

EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE DI FEREN TE SD O SE S CARBONO NO FÍ C O D ER A T O S W

**GONÇ A L Felipe Douglas Giovanini¹; RES, Argê i ca Sç h i a v
GONÇ ALVES, Reg g a ã n i V I e**

¹ Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Pelotas
felipedgiovanini@yahoo.com.br

² Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Pelotas.
Ge-schiavon@hotmail.com

³ Departamento de Morfologia - Instituto de Biologia - Universidade Federal de Pelotas
reggysvilela@yahoo.com.br

1 I N T R O D U Ç ã O

O tetracloreto de carbono (CCl₄) é um solvente industrial hepatotóxico já é bastante conhecido da procriação e cirrose em animais (Bruckner et al., 1984; Chien-Chen et al., 2009). Sua capacidade hepatotóxica deve principalmente a elevar a produção do radical trióxido devido a esta característica tem sido amplamente utilizado em modelos experimentais de hepatotoxicidade (Brattin et al., 1985; Hwang et al., 2008). Além disso, com intuito de reproduzir, de modo rápido e eficiente (Ahmed, 2009).

O CCl₄ atua também no retículo plasmático e organelas (BR) interferindo nas síntese de proteínas e alterando a função das membranas e para o meio externo. Com esse direcionamento comprometido os lipídios se acumulam na célula levando a quadro degenerativo conhecido como esteatose (Chung et al., 2000; Boll et al., 2001). A lesão ocorre na célula através de um mecanismo de metabolismo de ácidos graxos, aumentando sua síntese e utilização, transporte e excreção.

Apesar da ampla utilização deste modelo experimental, ainda são conflitantes os efeitos de reposita, já que existe uma linha separa a indução da lesão hepática e morte dos animais. do presente estudo foi avaliar os efeitos de doses diferentes de CCl₄ na indução da lesão hepática no fígado de Ratos. A partir destes dados estabelecer um protocolo de lesão hepática que não produza a morte.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Ratos Wistar machos com 11 semanas de idade pesando em média 250g foram mantidos sob condições de luminosidade (ciclos de 12 horas de claridade/escurecimento) e umidade relativa do ar (60% - 70%). Água e ração comercial (Labcl) foram fornecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos envolvidos no protocolo experimental foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal de Laboratório da Universidade Federal de Pelotas (Resolução 122/2009) e estão de acordo com o Guia Prático de Experimentação em Animais.

Toxicology, adotado pela Sociedade Americana de Toxicologia, revisado em dezembro de 2008.

A lesão hepática foi induzida nos grupos 2 e 3 por meio da administração intraperitoneal (i.p) de CCl_4 a cada 48 horas durante 12 dias, totalizando 6 aplicações. Quinze ratos Wistar foram distribuídos em três grupos com 5 animais cada de acordo com o tratamento recebido. Grupo 1: Controle (Salina, 0,9%); Grupo 2: Recebeu CCl_4 (1 ml/kg, 30% em azeite de oliva, v/v); G3: Recebeu CCl_4 (1 ml/kg, 60% em azeite de oliva, v/v).

2.1 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Para análise histopatológica, fragmentos do fígado foram fixados em Karnovsky durante 24 horas, foram desidratados em etanol e embebidos em metacrilato (Leica, Germany). Cortes de 5 micrometros foram obtidos em microtomo rotativo Milt 1000° (Reichert-Jung, Germany), corados com azul de toluidina e hematoxilina-eosina e montados com Entellan $^{\circ}$ (Merck, Germany). Foram obtidas 70 fotomicrografias com objetiva de 20x para cada grupo utilizando-se microscópio digital (Olympus, Tokyo, Japan) conectado a uma câmera digital QColor-3 $^{\circ}$ (Olympus, Tokyo, Japan). Por meio de imagens digitalizadas foram analisadas a presença de gotículas lipídicas nos hepatócitos. Para análise histomorfométrica (análise estatística) foram utilizados os softwares ImagePlus 4.5 $^{\circ}$ (Media Cybernetics, Silver Spring USA). Foram feitas seções de fígado com coraçãõ de 1% em fragmentos de fígado mantido em 70%. Os dados foram expressos como médias e desvios padrões. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para análise da diferença estatística (%). O teste de Kruskal-Wallis foi usado para análise da diferença estatística (%). $p < 0.05$ definido como estatisticamente significativo. Todos os testes foram realizados no software estatístico Graph Pad Prism $^{\circ}$ (Graph Pad Software, Inc., Califórnia).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alterações histopatológicas com acúmulo de lipídios foram observadas nos dois grupos que receberam diferentes doses de CCl_4 . Na Figura 1 pode-se observar que os animais do grupo 2 apresentaram um aumento significativo na quantidade de gordura, esteatose microvesicular, quando comparado ao controle. Na análise do fígado observou-se maior quantidade de gotículas lipídicas com desenvolvimento de esteatose macrovesicular, quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). No grupo 3 além da presença de gotículas lipídicas apresentamos intensa área de necrose. Resultados semelhantes, com acúmulo de lipídios e áreas de necrose foram encontrados por Ye et al., 2009 que usou CCl_4 1ml/kg de peso corporal, 50% em azeite de oliva. Para Wang et al., 2009 a dose de 4ml/Kg de peso corporal, 40% em azeite de oliva seria suficiente para induzir fibrose hepática e levar a morte do animal. Além disso, a administração de altas doses de CCl_4 também promove hemorragia, infiltração e edema no tecido hepático (Zeeshan et al., 2008; Kumar et al., 2009; Wang et al., 2009).

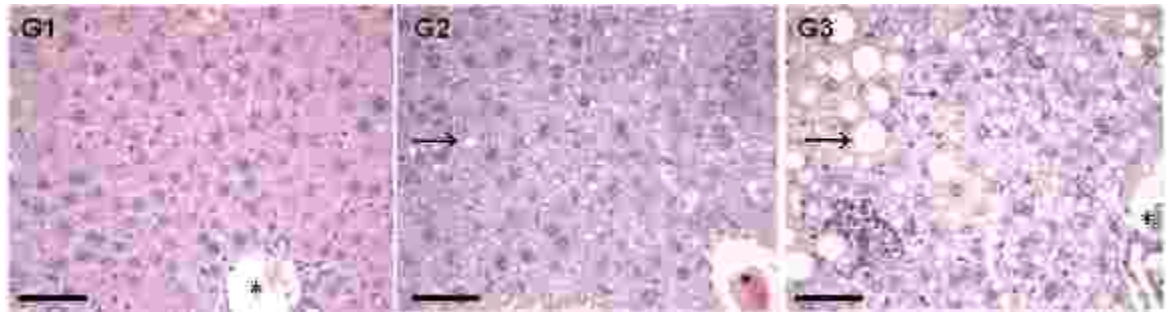


Figura 1. Efeito da exposição de diferentes doses de CCl₄ no tecido hepático de ratos. G1 = controle; G2 CCl₄ (30% v/v, 1 ml/kg); G3: CCl₄ (60% v/v, 1 ml/kg) Set = Gotículas lipídicas; A = asterisco (*) = Veia Centrolobular. Hematoxilina-Eosina (HE). Barra = 60 μm.

4 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo mostram que o CCl₄ quando aplicado na dose de 1 ml/kg (60% em azeite de oliva) é capaz de induzir modificações morfológicas e bioquímicas no fígado. Portanto, em estudos preliminares, este protocolo é eficaz para a indução de alterações físicas, bioquímicas e moleculares em ratos.

5 REFERÊNCIAS

BRUCKNER, J.V.; LUTHRA, R.; KYLE, G.M. Influence of time of exposure to carbon tetrachloride on toxic liver injury. **Ann Rev Chronopharmacol.** v.1, p.373-376, 1984.

CHIEN-CHEN, H.; CHIN-LIN, H.; SHAO-EN, T.; TIMOTHY, Yu-Chi.F.; GOW-CHIN, Y. Protective effect of *Millettia reticulata* Benth against CCl₄- Induced hepatic damage and inflammatory actions rats. **J Med Food.** v.12, p.821-828, 2009.

BRATTIN, W.J.; GLENDE JR, E.A.; RECKNAGEL, R.O. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. **J Free Radic Biol Med** v.1, p.27-38, 1985.

HWANG, Y.P.; CHOI, J.H.; JEONG, H.G. Protective effect of the *Aralia continentalis* root extract against carbon tetrachloride- carbon tetrachloride hepatotoxicity. **Journal of Free Radicals in Biology & Medicine** induced hepatotoxicity in mice. **Food Chem Toxicol.** v.47, p.75-81, 2008.

KHAN, M.R.; AHMED, D. Protective effects of *Digera muicata* (L.) Mart. on testis against oxidative stress of carbon tetrachloride in rat. **Food Chem Toxicol.** v.47, p.1393-1399, 2009.

BOLL, M.; WEBER, L.W.; BECKER, E.; STAMPFIL, A. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. **J Biosci.** v.56, p.649-59, 2001.

CHUNG, H.S.; CHONG, L.C.; LEE, S.K.; SHAMON, L.A.; BREEMEN OLATUNDE, F. Mechanisms for the hepatoprotective action of Kolaviron. Studies on hepatic enzymes, microsomal lipids and lipids peroxidation in carbon tetrachloride treated rats. **Pharmacol Res.** v.42, p.75-80, 2000.