno, a maior quantidade de glicogênio acumulado no fígado estará presente durante a madrugada e início da manhã, e o glicogênio estará disponível ao longo do dia, sendo inicialmente removido pelos hepatócitos presentes na zona 3, próximo à região centro-lobular. Portanto, a quantidade de glicogênio presente no fígado dos animais depende também do momento no dia em que a autópsia foi realizada (THOOLEN, 2010). No caso deste trabalho, todos os animais foram sacrificados pela manhã.

A presença de glicogênio hepático nos ratos tratados com 4-NQO foi identificada através da técnica de coloração com o Ácido Periódico de Schiff (PAS), que permite a identificação de compostos ricos em carboidratos, devido a deposição de glicogênio nos

hepatócitos. A reação de PAS positivo no hepatócitos apresenta coloração magenta, indicando onde o glicogênio está presente (KOSE, 2012).

Neste estudo, a avaliação da quantidade de glicogênio nas células hepáticas dos animais foi feita de forma qualitativa, apenas.

2. Desenvolvimento

2.1. Objetivo

O presente estudo apresenta como objetivo identificar a ocorrência de alterações metabólicas hepáticas através do acúmulo de glicogênio no fígado de ratos tratados com 4-NQO e EBC de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* através da análise histopatológica com PAS.

Este projeto faz parte de um trabalho com um objetivo maior, identificando a liberação de enzimas hepáticas relacionadas com o processo de lesão celular e histopatológicas nos mesmos grupos de ratos utilizados.

2.2. Metodologia

2.2.1. Ensaios *in vivo*

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus* albinos, Holstzman), 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 mantidos em gaiolas plásticas em temperatura controlada ($21 \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade (65-75%) com ciclo circadiano de 12 horas, e alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

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.

2.2.2. Desenho experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos com 8 animais cada. Os animais foram submetidos à indução de carcinogênese química com o carcinógeno 4-NQO, na concentração de 25 ppm massa solvente/massa soluto), administrado oralmente através da água de beber, durante 8 semanas, tempo necessário para atingir a fase correspondente ao desenvolvimento clínico de lesões pré-malignas e malignas na língua dos animais.

O grupo denominado G1 (controle normal) não foi exposto ao carcinógeno. O grupo G2 (controle 4-NQO) foi tratado com o carcinógeno durante 8 semanas. O grupo G3 (controle veículo) foi tratado apenas com dimetilsulfóxido (DMSO) 1%. O grupo 4 (controle EBC) foi tratado com extrato de *R. sphaerosperma* 100mg/Kg de peso corporal, sem exposição ao 4NQO, durante 8 semanas. O grupo G5 (EBC 100mg/kg, com 4-NQO) foi exposto ao 4-NQO por 8 semanas, e posteriormente, tratado com extrato de *R. sphaerosperma* 100mg/Kg de peso corporal, durante 8 semanas, via intraperitoneal.

2.2.3. Coleta de órgãos e processamento histopatológico

Após 8 semanas de exposição ao carcinógeno 4-NQO, seguidas de 8 semanas com o respectivo tratamento, os animais foram sacrificados por decapitação, removendo-se o fígado, armazenando-os em solução de formaldeído 10% tamponado com tampão fosfato durante 24 horas para posterior processamento histológico. Após este período, os lóbulos hepáticos foram acondicionados em álcool 70° GL até o início do processamento histopatológico, que consistiu das etapas abaixo:

- I. Deixar os órgãos em álcool 90° Gl durante 1 hora;
- II. Realizar 5 trocas sucessivas em frascos com álcool absoluto, com intervalos de 30 minutos entre cada uma;
- III. Deixar por 30 minutos em solução (1:1) de álcool absoluto e solvente xilol;
- IV. Manter em solução de xilol puro durante 30 minutos;
- V. Trocar a solução de xilol puro e manter durante 1 hora;
- VI. Deixar por 1 hora em parafina líquida na estufa a 61 °C;
- VII. Permanecer por 2 horas em nova parafina líquida na estufa a 61°C;
- VIII. Confeccionar os blocos em inclusora padrão, com uso de parafina líquida, formas metálicas e placa fria (SANTOS, 2013).

2.2.4. Cortes e coloração histológica

Após a adesão dos lóbulos hepáticos aos blocos de parafina, os cortes histológicos foram realizados em micrótomo semi-automático, com cortes semi-seriados de 5 µm de espessura. Todos os cortes foram submetidos à solução de etanol 10° GL e, posteriormente, à água aquecida à 42°C. Os cortes histopatológicos foram dispostos em lâminas de vidro lapidadas e encaminhadas à estufas (60°C±1°C) para adesão dos cortes às lâminas.

Foi realizada a coloração histológica com PAS, cuja solução corante de Reagente de Schiff é preparada ao aquecer 200 mL de água destilada em um erlenmeyer de 500 mL até a ebulição, adicionando-se 1 g de fucsina básica (Merck, granulada), evitando reação térmica. Após a diminuição da temperatura até 60°C, filtra-se a solução, sob agitação, até atingir temperatura ambiente e adiciona-se 20 mL de

ácido clorídrico 1N. À solução resultante, adiciona-se, sob agitação constante, 1g de metabissulfito de sódio, permanecendo-se em repouso por 12 horas. Isto feito, adiciona-se 1 g de carvão ativado, sob agitação durante 1 hora, filtrando-se em seguida e estocando a solução resultante sob refrigeração. A solução de ácido periódico 0,5% é preparada através da dissolução de 0,5 gramas de cristais de ácido periódico em 100 mL de água destilada, devendo ser estocada sob refrigeração.

Procedimento geral:

- I. Desparafinar e hidratar;
- II. Oxidar em ácido periódico 1% por 15 minutos;
- III. Lavar em água corrente por 5 minutos e enxaguar em água destilada por 3 vezes;
- IV. Corar em reativo de Schiff por 30 minutos;
- V. Lavar em água corrente por 5 minutos;
- VI. Contra corar pela hematoxilina de Harris por 5 segundos;
- VII. Lavar em água corrente por 5 minutos;
- VIII. Desidratar, diafanizar (banhos de 5 minutos) e montar em Permount (SANTOS, 2013).

2.3. Método de análise

Após a coloração do fígado com PAS dos diferentes grupos de animais, foram realizadas fotografias em quatro campos (40x) na zona centro-lobular e quatro campos (40x) na zona espaço porta. Ao obter as fotografias, foi realizado o ajuste digital das

imagens utilizando o software Picasa ® versão 3.0, com a opção Autocontraste, para realçar as cores e melhorar a visualização das imagens.

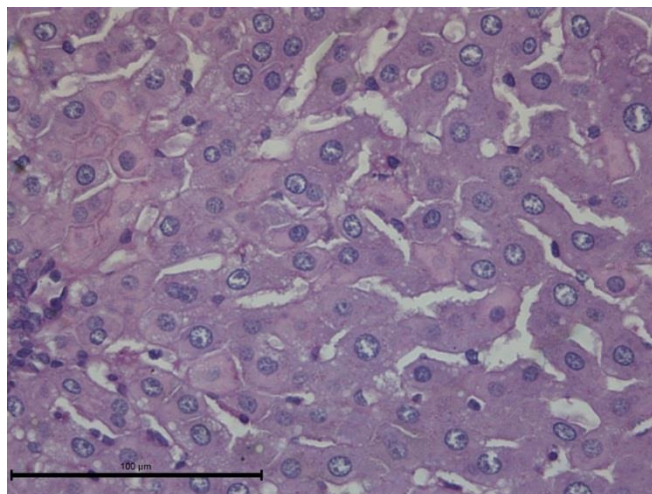


Figura 2: Fotografia original (40x, PAS)

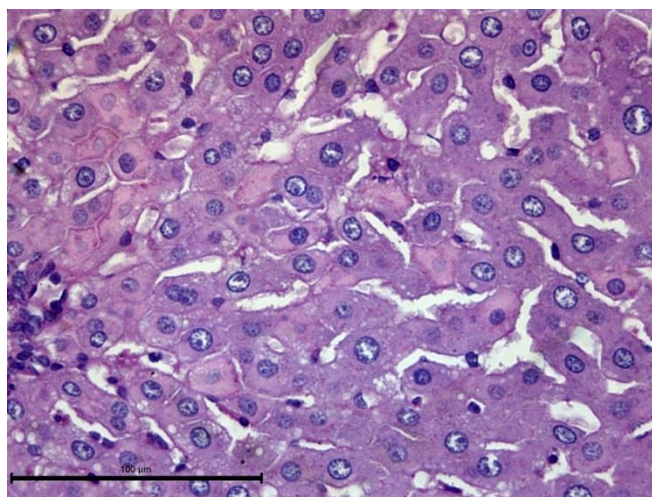


Figura 3: Fotografia tratada com Autocontraste (40x, PAS)

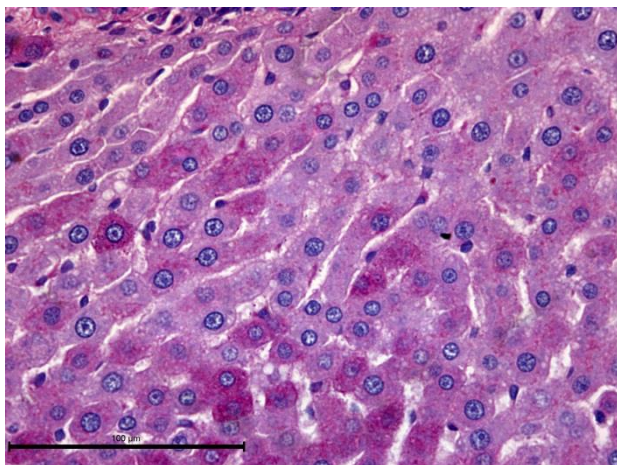
Após realização dos ajustes, foram feitas as contagens de hepatócitos nucleados, considerando-se células com menos de 50% de glicogênio marcado com PAS ($PAS < 50\%$); células com quantidade igual ou superior a 50% de glicogênio marcado com PAS ($PAS \geq 50\%$) e células negativas para presença de glicogênio na

coloração de PAS (ausentes). Posteriormente, os dados foram tabulados em zona 1 (região do espaço porta) e zona 3 (região centro-lobular) e por fim, foi realizada a soma dessas duas regiões identificando como “fígado”.

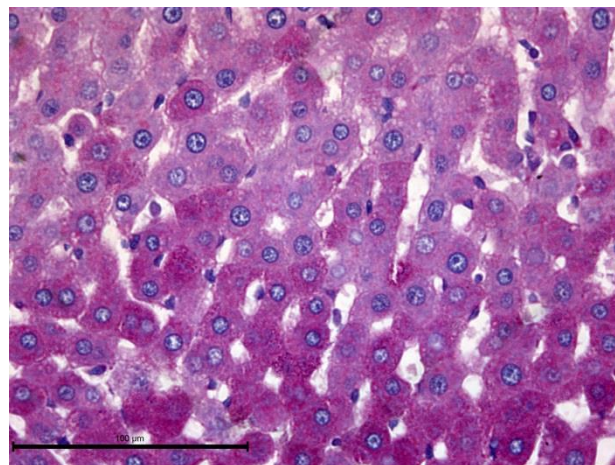
3. Resultados

3.1. Resultados

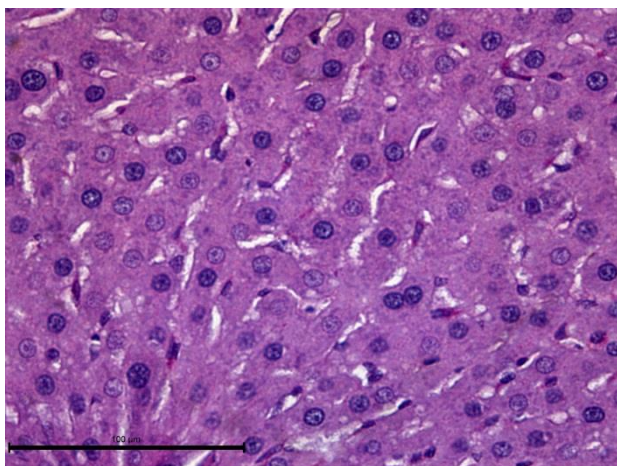
A análise microscópica do fígado dos diferentes grupos de animais revelou preservação da estrutura geral do órgão com presença de espaço porta e veia centrolobular. A figura 4 abaixo mostra o fígado dos cinco diferentes grupos, indicando a região do espaço-porta (zona 1) e centrolobular (zona 3), respectivamente.



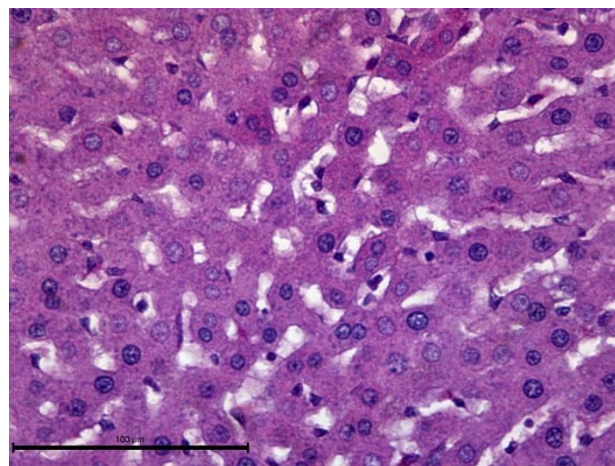
Grupo controle normal (40x PAS, zona 1)



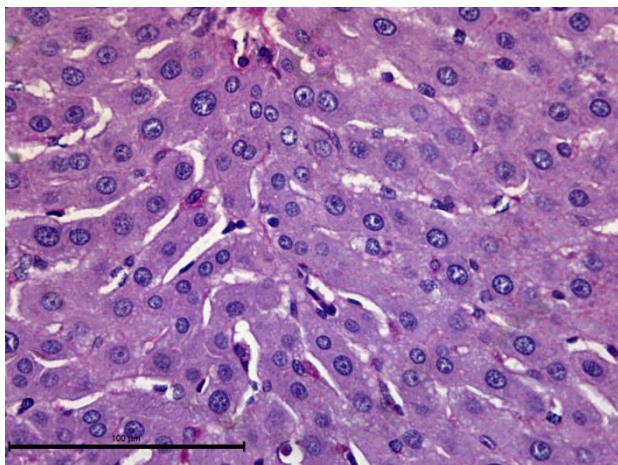
Grupo controle normal (40x PAS, zona 3)



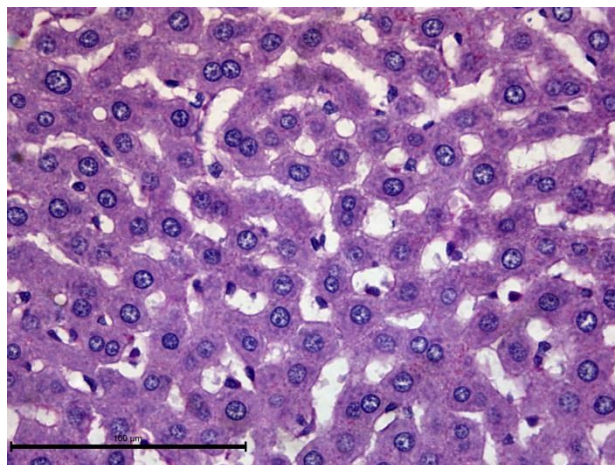
Grupo controle 4-NQO (40x PAS, zona 1)



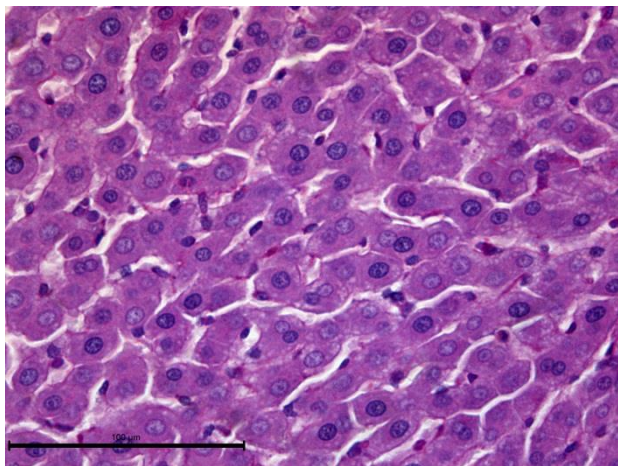
Grupo controle 4-NQO(40x PAS, zona 3)



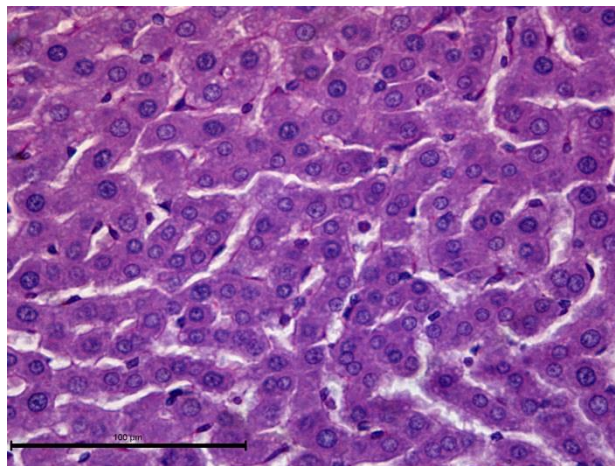
Grupo controle veículo (40x PAS, zona 1)



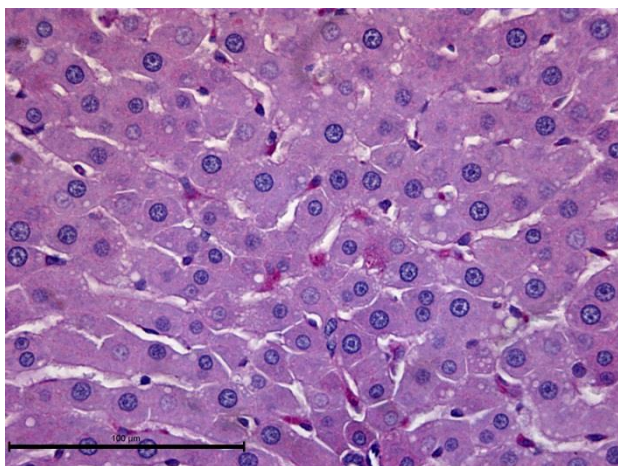
Grupo controle veículo (40x PAS, zona 3)



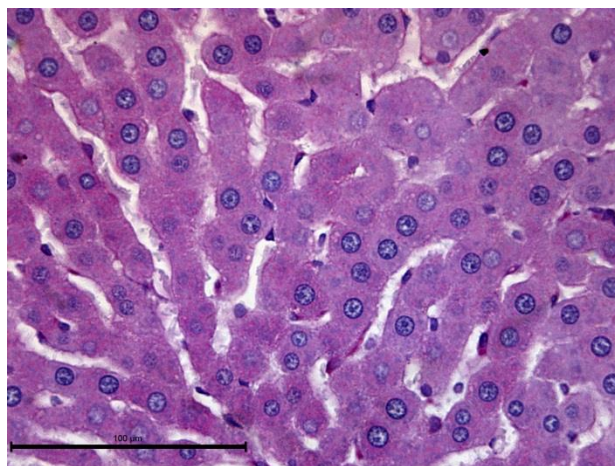
Grupo controle EBC (40x PAS, zona 1)



Grupo controle EBC (40x PAS, zona 3)



Grupo EBC 100mg (40x PAS, zona 1)



Grupo EBC 100mg (40x PAS, zona 3)

Figura 4: Fígado dos diferentes grupos de animais, indicando a região do espaço-porta (zona 1) e centro-lobular (zona 3).

Os fígados dos diferentes grupos analisados demonstraram padrões numéricos distintos de marcação para glicogênio, mas que não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Os resultados obtidos nas diferentes análises são demonstrados nos gráficos a seguir, sendo que foram separados em região do espaço-porta (zona 1), região centro-lobular (zona 3) e fígado.

Na zona 1 (espaço-porta), observamos distribuição semelhante de presença de células com >50% de glicogênio no citoplasma, enquanto que na análise de células com <50% de glicogênio intra-celular, verificamos uma tendência de mais células no grupo controle EBC 100 (sem 4-NQO), conforme mostra o gráfico 1. Entretanto, não identificamos diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos.

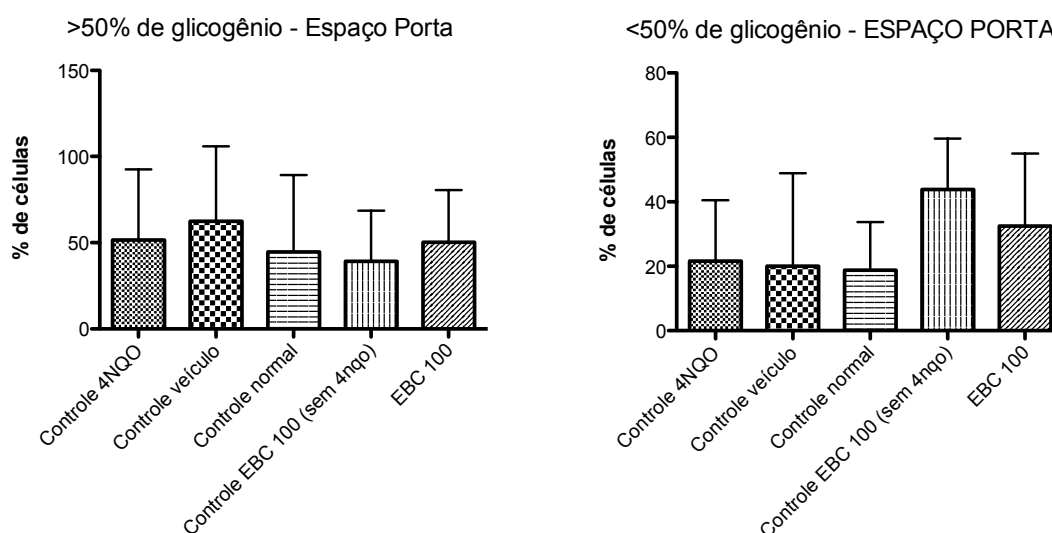


Gráfico 1: Resultados das análises da região do espaço-porta (zona 1) nos diferentes grupos.

Na zona 3 (centro-lobular), observamos uma tendência de presença de menos células com >50% do citoplasma no grupo EBC (sem 4-NQO), que inclusive, apresenta-se praticamente espelhada quando avaliamos a presença <50% de glicogênio, conforme gráfico 2. Entretanto, novamente não identificamos diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos.

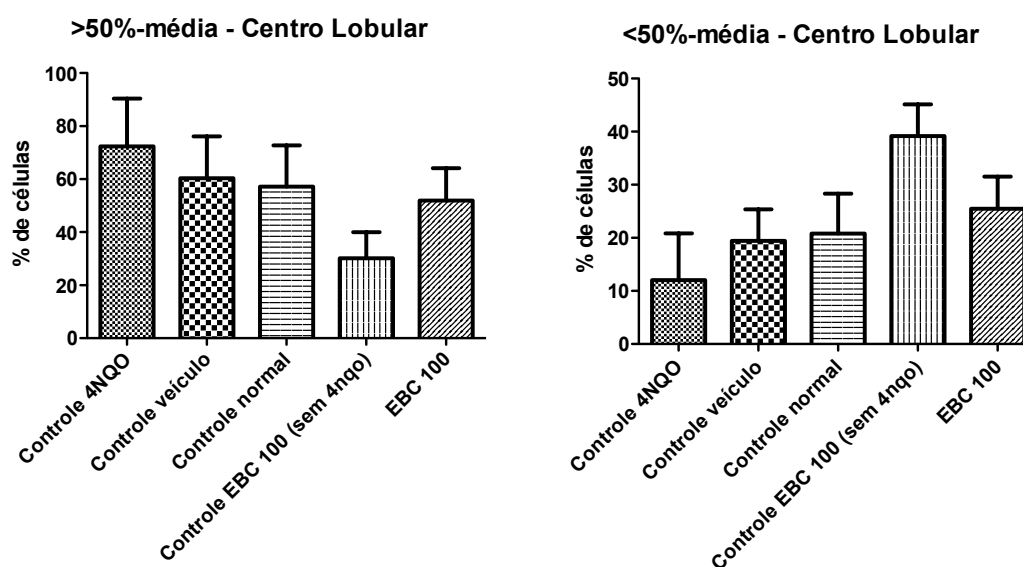


Gráfico 2: Resultados das análises da região centro-lobular (zona 3) nos diferentes grupos.

Ao analisar o total de glicogênio somando a zona 1 e a zona 3, também não verificamos diferenças entre os diferentes grupos analisados, mas a mesma tendência de células com >50% de glicogênio no grupo controle EBC (sem 4-NQO) foi observada, como mostra o gráfico 3. Do mesmo modo, espelhada na análise de células com <50% de glicogênio, conforme gráfico 4. De fato, quando somamos as células com >50% de glicogênio e as células com <50% de glicogênio, as barras tornaram-se bastante

semelhantes e indicam a perda de tendência que se apresentava no grupo controle EBC 100 (sem 4-NQO), enfatizando o aspecto invertido das análises citadas (gráfico 5).

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas através da avaliação da variância pelo teste ANOVA utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.0b.

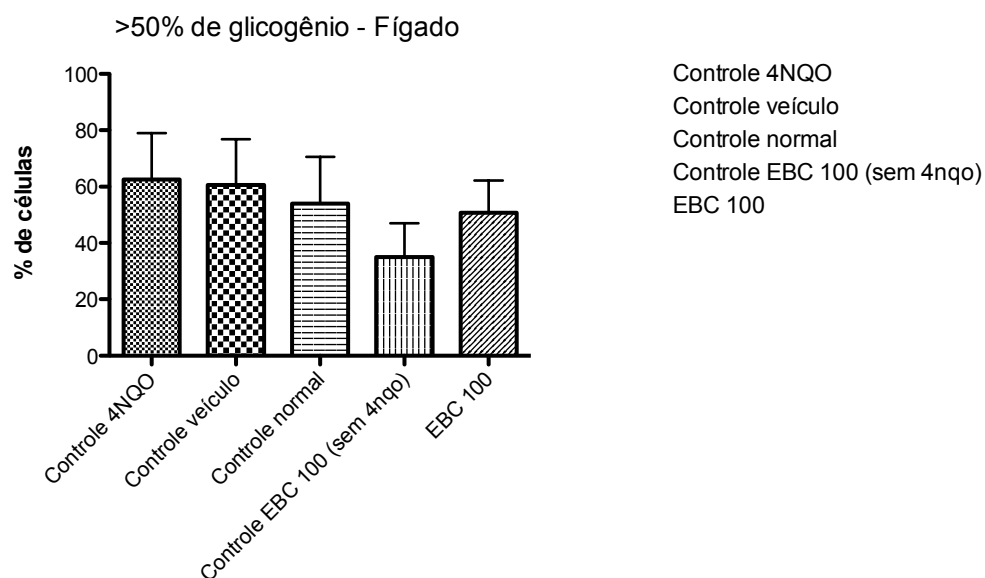


Gráfico 3: Resultados das análises do fígado nos diferentes grupos, com células contendo >50% de glicogênio.

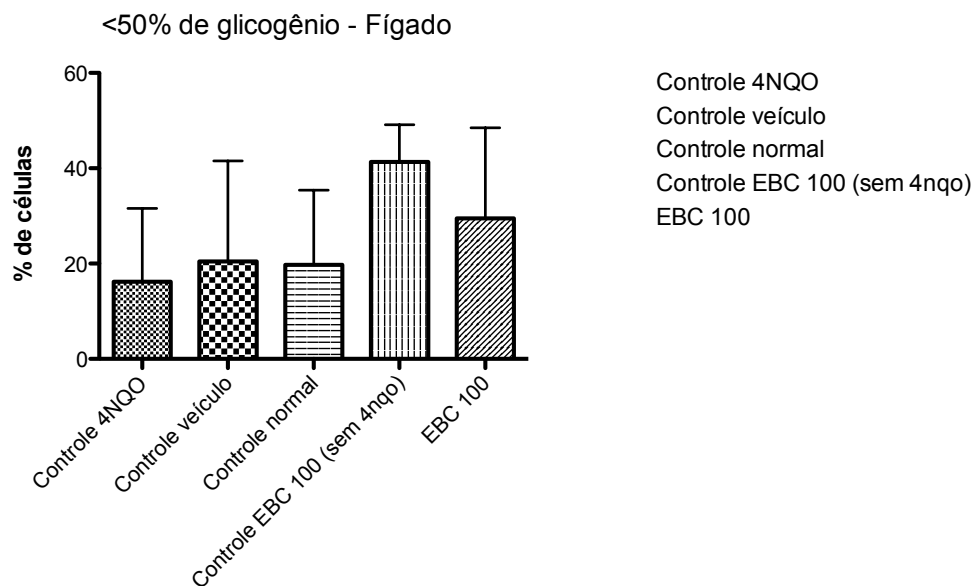


Gráfico 4: Resultados das análises do fígado nos diferentes grupos, com células contendo <50% de glicogênio.

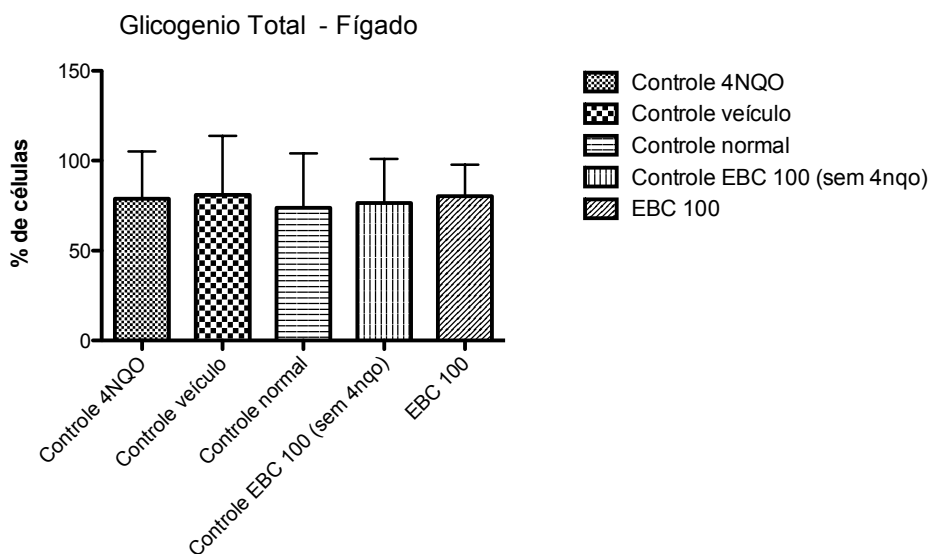


Gráfico 5: Quantidade total de glicogênio presente no fígado nos diferentes grupos.

Considerando o fígado como uma única região, somando-se o total de glicogênio nas zonas 1 e 3, o teste de contingência de Fischer possibilita verificar que, ao comparar o fígado dos animais do grupo de controle normal com o grupo controle EBC, houve diferença significativa entre eles ($P=0,0020$), bem como ao comparar o fígado dos animais do grupo controle normal com o grupo de controle veículo ($P=0,0036$) e entre o fígado dos animais do grupo controle normal com EBC 100 ($P=0,0036$). O único grupo em que não houve diferença significativa foi entre o grupo controle normal e o grupo controle 4-NQO ($P=0,1676$). O gráfico 6 mostra a análise realizada entre todos os grupos do estudo.

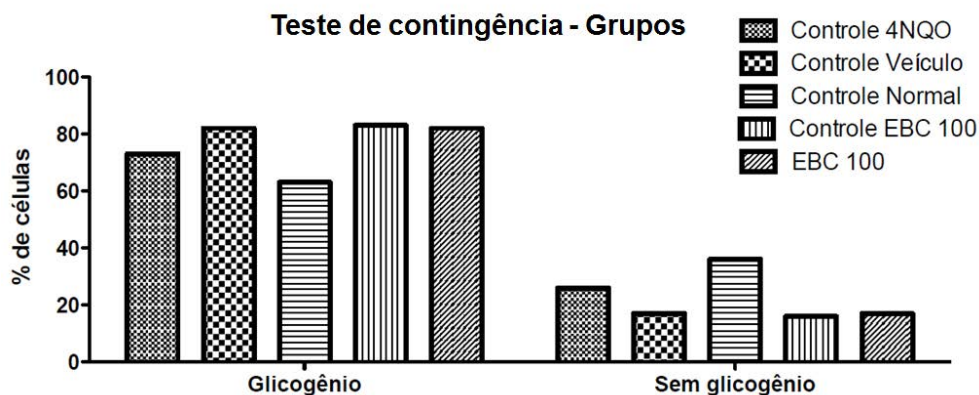


Gráfico 6: Resultados das análises do fígado nos diferentes grupos, de acordo com o teste de contingência de Fischer.

4. Discussão

O metabolismo do glicogênio é fundamental para manter a homeostase do organismo, e sua disfunção pode causar algumas consequências, como a glicogenose, uma doença de caráter hereditário que ocorre devido à falta de enzimas necessárias para sua mobilização. Existem treze tipos de glicogenoses, diferindo no órgão afetado, na idade em que ocorrem as manifestações clínicas, na severidade dos sintomas e no efeito enzimático (defeito metabólico no catabolismo ou anabolismo do glicogênio), sendo, portanto, classificadas de acordo com a enzima alterada. A glicogenose mais frequente é a glicogenose tipo I, também conhecida como Doença de Von Gierke, caracterizada pela deficiência do complexo enzimático glicose-6-fosfatase, responsável pela metabolização do glicogênio. Sendo assim, o glicogênio estocado não é metabolizado pelas células hepáticas e renais, causando o acúmulo nesses órgãos (CARLOS, 2014).

Os acúmulos de glicogênio podem ocorrer também devido a uma resposta fisiológica à ingestão de alimentos, ou ainda, pode ser resultado de perturbações metabólicas provocadas por tratamentos que os animais foram expostos (SANTOS, 2013). Em nosso estudo, não identificamos diferenças entre os grupos quando analisamos as zonas 1 e 3 isoladamente. Considerando que a zona 3 é responsável pela detoxicação e a zona 1 é responsável pela gliconeogênese (THOOLEN, 2010), podemos considerar que os animais foram pouco ou não foram afetados pela exposição às diferentes substâncias estudadas no projeto, não havendo sobrecarga nas funções hepáticas.

Do mesmo modo, quando somamos as zonas 1 e zona 3 e obtivemos o nível geral de glicogênio hepático, pudemos verificar que os animais tratados com EBC e 4-NQO+EBC demonstraram maiores concentrações de glicogênio hepático, mas estas concentrações apresentaram-se semelhantes às encontradas no grupo controle veículo do 4-NQO.

Os níveis de glicose hepáticos são ajustados por mecanismos intrínsecos hepáticos que envolvem glicogenólise e gliconeogênese, além de glicogênese. A glicogenólise e a glicogênese são rapidamente ajustadas com mudanças nas condições *in vivo* neural, hormonal ou uma integração do controle neural-hormonal. Por outro lado, a gliconeogênese parece ter pequeno papel no ajuste de condições metabólicas (STALMANS, 1976).

Uma variedade de hormônios é capaz de produzir um efeito estimulador sobre a glicogenólise, podendo ser demonstrada com um aumento da depleção de glicogênio ou com um aumento na quantidade de fosforilase A no fígado (HEMS, 1970). A insulina tem proeminente papel na regulação dos níveis hepáticos de glicogênio, pois sua falta aumenta a fosforilação de glicogênio e reduz a atividade de síntese de glicogênio, prejudicando, assim, a capacidade do fígado em armazenar glicogênio (ARYA, 2015). Contudo, alguns estudos sugerem que a insulina sozinha no fígado de animais pode exercer um ligeiro efeito supressor sobre a produção de glicose, porém, essa supressão não implica, necessariamente, uma diminuição da glicogenólise (HEMS, 1970).

Outros compostos também são reconhecidos como contra reguladores hormonais, ou seja, são hormônios antagonistas da insulina e que podem estimular a degradação do glicogênio, como o glucagon, catecolaminas, cortisol, adrenalina e hormônio do crescimento, e conforme descrito em estudos com fígado de ratos privados

de alimentação, o glucagon, a epinefrina e a vasopressina podem estimular a gliconeogênese. (Felig *et al*, 1979; Stalmans, 1976; Hems & Whitton, 1980; Hers, 1976). Hems, (1970), sugere que esse sistema hormonal duplo e antagonista pode ter um papel importante na glicogenólise e homeostase da glicose em animais normais, visto que é secretado pelo pâncreas endócrino para a veia porta hepático, sendo o fígado o primeiro órgão que recebe seus efeitos.

Além disso, Nishihata *et al.*, 1988, relataram que uma grande liberação de glicose hepática pode ser um método adequado para verificar possível toxicidade hepática. Um estudo realizado com ratos albinos tratados com DMSO administrado através da veia cava inferior e posterior dissecação da veia tríade portal mostrou que o DMSO é capaz de diminuir a redução do nível de glicogênio hepático, podendo prolongar a duração da isquemia hepática (danos causados por falta de suprimento sanguíneo devido a presença de trombos) ou para reduzir os efeitos adversos do tecido hepático durante o período isquêmico existente (AKUREK, 2000). Além disso, Alizadeh (2014) realizou um estudo com células adiposas derivadas do tecido-tronco mesenquimais em que os resultados demonstram que grupos tratados com DMSO apresentaram aumento na porcentagem de armazenamento de glicogênio hepático.

O DMSO foi utilizado como veículo em todos os grupos de nosso estudo, e os resultados demonstraram acúmulo de glicogênio hepático tanto nos grupos tratados e controles, podendo demonstrar um efeito não tóxico e possivelmente metabólico nos grupos analisados.

O 4-NQO é biotransformado em 4-HAQO no compartimento hepático, e esse composto é capaz de induzir um forte estresse oxidativo intracelular devido à formação de espécies reativas de oxigênio que formam adutos no DNA. Além disso, o 4-HAQO é

metabolizado e acetilado pela enzima seril-tRNA-sintetase, formando o complexo seril-AMPenzima, capaz de introduzir grupos quinolonas dentro do DNA, potencializando os danos no material genético e, conseqüentemente, o efeito mutagênico (FARIA, 2006), indicando ser um composto mais oxidante que o seu precursor. Durante o tratamento dos animais, foi observada a ausência de tumores no fígado nos grupos de ratos tratados com 4-NQO na concentração de 25 ppm.

5. Conclusão

Não identificamos diferenças estatisticamente significantes nos níveis de glicogênio nas zonas 1 e 3 nos diferentes grupos estudados. Por outro lado, verificamos que ao somarmos as zonas 1 e zona 3, obtivemos o nível geral de glicogênio hepático dos animais tratados com EBC e 4-NQO+EBC, e estes demonstraram menores concentrações de glicogênio hepático, o que indica um melhor funcionamento do fígado, porém, estas concentrações apresentaram-se semelhantes às encontradas no grupo controle veículo do 4-NQO.

Portanto, a análise dos resultados possibilita concluir que as substâncias sob análise não foram tóxicas aos animais nos diferentes grupos, havendo apenas um ligeiro aumento nos níveis de glicogênio hepático geral (controle normal, controle 4-NQO, controle veículo, controle EBC e EBC 100mg/kg).

6. Referências bibliográficas

ALIZADEH, E.; The effect of dimethyl sulfoxide on hepatic differentiation of mesenchymal stem cells. **Artif Cells Nanomed Biotechnol.** V.30, 1-8, 2014.

ARYA, A., *et al.*; Extract of *Woodfordia fruticosa* flowers ameliorates hyperglycemia, oxidative stress and improves β -cell function in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology.** V.175, 229–240, 2015.

AKYUREK, N., KAFALI, E., MUHTAROGLU, S.; The Effects of Dimethylsulfoxide on Experimental Hepatic Ischemia. **Swiss Surgery.** V. 6, pp. 23-27, 2000.

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

CARLOS, C.S. *et al.*; Glicogenoses: Uma revisão geral. **Bioscience Journal.** V.30, n.5, p.1598-1605, Uberlândia, 2014.

HEMS, D.A.; WHITTON, P.D.; Control of hepatic glycogenolysis. **Physiological Reviews.** 60 1-50. 10, London, 1980.

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 Clínica Integrada**, 11(1):13-20, João Pessoa, 2011.

HERS, H.G; The control of glycogen metabolism in the liver. **Annu. Rev. Biochem.** 45, 176-189, 1976.

FARIA, P.R.; **Carcinogênese bucal induzida pela 4NQO em língua de camundongo.** Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba , 2006.

FELIG, P.; *et al.*; Hormonal interactions in the regulation of blood glucose. **Recent Prog. Horm. Res., Academic Press.** V. 35, pg 501-532, New York, 1979.

FRANÇA, D.S.; **Carcinogênese bucal – efeito da exposição crônica a soluções de etanol sobre o epitélio lingual de camundongos.** Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

HARVEY, R.A., FERRIER, D.R.; **Bioquímica Ilustrada**; Artmed – Grupo A; Ciências Biológicas e Naturais, 5ª edição, pg 126, 2012.

HEMS, D.A.; Control of hepatic glycogenolysis. **Physiological Reviews**. V. 60, n.1, St. George's Hospital Medical School, London, England, 1980.

HIPOLITO, M.; Aspectos bioquímicos em fígado de rãs-touro (*Rana catesbeiana* shaw, 1802) sadias e doentes*. **Arq. Inst. Biol.**, V.71 n.2, p.147-153, São Paulo, 2004.

INCA, Instituto Nacional de Câncer “José Alencar Gomes da Silva”. **Câncer de Boca**. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=324. Acesso em: 29 de julho de 2015.

KIERSZEMBAUM, A.L.; **Histologia e Biologia Celular. Uma introdução à patologia**. Nova Iorque, 2004.

KOSE, E. *et al.*; Beneficial Effects of Montelukast Against Methotrexate-Induced Liver Toxicity: A Biochemical and Histological Study. **The ScientificWorld Journal**. Artic10, 1100/2012/987508, 2012,

MAINENTI, P.; **Imunofenotipagem de lesões obtidas em carcinogênese quimicamente induzida por DMBA em glândulas salivares submandibulares de ratos (*Rattus norvegicus*)**. Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José dos Campos, 2013.

MENDONÇA, D.F., *et al.*; The inactive form of glycogen synthase kinase-3 β is associated with the development of carcinomas in galectin-3 wild-type mice, but not in galectin-3-deficient mice. **Int J Clin Exp Pathol**. V. 5(6): 547–554, 2012.

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.

NISHIHATA, T.; *et al.*; Glycogenolysis in the rat isolated perfused liver as a measure of chemically induced liver toxicity. **J Pharm Pharmacol**. V.40(5):333-6, 1988.

OLIVEIRA, R.H.F. *et al.*; O extrato de maracujá sobre a morfometria de hepatócitos da tilápia do Nilo. **Ciência Rural**. V.40, n.12, p.2562-2567, Santa Maria, 2010.

SANTOS, L.A.; **Avaliação histopatológica dos efeitos de primaquina e PHE-ALA-PQ sobre baço, rim e fígado de ratos.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara. 2013.

STALMANS, W.; The role of the liver in the homeostasis of blood glucose. **Current topics in cellular regulation.** V.11, 51-97, 1976.

THOOLEN, B.; Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. **Toxicologic Pathology.** V.38: 5S-81S, 2010.

VISWANADHA, V.P., SIVAN, S., SHENOI, R.R.; Protective effect of *Spirulina* against 4-nitroquinoline-1-oxide induced toxicity. **Molecular Biology Reports**, V.38, 309-317, 2011.

WOLF, J.C.; WOLFE, M.J.; A Brief Overview of Nonneoplastic Hepatic Toxicity in Fish. **Toxicologic Pathology**, 33:75–85, 2005.

YI, H.; *et al.*; Characterization of a canine model of glycogen storage disease type IIIa. **Disease Models & Mechanisms.** V.5, p. 804-811, 2012.

Araraquara, 13 de janeiro de 2016.

Camila Leal dos Santos

De acordo,

Cleverton Roberto de Andrade